

Parte I – Conceitos atuais em doença de Chagas humana e experimental

4. Resposta do hospedeiro à infecção

Tania C. Araújo-Jorge
Solange L. de Castro
(Orgs.)

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

JORGE, TCA., and CASTRO, SL., orgs. *Doença de chagas: manual para experimentação animal* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85-85676-75-2. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.



All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported.

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença Creative Commons Atribuição - Uso Não Comercial - Partilha nos Mesmos Termos 3.0 Não adaptada.

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.

Capítulo 4



Resposta do hospedeiro à infecção

4.1

Respostas Imune Inata, Inflamatória e de Fase Aguda na Doença de Chagas

Tania C. Araújo-Jorge

A infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi* deflagra um conjunto de reações que levam ao reconhecimento do parasita e à montagem de uma resposta imune específica bastante eficaz, capaz de controlar o crescimento parasitário por toda a vida do indivíduo. Parasitemias subpatentes e a resistência à reinfecção passam então a caracterizar a infecção humana e de outros modelos experimentais mamíferos, inclusive em camundongos.

Os sinais típicos da fase aguda humana são o chagoma (lesão na porta de entrada do parasita) e a parasitemia (presença do parasita no sangue circulante). A parasitemia desenvolve-se por uma fase indetectável microscopicamente (período pré-patente), outra detectável e crescente e uma terceira, detectável e decrescente (Figura 1). Este estágio da doença é pouco compreendido em humanos devido aos poucos casos estudados. As fontes principais de estudos são casos de infecção acidental em laboratório (Hofflin et al., 1987; Grauert et al., 1993) e casos de infecção congênita. Tal escassez está relacionada à curta duração dessa fase (um a dois meses) e à presença de uma sintomatologia tão fugaz, que pode passar totalmente despercebida (Antas et al., 1999). Após a fase aguda, geralmente benigna e inaparente, segue-se uma fase clínica conhecida como “indeterminada” ou “inaparente”, na qual associam-se ausência de sintomatologia clínica com sorologia positiva. Após vinte a trinta anos, cerca de 20% dos indivíduos infectados desenvolvem a fase crônica, sintomática, com diferentes formas clínicas: cardíaca, digestiva ou neurológica.

Nos indivíduos imunocompetentes, a articulação da resposta imune ocorre em três etapas (Figura 1). A primeira se desenvolve nas duas primeiras semanas pós-infecção, antes do aparecimento de parasitemia patente e ascendente, e depende dos mecanismos efetores da *resposta imune inata*, também chamada imunidade natural, com destaque para a resposta inflamatória. A segunda etapa, que se desenvolve nos estágios intermediário e tardio da fase aguda da infecção, quando a fase ascendente da parasitemia é refreada e controlada até atingir novamente níveis subpatentes, depende dos componentes celulares e humorais da *resposta imune específica adquirida*. A terceira etapa, também dependente da resposta imune específica, se mantém por toda a fase crônica da infecção e é responsável pela manutenção da parasitemia subpatente por longo prazo, por forte sorologia positiva e pela *memória imunológica* que garante resistência à reinfecção (e

portanto ausência de reagudização por qualquer outra cepa do *T. cruzi*) no hospedeiro imunocompetente, mas não no imunossuprimido. Essa fase é abolida se o indivíduo infectado for tratado durante a fase aguda e for curado parasitologicamente.

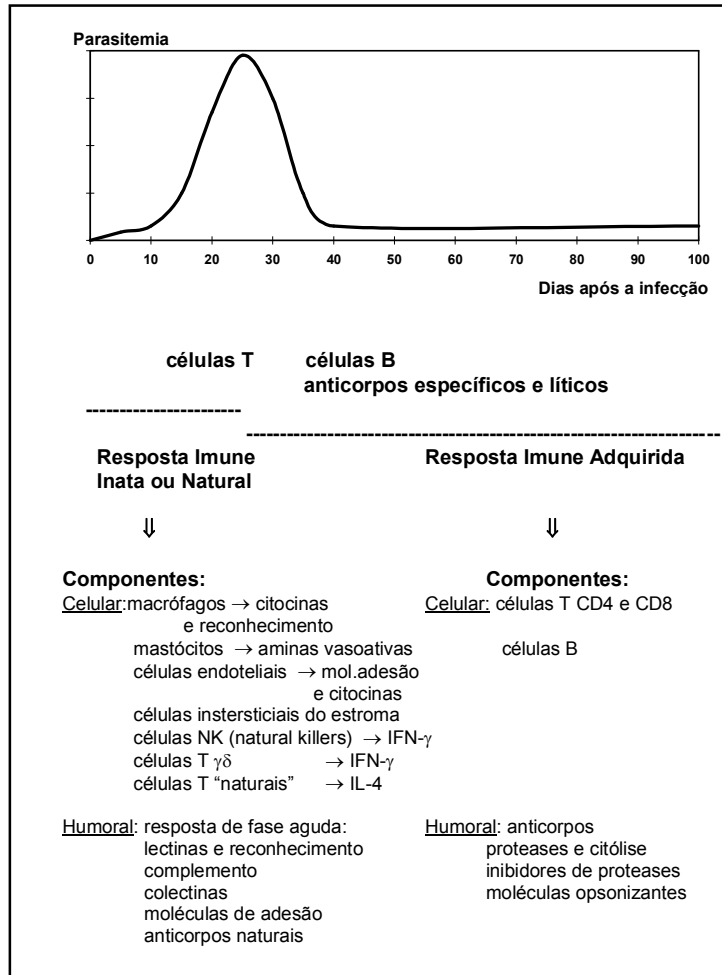


Figura 1 – Cinética das respostas imune inata e adquirida durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*, avaliada a partir da detecção da parasitemia

4.1.1 Evolução da Infecção no Sítio de Inoculação

Historicamente, a primeira questão colocada e confirmada no modelo do camundongo foi a infectividade das formas metacíclicas obtidas dos triatomíneos infectados capturados em campo, bem como das sangüíneas obtidas de animais infectados. Em 1912, Brumpt referia que em algumas horas tripomastigotas sangüíneas inoculados por via subcutânea já podiam ser encontrados no sangue, e em 1934 Dias relatou que 40 minutos após uma inoculação subcutânea, e 165 minutos após uma intraperitoneal, já se podiam evidenciar parasitas circulantes. A porta de entrada foi investigada experimentalmente em camundongos também por Romaña (1943). Este autor demonstrou que as mucosas permitiam a instalação e expansão da infecção, ao contrário da pele íntegra, que se constituía numa barreira à penetração do *T. cruzi*. O parasita só coloniza a pele por inoculação subcutânea, por escarificação e manutenção por duas horas do inóculo com fezes de triatomíneo contaminadas com metacíclicos.

A evolução da infecção no sítio de inoculação subcutânea foi também abordada no modelo do camundongo e indica a relação parasita-célula hospedeiro *in vivo* (Dias, 1934; Romaña, 1943). Durante o primeiro período de multiplicação intracelular do *T. cruzi* (três primeiros dias) não ocorrem fenômenos infiltrativos celulares. Só quatro a cinco dias após à inoculação, em seguida às primeiras rupturas de células parasitadas, é que aparecem as primeiras células de infiltrado inflamatório: leucócitos polimorfonucleares, monócitos, linfócitos e mobilização e ativação de macrófagos tissulares. Enquanto as células estão íntegras não ocorre inflamação em torno, mas à medida que aumenta o número de células destruídas pela multiplicação parasitária, aumenta a infiltração celular. É freqüente o encontro de células parasitadas no tecido conjuntivo subcutâneo e entre os feixes musculares, em especial macrófagos e fibroblastos, mas a invasão de fibras musculares vizinhas ao ponto de inoculação é um fenômeno um pouco mais tardio.

O processo inflamatório inicial é dependente da presença do parasita e envolve o recrutamento de macrófagos, células NK, neutrófilos e alguns eosinófilos nestas regiões focais. Isso foi reanalisado por Deuschländer et al. (1978). Inoculando a cepa Brazil, subcutaneamente, na pata de camundongos NMRI, os autores observaram a presença de granulócitos dois dias após a inoculação, de macrófagos infectados quatro dias após a infecção, forte infiltrado inflamatório somente nove dias pós-infecção, em todos os tecidos da pata, com ninhos de parasitas ainda em macrófagos e pseudocistos em células musculares íntegras. Após dezoito dias não havia mais parasitas nos macrófagos mas havia muitos pseudocistos nas fibras musculares, junto com forte reação inflamatória, necrose de fibras e reação de cicatrização causada pela ruptura dos pseudocistos. É portanto comum o encontro de macrófagos parasitados, servindo como hospedeiros para o parasita e sem capacidade microbicida imediata sobre eles. Com a formação do infiltrado inflamatório e a ativação celular, podem ser encontrados macrófagos com parasitas íntegros e em divisão e outros com parasitas destruídos (Romaña, 1943). É comum também a destruição de células adiposas, e há relatos de que células de parede de vaso (endoteliais) também podem ser encontradas parasitadas (Dias, 1934). Recentemente foi demonstrado que a carga parasitária na fase aguda é decisiva no desenvolvimento da patologia, do parasitismo e da ativação do sistema imune na fase crônica da infecção (Marinho et al., 1999).

Um recente estudo de Montéon et al. (1996) confirmou que o primeiro infiltrado inflamatório no sítio de inoculação subcutânea do *T. cruzi* ocorre com polimorfonucleares após 1 hora, atinge um pico em 24 horas e não é mais visto após sete dias. Já o infiltrado mononuclear inicia-se após um dia, é máximo após quinze dias, é ainda detectável aos trinta dias, e regride totalmente em oitenta dias pós-infecção. No sítio de inoculação só foi possível detectar o parasita histologicamente e por imunocitoquímica 1 ou 15 minutos após a infecção; no entanto, por PCR detecta-se DNA de *T. cruzi* desde um até quinze dias. Após trinta ou 180 dias nem mesmo por PCR os autores detectaram vestígios do parasita no sítio de inoculação. Já miosite e miocardite foram detectadas em intensidade crescente após sete, quinze e trinta dias, sempre acompanhadas de infiltrado mononuclear e da detecção do *T. cruzi* por PCR. O parasitismo decresce histologicamente após 180 dias mas mantém-se positivo por PCR, assim como a miosite e a miocardite.

Os autores acima referidos geralmente concordam em que os macrófagos têm papel decisivo na etapa inicial de proliferação parasitária:

A completa mudança do parasitismo no sítio de inoculação para o compartimento muscular sugere que a quantidade de parasitas e os macrófagos disponíveis no sítio inflamatório são fatores determinantes na fase inicial da infecção (Deuschländer et al., 1978).

Em 1929, Galliard chamou a atenção para o fato de que no peritônio dos camundongos, onde há grande disponibilidade de macrófagos residentes, se desenvolve uma infecção muito mais intensa que a percebida pelo exame do sangue. Desde muito cedo (dois dias após a infecção) já se pode detectar uma quantidade apreciável de tripomastigotas no líquido peritoneal.

4.1.2 A Resposta Imune Inata

Considerada por muito tempo como um vestígio ancestral de resposta imune, apenas recentemente a resposta imune inata vem sendo reexaminada. Seu papel no desenvolvimento e na articulação das respostas específicas adquiridas e em problemas de imunorregulação e imunopatologia vem sendo reinterpretado e considerado chave nas definições da intensidade e do tipo de resposta específica (Fearon & Locksley, 1996).

Os sistemas imune inatos, naturais, são compostos por proteínas solúveis e receptores de membrana produzidos pelas linhagens germinativas para *identificar substâncias potencialmente nocivas*. Seus principais componentes solúveis são o *sistema complemento* e as *proteínas de fase aguda*, com destaque para as *colectinas* (*mannose-binding protein* e outras), as *pentraxinas* e os *inibidores de proteases*. Seus principais componentes celulares são os *macrófagos* tissulares e *inflamatórios* (macrófagos ativados inespecificamente), as *células NK* (linfócitos *natural killers*), *outras células apresentadoras de antígenos* (especialmente células dendríticas), e *algumas células T* ($\gamma\delta$ e células T “naturais”). A característica comum a todas essas células é a expressão de moléculas de superfície com capacidade de reconhecimento dos componentes solúveis da resposta inata (receptores para complemento e para diversas proteínas de fase aguda), bem como de reconhecimento de padrões estruturais diferentes do próprio (*non-self*), especialmente carboidratos e glicolipídios complexos comuns em microorganismos. Assim, diversos tipos de receptores de superfície são moléculas de reconhecimento características dessas células, tais como os receptores *scavenger*, os receptores para complemento, o receptor para LPS (CD14) e os receptores lectínicos como o receptor de manose ou as galactinas. Por meio de sinalização desses receptores são estimuladas a síntese de IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α (fator α necrosante de tumor). Já a resposta imune adquirida, que envolve o rearranjo dos elementos V, D, e J dos genes RAG 1 e RGA 2 para gerar bilhões de clones com distintos BCR e TCR, baseia-se num sistema de detecção de peptídeos que fornece uma faixa de reconhecimento de estruturas moleculares mais ampla do que os carboidratos, mas não distingue patógenos potenciais, que precisam de uma resposta imune, de substâncias inócuas para as quais uma resposta imune pode ser desnecessária ou até mesmo problemática, como no caso de antígenos próprios.

Articulando as respostas imune inata e adquirida encontram-se as citocinas, que se classificam em classes funcionalmente distintas: TNF, TGF, IL-1, IL-6, IL-8 e MCP-1 que são consideradas a resposta de fase aguda; CNF, SCF, TPO e EPO que são citocinas envolvidas na hematopoiese e INF- γ , IL-2, -4, -6, -7, -10, -12, -13 e -15, que são as citocinas ditas reguladoras da função imune adquirida (Les & Van Voorhis, 1995).

A intensidade de apresentação de um determinado antígeno é o primeiro determinante da montagem da resposta específica adquirida pelo reconhecimento por células T auxiliaadoras. Todos os sistemas de endocitose mediada por receptores em macrófagos e células dendríticas que facilitem a apresentação de antígenos parasitários (por exemplo, lectinas e receptores diversos de remoção de componentes fisiológicos) conferem, portanto, capacidade de instrução da resposta imune inata para a resposta específica adquirida. Do mesmo modo, todos os sistemas ativadores do complemento, que geram C3d, potencializam a resposta imune humoral, pois o receptor para C3d (CD21) na membrana dos linfócitos B ao interagir com seu ligante estabiliza a ligação de CD19 com o BCR. No hospedeiro não imune os ativadores do complemento são as IgM naturais, a pentraxina CRP, as colectinas ou a via alternativa.

A resposta inflamatória é a primeira fase da resposta imune inata (Figura 2), e tem sido estudada com diversos agentes infecciosos e traumáticos (Stadnyk & Gauldie, 1991), mas pouco com *T. cruzi*. Macrófagos e mastócitos são as principais células efetoras inflamatórias residentes nos tecidos. Além destas, as células intersticiais do estroma conjuntivo (fibroblastos) e as células endoteliais dos vasos sanguíneos das regiões afetadas, compõem o universo celular responsável pela orquestração da resposta inflamatória e pelo recrutamento de células inflamatórias circulantes como linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e plaquetas. Estas últimas são provavelmente as geradoras dos primeiros sinais para a ativação de macrófagos tissulares, quimiocinas PF4 e β TG e a citocina TGF- β , secretados por plaquetas que ativam macrófagos a secretar as duas primeiras citocinas pró-inflamatórias,

IL-1/TNF- α , e os fatores de crescimento PDGF e FGF, que atuam sobre as células intersticiais do estroma do tecido lesado. Dessa ativação de plaquetas, monócitos, mastócitos e fibroblastos derivam a amplificação da resposta local e a montagem de uma resposta sistêmica. A resposta local constitui-se de um aumento de permeabilidade vascular causado principalmente por aminas vasoativas, óxido nítrico (NO), prostaglandinas e leucotrienos, ativação do endotélio vascular e de células do estroma, causada por IL-1 e TNF, com aumento de expressão e da funcionalidade de diversas moléculas de adesão e liberação de estímulos quimiotáticos (leucotrienos -LTB₄- e quimiocinas como IL-8 e MCAF), para a marginação vascular de neutrófilos, linfócitos e monócitos. A resposta sistêmica constitui-se de uma ação de IL-1, IL-6, TNF e prostaglandinas ao nível do sistema nervoso central, levando à febre, à produção de cortisol, de IL-1, IL-6 e TNF ao nível hepático, estimulando a resposta de fase aguda, dos fatores estimuladores de colônias (GM-CSF e G-CSF) e de IL-3 ao nível da medula óssea para aumento do número de leucócitos e, finalmente, pelo efeito de IL-1 e IL-6 na inicialização da resposta imune por células B e T.

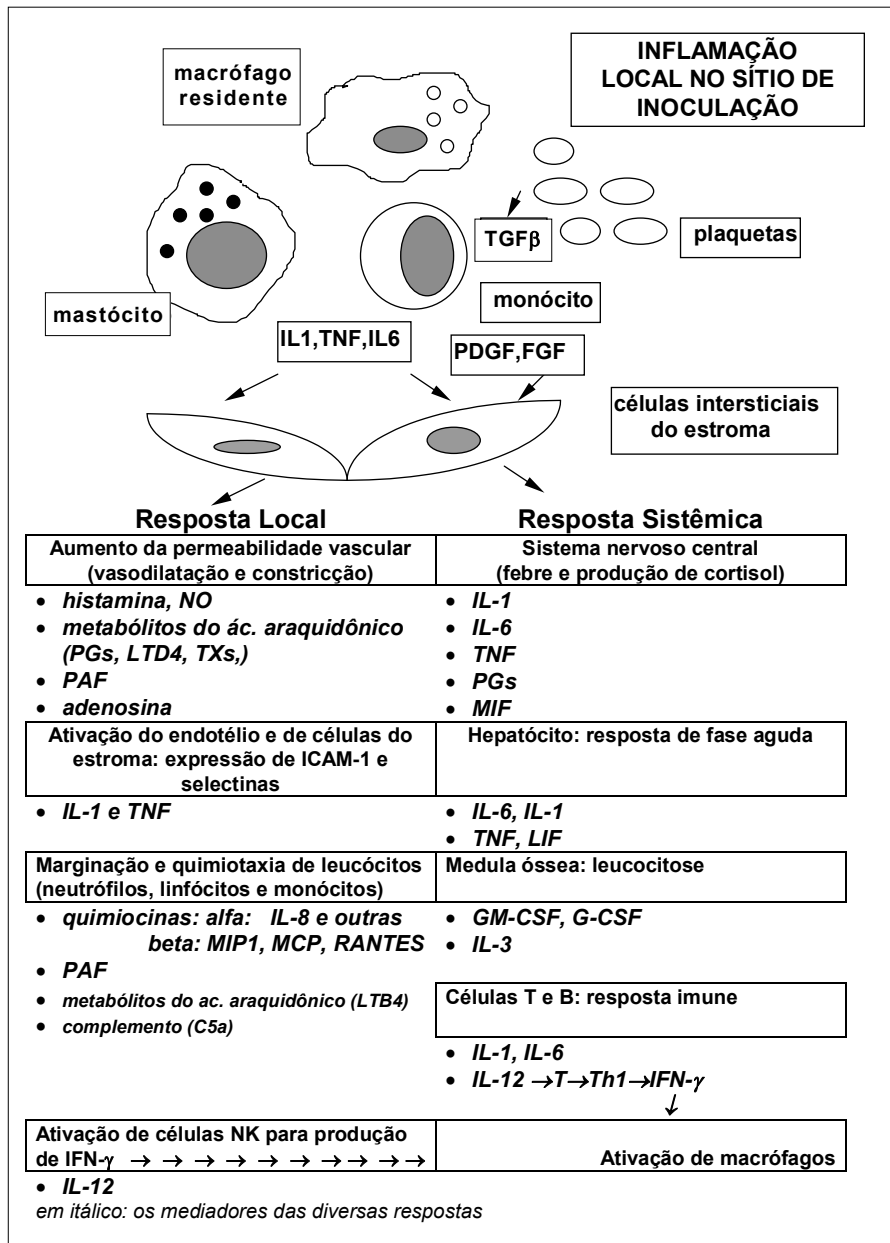


Figura 2 – Células e mediadores envolvidos na resposta de fase aguda

4.1.3 A Resposta Imune Inata na Doença de Chagas

Existem poucos estudos sobre a resposta inflamatória imediata à inoculação subcutânea com *T. cruzi*, protótipo da infecção natural ou acidental. Além disso, a infecção por via vetorial ocorre, provavelmente, mais por via da mucosa ocular do que por via subcutânea, posto que o *T. cruzi* não está presente na saliva e sim nas fezes que o triatomíneo deposita na região onde lesou um vaso sanguíneo para seu repasto.

Num sítio de inoculação intradérmico, provavelmente as plaquetas são as primeiras sinalizadoras para a inflamação. O processo de invasão de macrófagos e células não fagocíticas é bastante complexo, envolvendo mecanismos ativos e passivos, tanto por parte do parasita quanto da célula-alvo, bem como numerosos componentes da membrana de ambos (revisto em Araújo-Jorge et al., 1992a e em Burleigh & Andrews, 1995). Após vários ciclos reprodutivos, as formas amastigotas sofrem diferenciação para tripomastigotas, que são liberados após ruptura da célula, podendo invadir células vizinhas ou serem levados a outros tecidos pela corrente sanguínea; por isso a parasitemia não é detectável nos primeiros sete a dez dias de infecção, quando a proliferação parasitária ainda está restrita à lesão de porta de entrada. Num estudo de infecção acidental, a parasitemia foi detectada apenas 33 dias após a infecção (Hofflin et al., 1987). O chagoma de inoculação cutânea é a primeira reação observada no mamífero após o contato com as formas infectantes e lembra uma reação tipo hipersensibilidade retardada (Romaña, 1943). Após o início da disseminação por circulação sanguínea ou linfática, quando um a dois parasitas já podem ser observados numa gota de sangue periférico, há uma fase rápida de expansão parasitária (fase ascendente rápida da parasitemia) devida sobretudo à proliferação em macrófagos de baço e fígado. Essa fase é logo em seguida refreada pela ação eficiente de uma resposta específica mediada por células T (ver item 4.2).

4.1.3.1 Citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão na fase aguda

Alguns estudos já abordaram as variações e o papel das citocinas IL-1, IL-6, TNF- α e TGF- β , principais orquestradoras da resposta inflamatória durante a infecção experimental por *T. cruzi* (Tarleton, 1988, 1990; Russo et al., 1989; Russo & Starobinas, 1991; Starobinas et al., 1991; Silva et al., 1991, 1995; Truyens et al., 1994; Zhang & Tarleton 1996; Laucella et al., 1996). Todas são detectáveis, aumentam rapidamente, geralmente precedem de uma semana o aumento da parasitemia, elevam-se cerca de dez vezes mais que o normal entre o 14^o e o 17^o dias, a depender do inóculo utilizado, e decaem posteriormente para valores três a cinco vezes os iniciais, normalizando-se após quarenta dias de infecção. A produção de TNF- α por camundongos C57BL/6 pode ser induzida mesmo utilizando-se parasitas fixados como estímulo (Tarleton, 1988). Os níveis de parasitemia não necessariamente se correlacionam com o nível de produção de TNF- α (Russo et al., 1989). Além disso, a susceptibilidade de uma linhagem a um certo isolado de *T. cruzi* parece ser o resultado do conjunto de interações que ocorrem via rede de citocinas, e não do efeito isolado de uma delas, pois em diferentes combinações camundongo/parasita são detectadas produções de todas as citocinas citadas, com pequenas variações de cinética (Zhang & Tarleton, 1996).

A produção de IFN- γ , TNF- α , IL-1- α e IL-6 por camundongos Balb/C infectados com duas diferentes cepas de *T. cruzi* (Tulahuen e CA-1) foi estudada, tanto no baço, como no coração (Laucella et al., 1996). O interessante é que no coração há intenso aumento da produção de todas as citocinas testadas, que em alguns casos chega a ser maior do que no baço. Estes autores também analisaram os níveis da molécula de adesão ICAM-1e mostraram que, como previsto pela presença de citocinas inflamatórias, foi possível a detecção de níveis elevados de ICAM-1 solúvel, bem como de expressão aumentada de ICAM-1na superfície de células. Essa molécula é fundamental para o extravasamento de células inflamatórias nos sítios de lesão, mediando o reconhecimento dos leucócitos com o endotélio pela interação de ICAM-1 com a integrina LFA-1.

4.1.3.2 Ativação inespecífica de macrófagos

Os macrófagos têm um papel essencial nas infecções. Secretam uma vasta gama de mediadores químicos e de citocinas que podem regular a resposta T emergente (funções endócrinas e parácrinas). Adquirem, processam e apresentam antígenos para células T e B, e são uma fonte de moléculas co-estimulatórias para a ativação dessas células. Uma vez sensibilizados (“primados”) por citocinas, eles podem se desenvolver em células ativadas para uma atividade efetora citotóxica deflagrada por citocinas (como IFN- γ e TNF- α) ou outros co-sinais, como LPS ou produtos do alvo. Secretam então muitos produtos com atividade microbicida (metabólitos reativos de nitrogênio e de oxigênio, lisozimas e citocinas citotóxicas como TNF- α), efetivos a depender da susceptibilidade do alvo.

Um trabalho clássico de Hoff, em 1975, mostrou a cinética de ativação de macrófagos *in vivo*, em camundongos C3H infectados com *T. cruzi*. Os macrófagos peritoneais se tornavam resistentes à infecção *in vitro* apenas 21 dias após a infecção, no final da fase ascendente da parasitemia. Mostrou também que as curvas de parasitemia dos animais infectados não se modificavam em indivíduos imunizados com BCG ou com *Listeria monocytogenes*, mas eram reduzidas em animais previamente imunizados com formas epimastigotas de *T. cruzi*. No ano seguinte, Brener & Cardoso (1976) mostraram que a imunização com *Corynebacterium parvum* reduzia a parasitemia e retardava a mortalidade de camundongos inoculados com altas doses de *T. cruzi*. Em 1977 uma série de trabalhos de Nogueira (Nogueira et al., 1977a,b) mostraram que tanto a imunização com epimastigotas como com BCG pode ativar macrófagos a exercerem atividade fagocítica e citotóxica contra *T. cruzi in vitro*, e que nesses casos já na primeira semana pós-infecção era possível detectar a ativação dos macrófagos. *Portanto, se a ativação inespecífica de macrófagos pelo BCG for eficiente, pode contribuir para a resistência à infecção.*

A julgar pelo aumento da expressão de moléculas de MHC classe II, *a cinética de ativação de macrófagos depende do número de parasitas inoculados e da via de inoculação*. A porcentagem de macrófagos Ia+ aumenta de três para cem em oito dias após um inóculo intraperitoneal de 10^5 parasitas, mas apenas após 12 dias com o mesmo inóculo intradérmico, e após 28 dias com um inóculo ID de 10^2 parasitas (Behbehani et al., 1981). O curso temporal da ativação de macrófagos *in vivo* acompanha o aumento nos níveis IFN- γ , a principal citocina responsável pela ativação. Outras citocinas como GM-CSF, M-CSF e TNF- α também podem contribuir sinergicamente ao efeito do IFN- γ . Estudos mais recentes mostraram que as citocinas IFN- γ , e TNF- α são as principais mediadoras dessa ativação de macrófagos (ver Capítulo 4.4) e que IFN- γ e IL-12 compõem um sistema autócrino de *feed-back* positivo que amplifica os níveis de IFN- γ para ativação de macrófagos e de IL-12 para produção e ativação de células NK e Th1.

4.1.3.3 A resposta de fase aguda

A resposta de fase aguda é o nome dado para um padrão característico de alterações metabólicas que ocorrem em resposta a diferentes formas de infecção, inflamação ou danos tissulares (Koj, 1984). Estas mudanças metabólicas incluem leucocitose, diminuição da concentração plasmática de zinco e ferro, aumento da concentração de cobre, aumento do catabolismo protéico e gliconeogênese, aumento da síntese protéica total e febre, entre outros. Os níveis de complemento aumentam (Scharfstein et al., 1982), mas animais deficientes no componente C5 do complemento desenvolvem curso normal de parasitemia e apresentam níveis similares de mortalidade a animais com o sistema complemento funcionando (Dalmasso & Jarvinen, 1980). Além disso, tripomastigotas são resistentes à ativação direta da via alternada do complemento, por possuírem molécula com atividade similar que apresenta *decay accelerating factor* humano (DAF, CD55) (Norris et al., 1991). O complemento pode também ser ativado por pentraxinas, como CRP, ou por colectinas, como *mannose-binding protein* (MBP). No entanto o *T. cruzi* apresenta um antígeno de superfície que mimetiza CRP humana, a julgar pela capacidade de interagir com anticorpos poli- e monoclonais anti CRP humana (Coutinho et al., 1998), que pode também contribuir para o escape do parasita aos efeitos do sistema complemento. Quanto à possível participação da MBP, que reconhece padrões de manoses comumente

expostos na superfície dos microorganismos, ela não reconhece formas tripomastigotas, contribuindo, desse modo, possivelmente, para o escape à lise por complemento na fase inicial da infecção (Kahn et al., 1995). Já as formas amastigotas se ligam à MBP, através de glicoproteínas de superfície, da família SA85 (Kahn et al., 1996).

Durante a inflamação, há um grupo bem definido de proteínas, conhecidas como proteínas de fase aguda, cujos níveis plasmáticos aumentam. Entre elas temos: (a) proteína C reativa (CRP), que funciona como uma opsonina não específica para aumentar a fagocitose de bactérias; (b) α -2-macroglobulina (A2M) e outros inibidores de proteases; (c) proteína fibrinogênio da coagulação; (d) proteína amilóide do soro (SAP); (e) haptoglobina; (f) fibronectina solúvel (Fn). A maioria das alterações nas concentrações plasmáticas pode ser diretamente atribuída a alterações nos níveis de síntese dessas proteínas plasmáticas por hepatócitos, que por sua vez são regulados primariamente por IL-1 /TNF- α e por IL-6.

Até o presente, pouco se sabe a respeito do papel dos elementos da resposta de fase aguda na doença de Chagas. Do conjunto de proteínas de fase aguda apenas três foram estudadas em camundongos: SAP, A2M e Fn.

A SAP aumenta drasticamente no plasma de camundongos C57BL/6, em paralelo ao aumento da parasitemia, dependendo do inóculo utilizado (Scharfstein et al., 1982; Luz et al., 1994). Já em camundongos C3H seus níveis não se alteram em resposta à infecção (Luz et al., 1994), e em camundongos Balb/C aumentam, mas muito menos do que em C57BL/6 (Luz et al., 1994; Truyens et al., 1994). Crianças na fase aguda da doença de Chagas também apresentam uma resposta heterogênea quanto à elevação de CRP (o homólogo da SAP de camundongos), com predomínio de aumento (Medrano-Mercado et al., 1996a). Sabe-se que a CRP ativa complemento, atua como um opsonizante e ativa macrófagos e neutrófilos (revisto em Steel & Whitehead, 1994). Os componentes C3 e C4 do complemento também aumentam na fase aguda da infecção experimental (Scharfstein et al., 1982).

Tanto camundongos como crianças infectadas apresentaram níveis elevados de α -macroglobulinas, inibidores fisiológicos de proteinases, durante a fase aguda (Luz et al., 1994, 1995; Medrano-Mercado et al., 1996a,b). O aumento do nível de A2M é mais significativo nas crianças assintomáticas do que naquelas sintomáticas, que se encontravam hospitalizadas no momento da colheita do soro (Medrano-Mercado et al., 1996b). Camundongos Balb/C que sobreviveram à infecção aguda apresentaram níveis mais elevados de A2M plasmática comparável àqueles que morreram (Araújo-Jorge et al., 1992b). No entanto, tal como para SAP também é grande a heterogeneidade observada nos animais e em humanos quanto à elevação dos níveis de A2M (Luz et al., 1994, 1995; Medrano-Mercado et al., 1996b). Como é conhecido o envolvimento de proteinases de *T. cruzi* em eventos moleculares ligados à sua interação com células hospedeiras (revisto em Araújo-Jorge et al., 1992a), o efeito de A2M nesse processo foi estudado *in vitro* e mostrou-se que A2M pode inibir a invasão de macrófagos e fibroblastos por parasitas das cepas Y, Colombiana e CL, possivelmente devido à sua ação inibidora sobre proteinases. Além disso, a pré-incubação de macrófagos peritoneais residentes com A2M resulta em um aumento na endocitose e na destruição celular de tripomastigotas da cepa Y. Um papel potencialmente importante e ainda pouco explorado da AM é sua atividade como carreadora de citocinas (revisto em Borth, 1992 e em Legrés et al., 1994). Esta ligação resulta na redução de atividade dessas citocinas, ou no aumento de sua meia-vida. A2M liga-se a TGF- β , TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-6.

Finalmente, foi demonstrado que também a Fn apresenta níveis ligeiramente elevados na fase aguda da infecção experimental (Truyens et al., 1995), resultado encontrado também em crianças chagásicas na fase aguda (Antas, 1996). Em ambos os casos foi mostrado que há elevação dos níveis de anticorpos anti Fn. Estudos *in vitro* sugerem que Fn tenha papel como adjuvante na penetração do parasita nas células do hospedeiro vertebrado (Wirth & Kierszenbaum, 1984; Ouaiissi et al., 1985), e que anticorpos anti Fn podem ter efeito “protetor” na infecção (Ouaiissi 1988). Apesar desse conjunto de dados, ainda não foi esclarecido o real papel que essas proteínas de fase aguda apresentam *in vivo* na infecção.

4.1.4 Atividade de Células NK e de Células T $\gamma\delta$

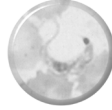
Quando ativadas, as células NK cumprem duas funções primordiais: sintetizar IFN- γ e lisar alvos reconhecidos por seus receptores. Um dos sistemas de ativação das células NK é a interação. Na década de 80 foi observado um aumento de atividade NK no baço de animais C57BL/6 e C3H infectados experimentalmente (Hatcher et al., 1981), bem como a indução de atividade citotóxica em macrófagos peritoneais. Essa atividade pode ser verificada tanto utilizando-se parasitas vivos como mortos por calor. Com base em seus resultados, os autores discutiram que não havia indícios de que células NK desempenhassem um papel direto na proteção durante a infecção por *T. cruzi*. A administração de indutores da atividade NK, como o ácido poliinosino-citidílico (Hatcher & Kuhn, 1982), gera células NK com atividade tripanocida. Do mesmo modo, a administração de tilerone (James et al., 1982), indutor de atividade NK, aumenta a resistência à infecção. No entanto, o papel-chave das células NK como secretoras de IFN- γ e participantes da resistência do hospedeiro à infecção por *T. cruzi* foi recentemente demonstrado (Silva et al., 1995), especialmente quando da sua depleção *in vivo* por anticorpos anti NK (ver item 4.4).

Já a subpopulação de linfócitos T $\gamma\delta$ pode ser ativada por antígenos contendo prenil-pirofosfato (componentes de membranas de microorganismos envolvidos na ligação de carboidratos), e não precisam de processamento intracelular ou de associação com produtos MHC. Secretam IFN- γ e TNF α e induzem a diferenciação de células Th1. Seu número aumenta bastante durante a infecção (Minoprio et al., 1989). Essas células podem modular a parasitemia em certos modelos (Cardillo et al., 1993) e a inflamação característica da miocardite aguda (Santos-Lima & Minoprio, 1996).

4.1.5 Regulação da Resposta Imune Inata

Há muitas evidências de que a resposta imune inata se auto-regula, reduzindo a ativação de macrófagos e a produção local de óxido nítrico (NO). Em excesso, altos níveis de TNF- α , de IFN- γ e de NO podem ser extremamente prejudiciais ao próprio hospedeiro (Hunter et al., 1997; Meyer zum Buschenfelde et al., 1998). Assim, nas situações experimentais de resolução da fase aguda, tanto a resposta imune adquirida, específica anti *T. cruzi*, como o controle da ativação da resposta inata têm um papel decisivo (ver item 4.3). As citocinas responsáveis por essa “desativação” são IL-10 e TGF- β , cuja síntese aumenta. IL-10 começa a ser detectada três semanas após a infecção em Balb/c, tanto com cepa virulenta como atenuada de *T. cruzi* (Revelli et al., 1999) e apresenta maiores níveis séricos, justamente no modelo mais resistente, sem lesão tissular. A produção de IL-10 é necessária para controlar os efeitos inflamatórios letais de citocinas tipo 1 produzidas durante a infecção (Hunter et al., 1997) e camundongos resistentes apresentam maior produção de IL-10 quando comparados com susceptíveis (Zhang & Tarleton, 1996). O declínio da síntese de TNF- α , NO e IL-13, medidos por detecção do mRNA por RT-PCR no tecido cardíaco (Powell et al., 1998) é mais rápido num modelo experimental resistente do que num susceptível à infecção.

Esse conjunto de evidências e estudos são claros indicativos de que a resposta imune inata é ativa durante a infecção por *T. cruzi*, colabora para o estabelecimento da resposta imune específica e, dependendo da regulação homeostática de seus componentes efetores, pode ser decisiva para o estabelecimento de resistência ou susceptibilidade à fase aguda, bem como ao desenvolvimento posterior de patologia associada à fase crônica da infecção.



4.2

A Resposta Imune Celular na Infecção Experimental por *Trypanosoma cruzi*

George A. Dos Reis

A infecção experimental de camundongos por *Trypanosoma cruzi* induz a uma série de alterações no sistema imune: imunossupressão, ativação policlonal linfocitária e hiperprodução de imunoglobulinas (Igs), além de resultar na persistência indefinida do parasita nos tecidos do hospedeiro e na lesão dos tecidos nervoso e cardíaco (revisto em Brener, 1994 e em Dos Reis & Lopes, 1999). Estas características em muitos aspectos mimetizam a infecção humana conhecida como doença de Chagas ou tripanosomíase americana. O camundongo constitui o principal modelo experimental disponível para o estudo dos mecanismos patogênicos e imunoprotetores relacionados à infecção chagásica, com a ressalva de que será sempre necessário verificar a validade das observações descritas através da sua ocorrência em humanos infectados. A discussão aqui apresentada não tenciona rever os dados já publicados, mas sim discutir alguns aspectos controversos sobre o tema que permanecem por ser esclarecidos.

4.2.1 A Resposta Imune: Proteção e Lesão

Como outros microorganismos patogênicos intracelulares, o *T. cruzi* é capaz de infectar o hospedeiro mamífero vertebrado, resistindo indefinidamente ao ataque da resposta imune. Esta no entanto, após um período de imunossupressão e ativação policlonal generalizada, torna-se capaz de controlar o nível de parasitismo nos tecidos. Segundo a tendência atual mais aceita, é o controle imunológico da carga parasitária nos tecidos que gera mecanismos de lesão tecidual progressiva (Tarleton, 1995). No entanto, não está descartado que mecanismos imunológicos de auto-reconhecimento disparados pelo processo infeccioso também possam ter um papel adicional na patogênese das lesões observadas (Ribeiro dos Santos et al., 1992). O nível de conhecimento obtido sobre a imunidade celular contra o parasita, apesar de sofisticado em alguns casos, é descritivo. Os mecanismos de persistência do *T. cruzi*, e a natureza das alterações imunológicas que permitem esta persistência são amplamente ignorados, devido às limitações do conhecimento atual sobre imunorregulação.

Diferentes grupos de pesquisa, utilizando diferentes isolados de *T. cruzi* e diferentes linhagens isogênicas de camundongo, estão estudando aspectos da imunidade inata e da imunidade adquirida contra o parasita, geralmente baseados na produção de diferentes citocinas regulatórias da resposta imune. Numerosas evidências recentes indicam um papel importante da imunidade inata, não só como primeira linha de defesa do hospedeiro, mas também no direcionamento instrutivo da qualidade da resposta imune adquirida subsequente (Fearon & Locksley, 1996). Vários estudos demonstraram um importante papel de células NK (*natural killer*) na defesa inicial contra a infecção por *T. cruzi* (Cardillo et al., 1996), cuja função protetora está ligada

à produção da citocina IFN- γ por estas células. Esta citocina tem um papel protetor inicial na infecção chagásica (Reed, 1988), presumivelmente devido à sua capacidade de ativar a produção de metabólitos do óxido nítrico (NO), com atividade tripanocida em macrófagos infectados (Gazzinelli et al., 1992). Por outro lado, a ativação intensa de células NK parece dependente da produção da citocina IL-12, além de TNF- α , por macrófagos infectados pelo *T. cruzi* (Aliberti et al., 1996). Já foi amplamente demonstrado que a produção local de IL-12 e IFN- γ por mecanismos inatos de defesa facilita a indução subsequente de células T CD4 específicas para antígeno com o fenótipo secretório de células Th1. Esta deve ser a razão pela qual uma onda de ativação de células Th1 ocorre primeiro na infecção chagásica, predominando no início da fase aguda (Zhang & Tarleton, 1996).

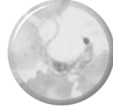
Ainda durante a resposta imune inata, ocorre produção das citocinas regulatórias IL-10 (Reed et al., 1994) e TGF- β (Silva et al., 1992), com uma cinética mais retardada em relação ao IFN- γ . Estas citocinas, entre outros mecanismos, antagonizam a ação ativatória do IFN- γ ao nível da resposta dos macrófagos teciduais a esta citocina. Tanto macrófagos (Reed et al., 1994) como células B CD5 (Minoprio et al., 1993) podem produzir IL-10, e é possível que esta produção seja necessária para minimizar os efeitos tóxicos causados por uma grande produção das citocinas inflamatórias IL-12 e IFN- γ . As células B CD5 correspondem a uma subpopulação “primitiva” de linfócitos B, com algumas características semelhantes a macrófagos, apesar de reorganizarem os genes de Ig (Hardy et al., 1994). As Igs formadas reconhecem, em geral, determinantes antigênicos localizados em antígenos polissacarídicos únicos de microorganismos, e a ativação destas células requer citocinas que podem aparentemente ser supridas por células NK como células auxiliaadoras (Snapper & Mond, 1996). A maior resistência de animais deficientes de células B CD5 à infecção chagásica foi atribuída a uma maior produção de IFN- γ e à reduzida produção de IL-10 neste caso (Minoprio et al., 1993). Também as células T $\gamma\delta$, uma linha de defesa intermediária entre a resposta inata e a adquirida, e que reconhecem um grupo restrito de determinantes antigênicos comuns a vários microorganismos, podem modular a parasitemia e o grau de lesão tecidual na infecção chagásica (Cardillo et al., 1993).

A resposta imune inata tem um papel inicial importante na defesa anti *T. cruzi*, controlando parcialmente a infecção. Animais geneticamente deficientes de respostas adquiridas (animais RAG *knockout* cujos linfócitos não fazem rearranjo gênico) controlam a infecção tão bem como animais normais durante a primeira semana de infecção, perdendo, a seguir, o controle da parasitemia, enquanto animais normais conseguem resolvê-la (Abrahamsohn & Coffman, 1996). A resposta imune adquirida, mediada por linfócitos T CD4 e CD8 convencionais (TCR $\alpha\beta$) e pelos anticorpos produzidos por células B convencionais, é absolutamente essencial para o controle da parasitemia e para a sobrevivência do hospedeiro. Estes dados foram obtidos infectando-se camundongos deficientes na expressão de moléculas de histocompatibilidade classe I ou classe II, deficientes em células T CD8 ou CD4 maduras, respectivamente (Tarleton et al., 1992; Rottenberg et al., 1993). Os animais são altamente susceptíveis à morte pela infecção. Existe ainda uma correlação entre o grau de lesão tecidual e a imunocompetência do hospedeiro na fase aguda. Os animais deficientes em células T CD8 ou CD4 apresentam alta carga parasitária nos tecidos, mas pouca ou nenhuma lesão tecidual (Tarleton et al., 1992, 1995). Estes dados sugerem que a lesão tecidual é consequência inescapável do processo de controle do parasitismo tecidual por linfócitos efetores competentes (Tarleton, 1995). A necessidade de células T CD4 na defesa poderia estar relacionada com a ativação imunológica de macrófagos infectados e com a destruição intracelular de parasitas por células do tipo Th1, produtoras de IFN- γ e, no caso de células Th2, com a indução da produção de anticorpos líticos protetores (Brenner, 1986). Um estudo recente demonstrou a existência de uma onda de atividade Th1 na infecção chagásica que posteriormente se extingue, dando lugar a uma onda de atividade Th2 que persiste durante a infecção crônica (Zhang & Tarleton, 1996). O mecanismo de inativação das células Th1 não está claro, podendo derivar da indução de anergia clonal ou de morte celular programada. Por último, a necessidade de células T CD8 na defesa deve estar relacionada com a capacidade do parasita de infectar qualquer tipo celular do hospedeiro, incluindo células que não expressam MHC classe II, apenas MHC classe I. Neste caso, a defesa anti *T. cruzi* deve estar relacionada com a atividade citotóxica de efetores do tipo T CD8. No entanto, o estudo deste importante

aspecto da resposta imune celular tem sido prejudicado pela inexplicável dificuldade de se demonstrar e isolar células T CD8 citotóxicas específicas para antígenos do parasita. Foi demonstrado que células T CD8 da infecção chagásica sofrem um processo de morte celular por apoptose espontânea quando explantadas imediatamente de animais infectados (Lopes et al., 1995), o que poderia ter relação com a dificuldade de isolar células funcionais viáveis nesta infecção.

Vários estudos identificaram a presença de uma etapa de imunossupressão generalizada *in vitro* de linfócitos T (Harel-Bellan et al., 1985) e foi sugerido que esta etapa é crítica para o escape e persistência do parasita nos tecidos (Kierszenbaum, 1981). Estudos recentes apontam para dois mecanismos distintos de imunossupressão: um mediado por produtos de macrófagos ativadas, e outro mediado por um programa de morte programada induzida por ativação pelo TCR da célula T. Confirmando estudos anteriores, uma investigação recente identificou um mecanismo de supressão de células T CD4 na infecção aguda por *T. cruzi* mediado por células aderentes/macrófagos (Abrahamshon & Coffman, 1995). Neste trabalho, contudo, foi demonstrado que após ativação linfocitária, a produção exacerbada de IFN- γ levou também à produção de radicais de NO por macrófagos, que inibiram a proliferação celular de linfócitos T (Abrahamshon & Coffman, 1995). Portanto, este mecanismo resulta de respostas Th1 exacerbadas que culminam com a produção de mediadores tóxicos por macrófagos ativados. Utilizando um modelo de infecção de baixa virulência, com formas metacíclicas de *T. cruzi*, outros estudos identificaram um defeito intrínseco na ativação de células T CD4 via o receptor antigênico (TCR), mas não através da via alternativa de ativação mediada pelo antígeno CD69 (Lopes & Dos Reis, 1994, 1996). Neste modelo, não se encontrou evidência de anergia nas células T (Lopes & Dos Reis, 1996), mas o defeito intrínseco foi identificado como morte programada induzida por ativação, levando à apoptose linfocitária (Lopes et al., 1995). Neste estudo, células T CD8 morriam espontaneamente por privação de fatores (exaustão clonal?), mas não morriam após ativação (Lopes et al., 1995). A morte por ativação de células T CD4 parece ser um fenômeno imunorregulatório decorrente da extensa ativação policlonal, e causa supressão das respostas proliferativas *in vitro*, estando ausente quando a ativação se processa por vias alternativas como CD69 e Ly-6 (Lopes & Dos Reis, 1996). Em conjunto, estes estudos indicam a operação de mecanismos supressores distintos, possivelmente atuando em fases distintas da infecção. A imunorregulação de células T CD8 na infecção permanece pouco entendida.

Os dados discutidos aqui revelam um avanço significativo na compreensão da patogênese da infecção chagásica. No entanto, as várias lacunas existentes ainda não permitem estabelecer com clareza as anomalias imunológicas que resultam na cronificação da infecção. Animais geneticamente alterados em determinadas vias moleculares de regulação imunológica (como citocinas, receptores sinalizadores de apoptose e proteínas protetoras contra a exaustão clonal) serão ferramentas importantes para dissecar estes processos *in vivo*. Também faltam modelos adequados para definir os mecanismos imunopatogênicos de lesão do tecido cardíaco, e resolver se esta é primariamente causada pela presença do parasita, ou por linfócitos T auto-reativos, sensibilizados durante o processo agudo de ativação policlonal. Uma última fronteira pouco explorada é a identificação de moléculas e mecanismos utilizados pelo parasita para subverter local e sistemicamente a imunidade celular. Nesta linha situam-se os trabalhos recentes de identificação do TIF (fator imunossupressor de tripomastigotas) (Majunder & Kierszenbaum, 1996), e do glicoinositol fosfolípídeo (GIPL) de *T. cruzi* (Gomes et al., 1996) como moléculas capazes de bloquear respostas imunes celulares do hospedeiro.



4.3

A Resposta Imune Humoral e As Funções do Linfócito B na Infecção por *Trypanosoma cruzi*

Maria Teresa Rivera

A forma aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* se caracteriza por uma intensa multiplicação parasitária. A parasitemia aumenta rapidamente, associada à morte de um certo número de indivíduos. Naqueles que sobrevivem, o controle da infecção se traduz por uma diminuição progressiva da parasitemia, que se tornará praticamente indetectável na forma crônica da infecção. Os parasitos circulantes não são eliminados completamente, apesar de o hospedeiro parasitado na fase crônica ter se tornado resistente a uma nova infecção.

A infecção por *T. cruzi* apresenta, assim, o paradoxo encontrado freqüentemente nas relações parasita-hospedeiro, ou seja, a persistência de uma população parasitária no hospedeiro imune. Além disso, a infecção acarreta uma desregulação do sistema imune, com uma ativação policlonal dos linfócitos B e T, um certo grau de hipergamaglobulinemia e um estado de imunossupressão, que são, provavelmente em parte, a origem da patologia da doença de Chagas.

4.3.1 A Ativação Policlonal dos Linfócitos B

No camundongo infectado pelo *T. cruzi* ocorre logo uma ativação policlonal de células B na fase aguda, que persiste na fase crônica (D'Imperio Lima et al., 1985, 1986; Minoprio et al., 1986a). Esta ativação causa uma hipergamaglobulinemia poliisotípica importante e reversível, sendo caracterizada por um aumento considerável de imunoglobulinas e uma resposta específica ao parasita, que também é poliisotípica e estável. Nesta resposta se detectam altas concentrações de IgG2a e IgG2b entre os anticorpos anti *T. cruzi*, e IgG2a entre os anticorpos inespecíficos (Spinella et al., 1992; El Bouhdidi et al., 1994), podendo esse isotipo atingir 50% das imunoglobulinas totais do soro (Hontebeyrie-Joskowicz, 1994). Esta ativação policlonal foi bem demonstrada no modelo murino da doença de Chagas, porém na infecção humana ainda não está totalmente estabelecida (Kierszenbaum & Szein, 1994). Existem, no entanto, os seguintes relatos indicativos de sua ocorrência em humanos: (1) num caso de infecção acidental em laboratório foi estudado o curso da produção de imunoglobulinas específicas anti *T. cruzi*, bem como de imunoglobulinas dirigidas para auto-antígenos (Grauert et al., 1993); foi demonstrada hipergamaglobulinemia precoce desde 17 até 66 dias (máxima em trinta dias) após a infecção, quando a parasitemia se tornou subpatente, de IgM e IgG, de caráter poliisotípico (IgA, IgM e IgG), e também com elevados níveis de auto-anticorpos IgM e das subclasses de IgG; (2) foi demonstrado que pacientes chagásicos crônicos apresentam na circulação uma alta freqüência de células ativadas (Dutra et al., 1994), tanto B como T, características de condições patológicas com respostas auto-ímmunes, hiperímmunes e policlonais, e que esta ativação se mantém mesmo após a cura

parasitológica (Dutra et al., 1996). Recentemente foi identificado um antígeno de *T. cruzi* de 24 kDa com capacidade de ativação policlonal de células B (Silva et al., 1998), que utilizada para sorologia em ELISA correlaciona-se aos resultados obtidos com o método de detecção de anticorpos líticos (Krautz et al., 1994; Taibi et al., 1995).

4.3.2 A Função das Células B CD5

As células B CD5 constituem uma população de linfócitos B, presentes principalmente durante a vida fetal, que participam da seleção dos linfócitos maduros (Minoprio et al., 1989). Estas células aumentam consideravelmente durante a infecção por *T. cruzi*, e assim poderiam estar implicadas nas reações auto-imunes associadas à doença de Chagas (Minoprio, 1991). Em pacientes crônicos também foi demonstrada alta frequência de células B CD5 (Dutra et al., 1996). Camundongos geneticamente deficientes em linfócitos B CD5 (mutação Xid) controlam a parasitemia de modo mais eficaz, não apresentando alterações no estado geral (caquexia) e desenvolvendo somente poucas lesões inflamatórias no início da fase crônica da infecção. Além disso, produzem níveis menores de imunoglobulinas tanto não específicas (policlonais) como anticorpos específicos anti *T. cruzi* (dez vezes menores do que nos animais sem mutação) (Minoprio et al., 1993). Estas informações sugerem que as células B CD5 estão implicadas na maturação das células B seja diretamente, ou aumentando a atividade dos linfócitos CD4 Th2; no camundongo Xid, a deficiência em linfócitos B CD5 poderia produzir uma inibição das células CD4 Th2 e uma ativação das células CD4 Th1 (Hontebeyrie-Joskowics, 1991), aumentando assim a resistência à infecção por *T. cruzi*. Em conclusão, as células B CD5 permitiriam uma forte ativação das células B convencionais com uma produção dos isotipos IgG2a e IgG2b, acarretando lesões inflamatórias e auto-imunes associadas com a doença de Chagas (Minoprio et al., 1991).

4.3.3 A Produção dos Anticorpos Específicos anti *T. cruzi*

A investigação de anticorpos anti *T. cruzi* por meio de diferentes técnicas é a base do diagnóstico imunológico da doença de Chagas (Brenière et al., 1985; Carlier et al., 1985; Brener & Krettlí 1990; Tanowitz et al., 1992). Na infecção experimental, a resposta específica é poliisotípica com um predomínio dos anticorpos IgG2a, IgG2b e IgM (Spinella et al., 1992; El Bouhdidi et al., 1994).

Um trabalho clássico no estudo dos mecanismos humorais de proteção demonstrou que, associados ao estado de proteção do hospedeiro, estavam apenas os anticorpos reativos contra formas vivas de tripomastigotas (e não formas fixadas ou extratos e frações celulares), que podiam mediar nestas a lise por complemento (Krettlí & Brener, 1982). Essa linha de investigação firmou o conceito de anticorpos anti *T. cruzi* líticos, reativos apenas contra formas vivas do parasita, e que decaem quando ocorre cura parasitológica após terapia tripanocida (e proposto como critério de cura parasitológica), e anticorpos anti *T. cruzi* convencionais, capturáveis com antígenos de parasitas fixados, extratos ou frações. Um polipeptídeo de 160 kDa da superfície dos tripomastigotas foi identificado como alvo para os anticorpos protetivos (Martins et al., 1985), e posteriormente foi clonado um antígeno de 160 kDa (gp160) que é capaz de induzir a síntese de anticorpos líticos e que apresenta homologia com o DAF (CD55) humano (Norris et al., 1991).

O papel protetor dos anticorpos foi bem estudado no modelo camundongo (Kagan & Norman, 1961; Kierszenbaum & Howard, 1976). Estes anticorpos aparecem a partir da terceira semana de infecção (Krettlí & Brener, 1976) e participam da eliminação dos parasitas circulantes (Kipnis et al., 1981; Umekita et al., 1988).

Diferentes experiências evidenciam sua função protetora:

- a parasitemia e a mortalidade são muito mais elevadas em camundongos que são, geneticamente, maus produtores de anticorpos do que naqueles bom produtores (Kierszenbaum & Howard, 1976; Brener & Krettli, 1990);
- a pré-incubação de tripomastigotas com um soro de forma crônica diminui sua infectividade (MacHardy, 1977);
- a depleção de linfócitos B por injeção de anticorpos torna os animais mais susceptíveis à infecção (Okabe et al., 1980);
- a transmissão passiva de soros imunes ou de imunoglobulinas purificadas provenientes de animais na fase crônica protegem os camundongos contra uma infecção letal (Scott & Goss-Sampson, 1984; Brener 1986);
- por outro lado, níveis elevados de infecção são obtidos em animais sem células B; a transferência de células imunes do baço sem linfócitos B, não induz a uma proteção nestes animais (Scott, 1981).

A proteção depende da porção Fc dos anticorpos (Umekita et al., 1988), e mais especificamente dos isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b, que aumentam a eliminação dos parasitos circulantes (Takehara et al., 1981; Brodskyn et al., 1988, 1989).

Diferentes mecanismos dependentes de anticorpos podem contribuir para a eliminação de tripomastigotas extracelulares:

- sua aglutinação com soros imunes específicos diminui sua infectividade (Krettli & Brener 1976; Brener & Krettli, 1990);
- a infecção de células não fagocíticas (como células miocárdicas e fibroblastos) pode ser inibida por anticorpos (Wirth & Kierszenbaum, 1988);
- anticorpos capazes de reconhecer um epítipo galactosil- α -1-3galactose presente na superfície da forma tripomastigota de *T. cruzi* destroem os parasitas, participando assim na diminuição da parasitemia das formas aguda e crônica da infecção (Gazinelli & Brener, 1991; Gazinelli et al., 1991);
- esta lise pode também ser mediada pela via clássica ou alternativa do complemento (Krettli et al., 1979), não necessariamente pela porção Fc dos anticorpos, mas sim pelo bloqueio que estes possam ter sobre o inibidor da C3 convertase presente na superfície de tripomastigotas circulantes (Joiner et al., 1988; Norris et al., 1994);
- a opsonização dos parasitas por anticorpos pode contribuir para sua eliminação através de mecanismos de ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpos). Diferentes populações celulares apresentam receptores FcR na sua superfície, como eosinófilos (Sanderson et al., 1977), macrófagos (Okabe et al., 1980) e mastócitos (Tambourgi et al., 1989), podendo assim contribuir para a eliminação dos parasitas.

A expressão dos Fc γ RII/III de baixa afinidade está aumentada nas células de camundongos infectados (Araújo-Jorge et al., 1993). Mesmo assim, os parasitas opsonizados por anticorpos são mais facilmente fagocitados e lisados por macrófagos. A atividade tripanocida dos macrófagos resulta de sua ativação por certas citocinas liberadas por linfócitos T sensibilizados (Nogueira et al., 1981), como o IFN- γ , cuja função foi claramente demonstrada *in vitro* e *in vivo* (Golden & Tarleton, 1991). Outras citocinas podem entrar em sinergia com IFN- γ e contribuir para uma maior ativação dos macrófagos. Este é o caso de TNF- α , produzido pelos próprios macrófagos durante a infecção por *T. cruzi* (Tarleton, 1988), e que também tem uma função protetora demonstrada *in vitro* e *in vivo* (De Titto et al., 1986; Starobinas et al., 1991).

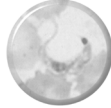
IL-1, GM-CSF e IL-3 parecem possuir também uma ação sobre a ativação de macrófagos, porém inferior a de IFN- γ e TNF- α (Reed, 1998). Além disso, a IL-1 complementada com a IL-2, estimula também a função das células T helper, participando deste modo na resposta imune dos linfócitos B (Reed et al., 1989).

4.3.4 Diagnóstico Imunológico da Doença de Chagas

A detecção de anticorpos anti *T. cruzi* é um instrumento muito importante, sobretudo no diagnóstico e na avaliação da forma crônica da infecção (Ferreira, 1992). Extratos antigênicos do parasita preparados a partir de formas epimastigotas de cultivo ou de tripomastigotas obtidos por cultivo celular, são utilizados em diferentes reações sorológicas como fixação do complemento (reação de Machado-Guerreiro), hemaglutinação, imunoprecipitação, imunofluorescência e ELISA (Carlier et al., 1985; Brenière et al., 1987). Estas técnicas permitem o diagnóstico de infecções crônicas em 95 a 99% dos casos. Além do diagnóstico clínico, estes métodos são utilizados no controle de doadores em bancos de sangue e em estudos epidemiológicos.

O problema ocasionado por reações falso-positivas levou ao desenvolvimento de técnicas de diagnóstico sorológico muito mais específicas. A utilização de antígenos purificados específicos para *T. cruzi*, ou de anticorpos monoclonais permitem eliminar as reações cruzadas devido a outros tripanosomatídeos encontrados na América Latina (*Leishmania* e *T. rangeli*) (Dragon et al., 1985; Lemesre et al., 1986; Martin et al., 1990; Paranhos-Bacalla et al., 1994). Também graças à detecção de anticorpos antiidiotípicos específicos para *T. cruzi*, pode-se diferenciar pacientes crônicos assintomáticos daqueles que apresentam doença crônica grave (D'Avila Reis et al., 1993b). A detecção de anticorpos que inibem a atividade da enzima transialidase de *T. cruzi* permite avaliar a infecção crônica e a congênita. Tal como os anticorpos líticos, estes anticorpos neutralizantes podem servir também como marcadores de remissão no acompanhamento de pacientes submetidos a quimioterapia (Leguizamón et al., 1994). Porém, uma resposta humoral específica contra um extrato total de *T. cruzi* e contra o peptídeo R-13 (derivado da proteína ribossomal P do parasita) mostra que os anticorpos anti R-13 permitem diferenciar formas da patologia chagásica: estes anticorpos se apresentaram em grande proporção em pacientes chagásicos cardíacos e ausentes em outros pacientes que apresentavam formas digestivas desta enfermidade; respostas positivas anti-R-13 também foram detectadas em recém-natos infectados por via congênita (Aznar et al., 1995).

A detecção de anticorpos líticos, que foi classicamente feita pelo teste de lise mediado por complemento (Krettli & Brener 1982), está sendo aprimorada. Já foram descritos métodos de citometria de fluxo (Martins-Filho et al., 1995) e de ELISA (Krautz et al., 1994; Taibi et al., 1995), utilizando respectivamente tripomastigotas de cultura de células como agente de captura, ou antígenos purificados ou recombinante (Tc-24), que também diferenciam a infecção por *T. cruzi* da infecção por *T. rangeli*. Apesar de anticorpos líticos estarem presentes em vários mamíferos, uma característica importante da doença de Chagas é a presença somente em humanos (e em primatas do Novo Mundo, mas não em camundongos) de anticorpos antigalactose, capturáveis por laminina de camundongo ou outros antígenos ricos no epítipo Gal- α 1-3-Gal (Szarfman et al., 1982; Milani & Travassos, 1988). São precoces e intensamente estimulados durante a infecção pelo *T. cruzi* (Gazzinelli et al., 1988; Grauert et al., 1993); são capazes de induzir a lise dos parasitas em presença de complemento (Almeida et al., 1991) e apresentam-se em níveis mais elevados em pacientes crônicos assintomáticos do que em sintomáticos (Gazzinelli, 1992). Estudos com crianças infectadas em área endêmica da infecção demonstraram que a presença desses anticorpos em diluições séricas de 1:5.000 pode ser indicativa da presença de infecção recente (Medrano-Mercado et al., 1996a, b; Antas et al., 1999).



4.4

Participação de Citocinas no Determinismo de Resistência ou Susceptibilidade à Infecção Experimental por *Trypanosoma cruzi*

Çislaine A. Martins, Júlio C. S. Aliberti & João S. Silva

Neste capítulo discutiremos o papel de algumas citocinas e quimiocinas e de alguns dos possíveis mecanismos que influenciam no determinismo da resistência e/ou susceptibilidade em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*. Durante a fase inicial da infecção por esse parasita, os índices parasitêmicos e a mortalidade do hospedeiro dependem intrinsecamente da cepa de *T. cruzi* e das características genéticas do animal infectado, incluindo os genes do sistema principal de histocompatibilidade (Wrightsmann et al., 1982). Algumas cepas de parasitas são capazes de matar todos os animais infectados enquanto outras são quase avirulentas, induzindo baixa parasitemia e ausência de mortalidade. Certas linhagens de camundongos são resistentes à infecção enquanto outras são altamente suscetíveis e morrem durante ou logo após a fase aguda (Andrade et al., 1985; Silva et al., 1992).

A resposta imune protetora e/ou auto-imunidade desenvolvida durante a infecção pelo *T. cruzi* e o tipo de célula T auxiliar (Th) a ser expandido são certamente influenciados pelas citocinas presentes no ambiente durante o processo de diferenciação celular. Citocinas como IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-12, IL-13, IL-14 e IL-18 podem dirigir a diferenciação de subpopulações de células T com conseqüente ativação preferencial de linfócitos Th1 ou Th2. Estas subpopulações de células T foram definidas com base em seu padrão de secreção de citocinas (Mosmann et al., 1986), assunto recentemente revisto por Mosmann & Sad (1996). Com o desenvolvimento do padrão de resposta Th1 há um predomínio da secreção de IL-2 e IFN- γ , induzindo preferencialmente ativação de macrófagos e resposta mediada por células (Cher & Mosmann, 1987; Stout & Bottomly, 1989), enquanto o desenvolvimento de Th2 leva à síntese preferencial de IL-4, IL-5 e IL-10 favorecendo a resposta mediada por anticorpos (Coffmann et al., 1988). IFN- γ inibe a proliferação de células Th2 (Gajewski & Fitch, 1988) e IL-4 inibe a expressão de receptores de IL-2 e produção de IFN- γ (Peleman et al., 1989; Martinez et al., 1990). Por sua vez, IL-10 inibe a síntese de citocinas por Th1 (Fiorentino et al., 1989). O balanço entre estas citocinas determina o padrão de resposta celular a ser gerada, ditando as classes de anticorpos a serem produzidas e a resposta eferente a ser desenvolvida.

4.4.1 O Papel de IFN- γ

O IFN- γ é uma das citocinas mais estreitamente implicadas na resistência à infecção pelo *T. cruzi* e desempenha papel central em induzir a ativação de macrófagos e a inibição da replicação intracelular dos parasitas (Nogueira & Cohn, 1978; Silva et al., 1991; Gazzinelli et al., 1992), e quando administrado *in*

in vivo em camundongos aumenta a resistência à infecção, levando à diminuição de parasitemia e ao aumento da sobrevivência (Reed, 1988). A importância de IFN- γ no controle da infecção por *T. cruzi* foi definitivamente estabelecida por experimentos nos quais a neutralização por meio de tratamento *in vivo* com anticorpos monoclonais (Cardillo et al., 1996) ou a deleção gênica (Martins et al., 1999) de IFN- γ aumentou drasticamente a susceptibilidade à infecção. Resultados obtidos mais recentemente em nosso laboratório demonstram que além de ser necessário para a eliminação dos parasitas, através da indução da produção de óxido nítrico (NO), o IFN- γ participa ainda da modulação da expressão das moléculas Fas e Fas-L, expressas em níveis significativamente elevados nas células esplênicas após a infecção. Em seguida, baseados em uma série de experimentos realizados com animais geneticamente deficientes de IFN- γ , sugerimos que essa citocina está indiretamente implicada no controle da resposta imune, através da indução de NO e expressão de Fas e Fas-L e, conseqüente indução de apoptose nos linfócitos dos animais na fase aguda da infecção com *T. cruzi* (Martins et al., 1999). Contudo, experimentos recentes mostraram que camundongos resistentes e susceptíveis secretam quantidades semelhantes de IFN- γ quando infectados por *T. cruzi*. Esse achado sugere que outras citocinas secretadas durante a infecção poderiam inibir os efeitos de IFN- γ .

4.4.2 O Papel de TGF- β e IL-10

Citocinas que sabidamente inibem os efeitos de IFN- γ em macrófagos são TGF- β e IL-10 (Ding et al., 1990). Investigando a possibilidade dessas citocinas participarem do controle da resposta ao *T. cruzi*, mostramos a presença de TGF- β biologicamente ativo e de IL-10 em sobrenadantes de esplenócitos de animais infectados. A presença de tais citocinas coincidiu com o aumento da produção de IFN- γ e com o início do aparecimento de parasitemia patente nos animais. Experimentos *in vitro* mostraram que tanto TGF- β como IL-10 são capazes de inibir o efeito tripanocida de macrófagos ativados por IFN- γ (Silva et al., 1991, 1992). Adicionalmente, concluímos que TGF- β e IL-10 atuam *in vivo* durante a infecção com *T. cruzi*, pois o tratamento dos animais infectados com TGF- β recombinante ou com anticorpo anti IL-10 resultou em aumento e diminuição de parasitemia e mortalidade, respectivamente (Silva et al., 1991; Reed et al., 1994). Por outro lado, o tratamento com anticorpo anti IFN- γ determinou aumento da mensagem para IL-10, sugerindo que a produção de IL-10 e de IFN- γ em camundongos infectados é regulada por um mecanismo de *feed-back* negativo (Reed et al., 1994).

Uma série de experimentos foi realizada com o intuito de determinar a cinética de produção e o papel das citocinas sintetizadas logo após o primeiro contato dos parasitas com as células-alvos. Os resultados demonstraram que o tratamento com anticorpo anti IFN- γ foi mais eficaz em determinar o aumento de parasitemia quando realizado mais próximo do dia de infecção dos animais. O inóculo de anticorpo anti IFN- γ no 11º dia após à infecção, ou mais tarde, foi completamente ineficaz em determinar o aumento de parasitemia ou mortalidade dos animais. Isto é, neste período ainda que produzido em grande quantidade, IFN- γ já não é mais efetivo em controlar a infecção, possivelmente pela presença de TGF- β e IL-10. Com o objetivo de entender a regulação da resposta anti *T. cruzi* logo no início da infecção, incubamos esplenócitos normais com tripomastigotas vivos e verificamos que animais resistentes e susceptíveis produziram quantidades similares de IFN- γ . Entretanto, animais resistentes produziram quantidades significativamente menores de IL-10 que os susceptíveis. Este dado sugere que a susceptibilidade pode estar relacionada à maior produção de IL-10.

Investigamos em seguida quais células envolvidas na resposta imune inata eram responsáveis pela produção de IFN- γ . Verificamos que tripomastigotas vivos foram capazes de induzir a produção de IFN- γ tanto em células esplênicas de camundongos eutímicos como de atímicos, o que demonstrou que a produção de IFN- γ é independente de células T. Como a depleção de células NK bloqueou a produção de IFN- γ , sugerimos que estas seriam as principais responsáveis pela produção desta citocina após o estímulo inicial com *T. cruzi*,

num período da infecção no qual ainda não há resposta imune específica. Nestes experimentos mostramos também que sobrenadantes de esplenócitos aderentes cultivados com *T. cruzi* foram capazes de induzir a produção de IFN- γ por esplenócitos normais, sugerindo que as células produtoras desta citocina não necessitam contato direto com o parasita, mas sim com algum fator presente no sobrenadante, o qual é produzido após a interação macrófagos-tripomastigotas (Cardillo et al., 1996).

Em seguida, mostramos que macrófagos cultivados com tripomastigotas vivos, mas não epimastigotas ou parasitas mortos, secretam IL-12, que por sua vez foi capaz de induzir a produção de IFN- γ por esplenócitos normais. Nesses ensaios, a adição de anticorpo monoclonal neutralizante anti IL-12 aos sobrenadantes bloqueou completamente a capacidade de induzir a síntese de IFN- γ . O papel da IL-12 durante o curso da infecção *in vivo*, foi melhor entendido quando camundongos infectados e tratados com anticorpo anti IL-12 apresentaram aumento de parasitemia e mortalidade. Estes resultados levaram-nos a sugerir que IL-12, produzida por macrófagos quando da interação com *T. cruzi*, participa conferindo resistência ao hospedeiro, levando a uma diminuição da parasitemia e à mortalidade durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* (Aliberti et al., 1996). De fato, o tratamento com IL-12 recombinante levou a uma diminuição da parasitemia dos animais (Hunter & Araujo, 1996).

4.4.3 A Participação das Quimiocinas

Quimiocinas são mediadores inflamatórios amplamente implicados na modulação dos fenômenos que levam ao acúmulo de populações específicas de leucócitos em processos inflamatórios agudos e crônicos em uma série de doenças. Em termos gerais, as quimiocinas podem ser liberadas por diferentes tipos celulares depois da ativação e desempenham atividade quimiotática potente tanto *in vivo* como *in vitro*. Além da grande implicação na migração dos leucócitos, as quimiocinas podem participar, ainda, de outros eventos extremamente importantes para o estabelecimento da resposta imune, como proliferação de linfócitos T e diferenciação dos padrões Th1 e Th2, entre outros. Estudando a possível participação das quimiocinas na resposta imune contra o *T. cruzi*, experimentos realizados em nosso laboratório demonstraram que macrófagos inflamatórios obtidos da cavidade peritoneal de camundongos produzem as β -quimiocinas JE/MCP-1, MIP- α , MIP- β e RANTES quando cultivados *in vitro* com tripomastigotas vivos de *T. cruzi*. Adicionalmente, essas quimiocinas foram diretamente implicadas na indução da produção de NO e inibição do crescimento dos parasitas nesse sistema (Aliberti et al., 1999). Em concordância com esses resultados, Villalta et al. (1998) demonstraram que também em macrófagos humanos, a atividade tripanocida via produção de NO pode ser induzida *in vitro* pelas quimiocinas RANTES, MIP- α e MIP- β , sugerindo portanto que as quimiocinas devem estar amplamente implicadas na resposta imune contra o *T. cruzi*. Nesse contexto, cabe ressaltar que a produção dessas quimiocinas poderia estar envolvida também nos mecanismos mediadores de processos patológicos agudos e crônicos como a ocorrência de miocardite freqüentemente observada após a infecção com *T. cruzi*.

4.4.4 O Papel do Óxido Nítrico e TNF- α

A atividade tripanocida dos macrófagos ativados foi inicialmente atribuída à geração de peróxido de hidrogênio (Nogueira & Cohn, 1978; Reed et al., 1987). Entretanto, a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada por macrófagos durante a infecção de camundongos susceptíveis pode ser mais alta que a observada em animais resistentes (Russo et al., 1989) e tratamentos capazes de exaurir ou eliminar os metabólitos do *burst* respiratório de macrófagos ativados não inibiram a atividade tripanocida destas células. Mesmo macrófagos incapazes de ativar o *burst* respiratório

rio matam parasitas intracelulares com a mesma eficiência que macrófagos normais (Gazzinelli et al., 1992). Esses dados sugeriram que a atividade tripanocida de macrófagos é independente da geração de peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, as citocinas que facilitam a replicação dos parasitas (IL-10 e TGF- β) também inibem a indução da enzima óxido nítrico sintase (NOSi). Ao contrário, IFN- γ tem atividade tripanocida e ativa a NOSi. Realmente, o bloqueio dessa enzima por inibidores específicos abole completamente a atividade tripanocida de macrófagos ativados, demonstrando que o NO efetivamente controla a replicação intracelular do *T. cruzi* (Vespa et al., 1994).

Resultados obtidos em nosso laboratório demonstraram que células esplênicas de camundongos na fase aguda da infecção secretam altas quantidades de NO, sendo essa produção mais rápida nos animais resistentes. Camundongos infectados e tratados com inibidores da NOSi tornam-se mais susceptíveis à infecção, apresentando maiores parasitemias e mortalidade, sugerindo que o NO também é importante para controlar a replicação dos parasitas *in vivo*. De fato, tripomastigotas são altamente susceptíveis à morte induzida por NO, visto que quando incubados com uma droga doadora de NO como SNAP (S-nitrosoacetil-penicilamina), mas não com seu análogo penicilamina, morrem de maneira, dose e tempo dependente. Assim, sugerimos que formas amastigotas ou tripomastigotas de *T. cruzi* são mortas no interior de macrófagos por um mecanismo dependente de NO (Vespa et al., 1994).

Em outros experimentos avaliamos o papel de TNF- α em induzir a produção de NO em células isoladas ou em animais infectados. Verificamos que a adição de TNF- α sobre macrófagos infectados, tratados ou não com IFN- γ não induziu qualquer atividade tripanocida, nem potenciou o efeito de IFN- γ . Contudo, a adição de anticorpo anti TNF- α às culturas de macrófagos infectados e estimulados com IFN- γ promoveu uma diminuição significativa da produção de NO e um aumento da replicação dos parasitas intracelulares. Verificamos, ainda, que TNF- α é produzido por macrófagos na presença de tripomastigotas vivos e que a adição de IFN- γ exógeno potenciou essa produção em pelo menos dez vezes. Esses resultados permitiram sugerir que tripomastigotas de *T. cruzi* induzem liberação de TNF- α por macrófagos que, na presença de IFN- γ , atuam de maneira autócrina, promovendo a produção de NO. Desta forma, juntos IFN- γ e TNF- α desempenham importante papel no controle da quantidade de parasitas circulantes em animais infectados por *T. cruzi*. Além de IFN- γ e TNF- α , a produção de NO pelos macrófagos infectados com *T. cruzi* pode ser modulada também pelo fator ativador de plaquetas ou PAF (do inglês *platelet-activating factor*), como demonstrado por experimentos realizados recentemente em nosso laboratório. Os resultados desses experimentos indicam que a atividade indutora de produção de NO exercida por PAF nos macrófagos infectados *in vitro* também é dependente de TNF- α , ilustrando assim a importância de TNF- α na indução dos mecanismos tripanocidas. Com efeito, o tratamento de camundongos infectados com anticorpo anti TNF- α provoca aumento de parasitemia e mortalidade e conseqüente diminuição da produção de NO, confirmando os resultados obtidos *in vitro* (Silva et al., 1995).

4.4.5 Óxido Nítrico e Hiporresponsividade

Apesar da importância do NO como mecanismo microbicida na fase aguda da infecção experimental com *T. cruzi* ser patente, tem sido demonstrado que o NO também induz imunossupressão nessa fase da infecção (Abrahamsohn & Coffmann, 1995). De fato, tratamentos *in vivo* que levam à diminuição da produção de NO, como os tratamentos com os anticorpos monoclonais anti TNF- α ou anti IFN- γ ou com o inibidor da enzima NOSi, foram capazes de restaurar, ao menos parcialmente, a resposta proliferativa de células esplênicas de animais infectados ante a mitógenos. Ainda esses tratamentos promoveram aumento da viabilidade celular observada nestas células após cultura por 24 horas (Martins et al., 1998). O efeito imunossupressor do NO foi anteriormente demonstrado em outras infecções causadas por protozoários como *T. brucei* (Sternberg & McGuidan, 1992; Schleifer & Mansfield, 1993), *Toxoplasma gondii* (Candolfi et al., 1995), e *Plasmodium vinkei* (Rockett et al., 1994), ou por bactérias, como *Listeria monocytogenes* (Gregory et al., 1993). Nessas infecções, a resposta proliferativa pode ser parcial ou totalmente restaurada pelo tratamento *in vivo* ou *in vitro* com inibidores da NOSi.

Os mecanismos pelos quais o NO exerce função imunossupressora ainda não são claros, entretanto, foi demonstrado que o NO pode inibir a apresentação de antígenos por macrófagos regulando negativamente a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (Sicher et al., 1994). Adicionalmente, alguns trabalhos demonstram que o NO pode alterar o funcionamento de complexos enzimáticos imprescindíveis para o metabolismo celular (Granger & Lehninger, 1982; Kilbourn et al., 1984), inibir a duplicação de DNA (Lepoivre et al., 1990) ou causar danos diretos no DNA (Nguyen et al., 1992) sugerindo que o NO não só pode inibir a replicação mas também pode induzir a morte celular. De fato, o NO tem sido identificado como indutor de apoptose em macrófagos ativados *in vitro* com LPS e IFN- γ (Albina et al., 1993; Sarih et al., 1993), em células tumorais (Granger & Lehninger, 1982), células das ilhotas pancreáticas (Kaneto et al., 1995), tímócitos (Fehsel et al., 1995) e em clones de células T antígeno-específicas (Stefani et al., 1994), entre outros. Por outro lado, o NO também pode bloquear a indução de apoptose em determinadas circunstâncias.

Resultados obtidos em nosso laboratório têm demonstrado que em animais agudamente infectados pelo *T. cruzi*, um dos possíveis mecanismos pelo qual o NO poderia participar mediando imunossupressão seria através da indução de apoptose. Inicialmente demonstramos que durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* há um aumento da porcentagem de células em apoptose no baço dos animais infectados por *T. cruzi*. Nesses animais os maiores índices de apoptose foram encontrados justamente quando os índices parasitêmicos e de produção de NO estavam elevados. Esses primeiros achados possibilitaram a formulação da hipótese de que o NO produzido em índices elevados durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi* poderia participar na modulação da indução de apoptose. Tal possibilidade foi posteriormente confirmada quando experimentos *in vitro* demonstraram que, após 48 horas de cultivo, a porcentagem de apoptose em esplenócitos obtidos de animais agudamente infectados por *T. cruzi* poderia ser reduzida se fossem adicionados às culturas inibidores da enzima NOSi ou anticorpos monoclonais anti TNF- α ou anti IFN- γ . Quando os animais infectados receberam esses mesmos tratamentos *in vivo*, a porcentagem de apoptose nas células esplênicas foi menor que a dos controles infectados e tratados com salina ou anticorpo controle (Martins et al. 1998).

Em conjunto, os resultados apresentados (ver sumário na Figura 3.), além de demonstrarem o papel fundamental de citocinas na indução dos mecanismos efetores da morte dos parasitas, também documentam a importância desses mediadores na regulação de tais mecanismos. Nossos resultados comprovam a importância do NO como agente tripanocida e simultaneamente sugerem um mecanismo pelo qual o NO participaria na indução de imunossupressão durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*. Tais achados contribuem para um melhor entendimento da relação hospedeiro-parasita na infecção por *T. cruzi* e podem abrir perspectivas para futuras intervenções imunoterápicas em pacientes chagásicos.

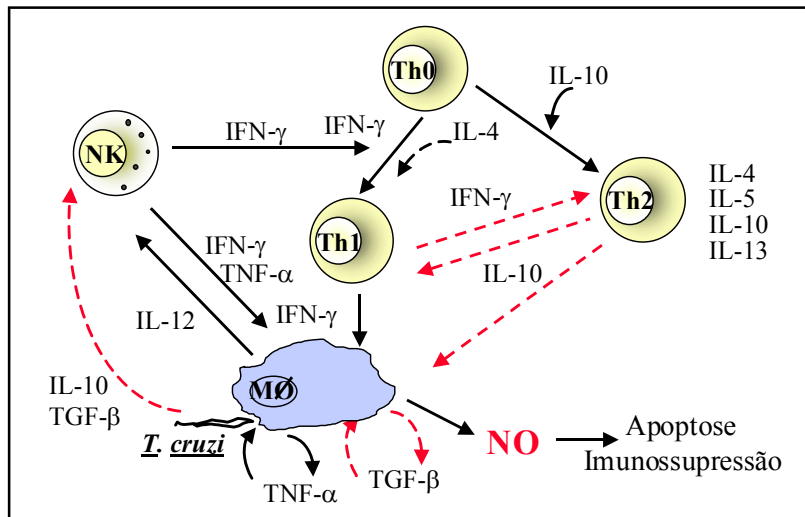
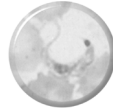


Figura 3 – Principais interações de citocinas e células que podem resultar em modulação da resposta imune em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Mf: macrófagos, NK: células natural killer, NO: óxido nítrico, Th: células T auxiliar. Setas contínuas indicam ativação e setas interrompidas indicam inibição. Ver explicações no texto.



4.5

O Timo como Órgão-alvo na Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Vinícius Cotta-de-Almeida & Wilson Savino

O sistema imunológico é determinante na resistência antiparasitária durante o curso da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (Tarleton, 1991, 1995). Isto pode ser verificado quando camundongos atímicos são infectados pelo *T. cruzi* (Gonçalves-da-Costa et al., 1984), bem como após depleção específica de linfócitos T CD4⁺ (Minoprio et al., 1987; Russo et al., 1988) ou de CD8⁺ (Tarleton, 1990). Nesses animais ocorre aumento de parasitemia, concomitante a um alto grau de parasitismo tecidual, com uma diminuição no infiltrado inflamatório intracardíaco, demonstrando assim, que ambas as subpopulações CD4 e CD8 parecem ser relevantes no controle da infecção (Tarleton, 1991, 1995).

Paralelamente, diversas alterações no ramo celular da resposta imunológica celular podem ocorrer como, por exemplo, uma ativação policlonal maciça concomitante a uma imunossupressão (revisado em Minoprio et al., 1989). Destaca-se ainda uma diminuição na produção de IL-2 (Harel-Bellan et al., 1983; Nabors & Tarleton, 1991), redução na expressão de moléculas de superfície de linfócitos T (Kierszenbaum et al., 1989) e presença importante de apoptose de linfócitos T (Lopes et al., 1995).

Outro ponto relevante refere-se à presença de um componente auto-imune na miocardite da fase crônica da doença (Takle & Hudson, 1988; Cunha-Neto et al., 1995). Nesse fenômeno, foi sugerida a participação de linfócitos T, após estudo em camundongos, mostrando que as células T CD4⁺ são responsáveis pela efetuação de uma resposta auto-imune antimúsculo cardíaco que ocorre em animais cronicamente infectados (Ribeiro-dos-Santos et al., 1992). Entretanto, a demonstração de que células CD8⁺ predominam em sítios inflamatórios no coração de pacientes chagásicos (D'Avila Reis et al., 1993a) sugere uma participação dessas células na lesão cardíaca da fase crônica.

Esses distúrbios na imunidade celular nos levam a imaginar um possível comprometimento também na geração de células T. De fato, a influência do timo no curso da infecção pelo *T. cruzi* pode ser evidenciada pela noção de que a infecção em animais timectomizados (Schmunis et al., 1971) ou em camundongos atímicos (Kierszenbaum & Pienkowski, 1979; Gonçalves-da-Costa et al., 1984), apresenta-se com um grau maior de severidade, com os animais apresentando parasitemia e mortalidade mais altas. É importante ressaltar que a timectomia em animais adultos, seguida de infecção pelo *T. cruzi*, determina nestes animais redução na resposta policlonal de linfócitos B, e que pode ser evidenciada diminuição no número de células secretoras de Ig, principalmente em relação aos isotipos de IgG (Minoprio et al., 1989). Além disso, a detecção de formas amastigotas no timo (Savino et al., 1989) demonstra como este órgão pode ser diretamente afetado na infecção pelo *T. cruzi*.

Antes de descrevermos as diversas alterações que ocorrem no timo após a infecção pelo *T. cruzi*, é importante ressaltar alguns aspectos da fisiologia deste órgão.

4.5.1 O Timo e a Diferenciação de Células T

O timo é um órgão linfóide primário onde células precursoras dos linfócitos T se diferenciam e aqueles selecionados para sobreviver, ao terminar o processo de maturação, deixam o órgão e vão se localizar nas regiões timo-dependentes dos órgãos linfóides periféricos. Esse processo ocorre em íntimo contato com o microambiente tímico, uma rede tridimensional formada essencialmente por células epiteliais, células dendríticas, macrófagos e elementos da matriz extracelular (ver revisões de Boyd et al., 1993; Savino et al., 1993; Anderson et al., 1996).

As células epiteliais tímicas (TEC) formam o principal componente celular do microambiente tímico e apresentam significativa heterogeneidade morfológica e fenotípica (Boyd et al., 1993). As TEC são capazes de produzir diversas citocinas que estão envolvidas na proliferação e diferenciação de timócitos (ver revisão de Carding et al., 1991). Além disso, uma característica fundamental das TEC é a expressão de moléculas de classe I e classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), capazes de apresentar peptídeos ao receptor clonal de células T (TCR) expresso pelos timócitos, com a participação, respectivamente, dos co-receptores CD8 e CD4, também expressos na superfície dos timócitos.

Dentre as TEC, é importante destacar um grupo de células que apresenta um certo grau de organização celular e possíveis funções específicas, os complexos linfo-epiteliais denominados de células *nurse* do timo (TNC). Estes complexos, compostos de uma célula epitelial envolvendo de dois a duzentos timócitos, obtidos a partir de digestão enzimática de fragmentos de timo, foram primeiramente descritos por Wekerle & Ketelsen (1980). Eles parecem ser relevantes no processo de diferenciação, provavelmente participando em eventos de seleção positiva e negativa de timócitos (Kyewski, 1986; Aguilar et al., 1994). Os complexos TNC têm provável localização na região cortical tímica (Kyewski & Kaplan, 1982; Houben-Defresne et al., 1982; van de Wijngaert et al., 1984; van Vliet et al., 1984; Andrews & Boyd, 1985), e os timócitos intra TNC (TNC-T) apresentam características fenotípicas e funcionais de células imaturas (Kyewski & Kaplan, 1982; van Vliet et al., 1984; de Waal Malefijt et al., 1986; Leene et al., 1988; Li et al., 1992; Philp et al., 1993). Entretanto, ensaio em membrana cório-alantóica, onde TNCs de galinha são depositadas e TNC-T interagem com moléculas de MHC classe II expressas nessa membrana, demonstrou frequência alta de TNC-T com capacidade alo-reativa e auto-reativa (Wick & Oberhuber, 1986; Wick et al., 1991; Penninger & Wick, 1992). Além disso, as TNCs secretam hormônios tímicos e citocinas, expressam proteínas de MHC classe I e classe II, produzem proteínas de matriz extracelular e ainda apresentam junções comunicantes (ver revisão Villa-Verde et al., 1995).

É no contexto deste microambiente de TEC, macrófagos e células dendríticas, e de matriz extracelular, que ocorre um intenso processo de migração, concomitante a um vasto corpo de interações celulares e moleculares desde a chegada de precursores até a saída de linfócitos T imunocompetentes do timo. Durante a diferenciação, as células precursoras passam por diversos estágios de maturação, caracterizados, em parte, pela expressão diferencial de algumas moléculas de superfície (para revisão, ver Fowlkes & Pardoll, 1989; Godfrey & Zlotnik, 1993).

As primeiras células linfóides a colonizarem o timo, os pró-timócitos, foram identificados em camundongos como precursores, expressando baixas quantidades de CD4 (CD4^{lo}), sendo negativos para CD8 e CD3 (Wu et al., 1991), mas positivos para CD44. Em seguida estas células começam a expressar CD24 e CD90 (Thy-1) em níveis mais altos, perdem a molécula CD4, e passam a expressar também CD25, resultando na subpopulação de timócitos CD4⁻CD8⁻TCR⁻, referidos como triplo-negativos. Neste estágio as células passam a estar comprometidas com a linhagem de células T (Godfrey & Zlotnik, 1993), sendo precursoras das outras subpopulações timocitárias: os timócitos duplo-negativos, os timócitos imaturos corticais CD4⁺CD8⁺, ditos duplo-positivos, e os simples-positivos CD4⁺CD8⁻ e CD4⁺CD8⁺, considerados maduros (Figura 4) e que migrarão para a periferia (revisado em Fowlkes & Pardoll, 1989; Godfrey & Zlotnik, 1993; Anderson et al., 1996).

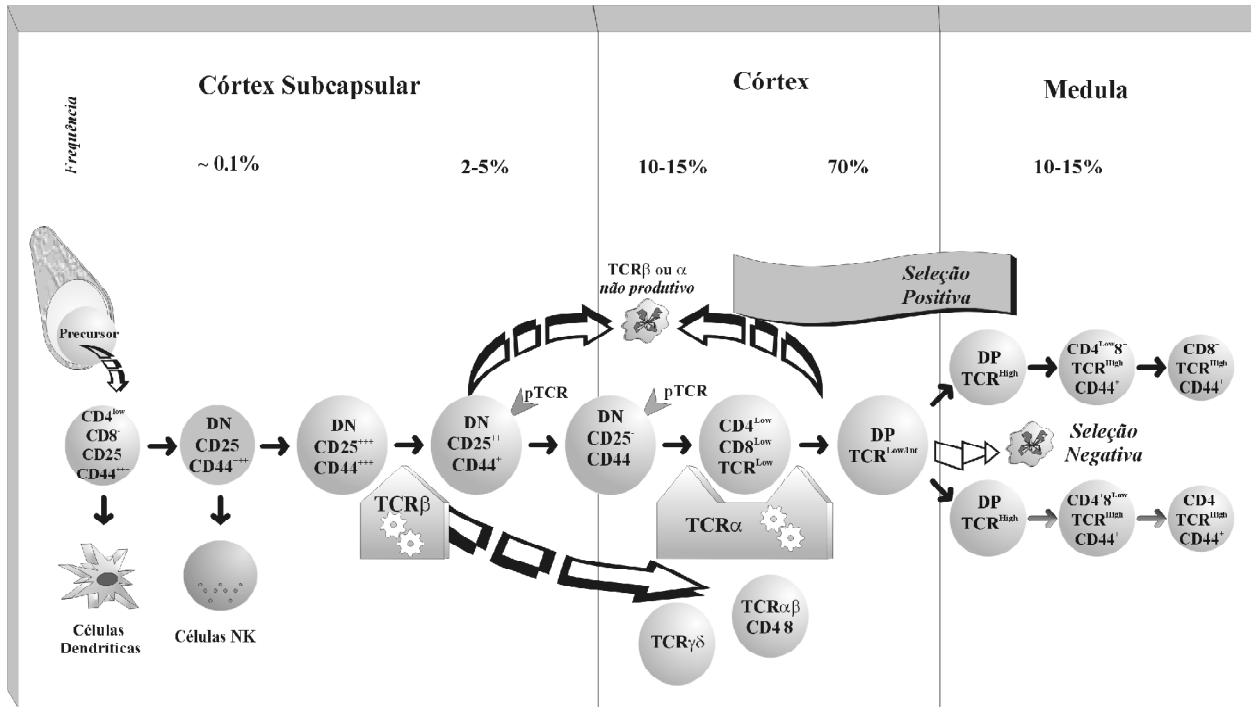


Figura 4 – Diferenciação intratímica de linfócitos T. Adaptado a partir de Oliveira-Dos-Santos (1997) e Godfrey & Zlotnik (1993)

Dentre essas subpopulações, é importante destacar os tímócitos duplo-positivos TCR^{lo} , que correspondem à subpopulação tímica mais freqüente e que, com a expressão do $TCR/CD3$, representam também o estágio no qual ocorre o principal evento da maturação timocitária, o fenômeno de seleção intratímica. Este fenômeno define quais dos inúmeros receptores gerados no processo de rearranjo do TCR darão origem ao repertório de células T maduras que povoará a periferia (Sprent et al., 1988). Dois são os processos envolvidos naquele fenômeno, a *seleção positiva* (Bevan, 1977) e a *seleção negativa* (Kappler et al., 1987). A seleção negativa tem como efeito a eliminação ou inativação de clones de tímócitos com potencial auto-reativo, e a seleção positiva tem como efeito duplo permitir que as células progridam para a maturação (ao invés de morrerem) e definir o caminho de maturação. Essa definição se dá como consequência do reconhecimento pelos tímócitos de complexos peptídeo-MHC apresentados por células do microambiente tímico (fenômeno de restrição ao MHC). Assim, paralelamente ao aumento da expressão de $TCR/CD3$ (Bonifacino et al., 1990), dependendo da interação com moléculas do MHC, apenas uma das moléculas acessórias, $CD4$ ou $CD8$, permanecerá (Guidos et al., 1990). Desse modo, se um linfócito T, durante o processo de desenvolvimento, reconhecer um peptídeo em associação com a molécula de MHC de classe II, será uma célula simples-positiva $CD4$ que não expressa $CD8$ e, reciprocamente, se a especificidade da célula T for dirigida a um peptídeo complexado ao MHC de classe I, expressará apenas $CD8$ (von Boehmer & Kisielow, 1993; von Boehmer et al., 1993). Essas subpopulações de células $CD4$ e $CD8$ agora maduras, localizadas na região medular dos lóbulos tímicos, emigrarão do órgão indo povoar as áreas T-dependentes dos órgãos linfóides periféricos (ver esquema da Figura 4).

4.5.2 Alterações no Compartimento Linfóide após Infecção pelo *T. cruzi*

A atrofia é uma das principais características relacionadas ao timo em condições de imunodeficiência, estando entre elas diversas doenças infecciosas (revisado em Savino, 1990; Savino et al., 1992). Uma das características observadas na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* em murinos é uma atrofia tímica

progressiva, com perda de massa e celularidade do órgão (Savino et al., 1989; Leite-de-Moraes et al., 1991). A severa diminuição na celularidade tímica se reflete, principalmente, na diminuição de células imaturas de fenótipo CD4⁺CD8⁺ (duplo-positivas). Nesse contexto, verificou-se em paralelo um aumento na frequência de células simples-positivas CD4⁺CD8⁻ e CD4⁻CD8⁺ e duplo negativas CD4⁻CD8⁻. Além disso, a detecção de aumento na frequência de células CD3^{hi} corroboram a noção de que as células resistentes são, em sua maior parte, do tipo medular (Leite-de-Moraes et al., 1991). Histologicamente destaca-se uma redução na região cortical e até mesmo desaparecimento quando a atrofia é bastante intensa. Outro aspecto marcante é a presença de muitos núcleos picnóticos de timócitos na região cortical remanescente.

Como estas alterações se assemelham àquelas vistas em animais injetados com hidrocortisona, e como detectou-se no soro de animais infectados em fase aguda níveis três vezes aumentados de glicorticóides circulantes, as mesmas análises foram feitas em animais adrenalectomizados e infectados. Estas análises mostraram que o padrão das alterações se manteve semelhante àquelas descritas em animais intactos (Leite-de-Moraes et al., 1991).

Outro importante achado foi a demonstração de que toda esta modulação nas subpopulações de timócitos parece ser transitória, tendo em vista que as subpopulações de timócitos, definidos pela expressão de CD3, CD4 e CD8, retornam aos valores normais quando se analisa o timo de animais infectados na fase crônica da doença (Leite-de-Moraes et al., 1992). Nesse sentido, cabe frisar que ao final da fase aguda da doença experimental em camundongos isogênicos da linhagem C3H/HeJ, detectamos um aumento de células CD25⁺ e células em ciclo, que podem corresponder a timócitos em fases iniciais de diferenciação (Leite-de-Moraes et al., 1992).

Mais recentemente, a análise do repertório de timócitos de animais infectados revelou um aumento na porcentagem de células CD4⁺CD8⁺Vb5⁺ e CD4⁺CD8⁺Vb14⁺ e apenas um ligeiro aumento na porcentagem de células CD4⁺CD8⁻Vb5⁺ e CD4⁺CD8⁻Vb14⁺ (Leite-de-Moraes, 1993). Estas alterações ao nível do repertório devem ser analisadas à luz da presença de antígenos parasitários no timo, visto que recentemente foi demonstrada atividade do tipo “superantigênica” associada ao *T. cruzi* (Leite-de-Moraes, 1993), que pode ser detectado parasitando o parênquima tímico (Savino et al., 1989; Gonçalves-da-Costa et al., 1991).

A análise funcional dos timócitos no curso da fase aguda da infecção experimental demonstrou, ainda, reduzida resposta proliferativa à concanavalina A (Con A) e ao anticorpo anti CD3 (Leite-de-Moraes et al., 1994). Demonstrou-se, também, aumento na atividade citotóxica inespecífica destes timócitos. Estas alterações podem ser explicadas pela modulação na produção de citocinas por timócitos de animais infectados em fase aguda. Assim, a resposta proliferativa diminuída se deve, provavelmente, à insuficiente produção de IL-2, visto que a adição deste fator restaura a atividade proliferativa. Esta insuficiência na produção de IL-2, por sua vez, se deve, provavelmente, aos níveis aumentados na produção de IFN- γ e IL-10, já que a resposta proliferativa à Con A e a produção de IL-2 são recuperadas ao se utilizar anticorpos contra estas duas citocinas. Por outro lado, a atividade citotóxica inespecífica exacerbada se deve, provavelmente, aos níveis aumentados na produção de IL-4, IL-5 e IL-6 pelos timócitos dos animais infectados (Leite-de-Moraes et al., 1994).

4.5.3 Alterações Fenotípicas e Funcionais na Rede Epitelial Tímica

Em paralelo às alterações fenotípicas e funcionais de timócitos na fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*, demonstrou-se que o microambiente tímico também está modificado. Nos animais infectados apresentando atrofia tímica, observou-se um processo de densificação da rede epitelial do órgão. Um estudo mais detalhado desta rede foi realizado através de análise imunohistoquímica utilizando-se um painel de anticorpos dirigidos contra diferentes proteínas da família de citoqueratinas. Assim, células reconhecidas pelo anticorpo monoclonal (mAb) ER-TR.5, que em timos normais estão presentes exclusivamente na medula, passam a ser encontradas também no córtex subcapsular e interno. Além disso, células CK8/18⁺, normalmente restritas à região cortical, passam a ser detectadas também na medula tímica (Savino et al., 1989).

Um dado bastante relevante para a análise da patologia tímica na doença de Chagas é a observação de uma expressão maior de antígenos de classe II do MHC concomitante à atrofia que ocorre no timo de animais infectados (Savino et al., 1989). Este efeito seria, possivelmente, secundário ao processo de densificação da rede epitelial, mas talvez também decorra de indução por IFN- γ , cujos níveis intratímicos estão bastante elevados na fase aguda da doença (Leite-de-Moraes et al., 1994).

Por outro lado, a análise da produção do hormônio tímico timulina mostrou pequena redução nos níveis séricos e no número de células timulina-positivas (Savino et al., 1989).

Outra importante observação corresponde ao aumento progressivo na rede intralobular de proteínas de membrana basal fibronectina, do colágeno IV e do antígeno reconhecido pelo mAb ER-TR.7 (Savino et al., 1989).

4.5.4 Distúrbios nas Interações Timócitos/Microambiente

As alterações, tanto no compartimento linfóide como no microambiente tímico, nos levaram a investigar possíveis alterações das interações fisiológicas que acontecem entre timócitos/microambiente, no curso da infecção pelo *T. cruzi*. Assim, recentemente, estudando os complexos *nurse* do timo, verificamos uma diminuição no número destes, bem como alterações no tamanho, granularidade, e diversos danos em nível ultra-estrutural (Cotta-de-Almeida et al., 1997). Observamos também aumento na frequência de timócitos mortos no interior desses complexos *nurse*, bem como aumento na expressão de proteínas de matriz extracelular, com aumento concomitante na liberação de timócitos dos complexos isolados de animais infectados (Cotta-de-Almeida et al., 1997).

Estes dados devem ser analisados em conjunto com os dados recentes em que demonstramos que após à infecção aguda pelo *T. cruzi* há um aumento progressivo na expressão de ligantes de matriz extracelular, por exemplo fibronectina e laminina, bem como na expressão de respectivos receptores VLA-4/VLA-5 e VLA-6 (Cotta-de-Almeida, 1996). Interessante é a observação de que o aumento pode ser percebido antes de haver uma clara atrofia do órgão. Definimos ainda, por citometria de fluxo, que a expressão de VLA-4 se mostrava aumentada já no 15º dia de infecção, porém de forma mais exuberante no 22º dia de infecção. A expressão de VLA-5 e VLA-6 mostrava discretas flutuações nos dias analisados, com a subpopulação de células duplo-positivas sendo, provavelmente, o grupo-alvo do aumento observado na expressão das integrinas (Cotta-de-Almeida, 1996).

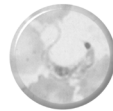
Interessantemente, a infecção aguda pelo *T. cruzi*, além de determinar alterações na expressão de ligantes de matriz extracelular que possuem propriedades adesivas, provoca também importante modulação na expressão de tenascina, uma proteína de matriz extracelular que apresenta propriedades imunorregulatórias, tendo sido descrita como uma proteína de de-adesão (Chiquet-Ehrismann, 1995). Análises imunocitoquímicas *in situ* da expressão de tenascina no timo mostraram uma marcação essencialmente restrita à medula do órgão, com o córtex expressando tenascina apenas no nível da membrana basal de vasos sanguíneos e pouca ou nenhuma marcação na membrana basal subseptal e subcapsular. Já no nono dia de infecção, os timos de animais infectados mostravam aumento de tenascina; progressivamente percebemos que a infecção induzia aparecimento de tenascina no córtex, bem como uma forte marcação na membrana basal de cápsula e septos (Cotta-de-Almeida, 1996).

Além disso, estudando funcionalmente *in vitro* a adesão de timócitos com células epiteliais tímicas, fenômeno este sabidamente mediado por ligantes e receptores de matriz extracelular, pudemos observar que, ao contrário da expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular, a adesão de timócitos obtidos de animais infectados se encontrava diminuída em relação aos timócitos de animais controles. Por outro lado, quando esses timócitos eram colocados sobre células epiteliais tímicas infectadas, observamos um bloqueio parcial na diminuição da adesão, o que ocorria em paralelo com um aumento de matriz extracelular nas culturas de células epiteliais tímicas infectadas (Cotta-de-Almeida, 1996). O conjunto de dados discutidos acima sugere que o

processo de adesão/de-adesão/migração intratímica de células T, sob influência das alterações na expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular, esteja modificado no curso da infecção experimental pelo *T. cruzi*, com provável influência no processo normal da diferenciação intratímica de células T.

Nesse sentido, é importante salientar dados recentes em que evidenciamos em linfonodos e baço de animais infectados a presença de número anormalmente alto de células duplo-positivas nesses órgãos durante a infecção aguda. De fato, essas células também foram detectadas na fase crônica da infecção. Análises por citometria de fluxo dos antígenos de membrana CD3 e CD24 (HSA), demonstraram um fenótipo imaturo dessa população de células duplo-positivas. Embora seja necessária a demonstração inequívoca da origem tímica dessas células, esses resultados novamente apontam para a existência de distúrbios na migração e, conseqüentemente na diferenciação intratímica de células T durante a infecção pelo *T. cruzi*.

Os achados de atrofia e depleção linfocitária, juntamente com as diversas alterações no timo de animais infectados, e a detecção de formas amastigotas no parênquima tímico, parecem definir a existência de uma verdadeira patologia tímica na infecção experimental pelo *T. cruzi*.



4.6

Imunomodulação da Resposta T-dependente na Doença de Chagas Experimental

Sylvio Celso G. da Costa, Katia S. Calabrese & Tania Zaverucha do Vale

4.6.1 Inflamação e Resistência - da Antigüidade aos Dias Atuais

O emprego de uma terapia de imunoestimulação visando aumentar a resistência de um doente contra infecções e doenças parasitárias, ou controlar o desenvolvimento de um câncer, é bastante sedutor. É o futuro da medicina já conhecido há longo tempo. Assim, Chamfort relata em suas *Máximas* que os pacientes com paludismo encontravam-se relativamente protegidos contra a peste, fato este que já é conhecido desde o século XVIII. Os egípcios já haviam constatado, empiricamente, que os doentes portadores de certos abscessos resistiam melhor que pessoas sadias a epidemias, conforme mencionado na história clássica da imunoestimulação.

Ao fim do século passado, Elie Metchnikoff, trabalhando no Instituto Pasteur, descobriu a fagocitose. Ele estava longe de imaginar que levaríamos quase cem anos para compreender como os leucócitos passam pelo endotélio vascular para alcançar o local da inflamação (revisto por Girard & Springer, 1995). O papel do endotélio no tráfico de células entre o sangue e os tecidos começou a ser esclarecido no início dos anos 80, ficando pouco a pouco evidenciado o papel das moléculas de adesão na tarefa de capturar células circulantes nos vasos vizinhos de um foco inflamatório. Este assunto é de importância para explicar a propagação de metástases cancerosas, onde células tumorais podem ser detectadas no sangue circulante, um assunto já conhecido há mais tempo, tendo o Dr. Pimenta de Mello, do Instituto Oswaldo Cruz, sido um dos pioneiros neste assunto (Pimenta de Mello, 1963). Moléculas presentes nas

células dos vasos e dos glóbulos brancos são ativadas em determinados momentos do desenvolvimento do processo inflamatório, envolvendo pares de moléculas em missões específicas. Gallatin et al. (1983) evidenciaram a primeira destas moléculas por meio de anticorpos monoclonais (MEL -14). Após purificação, elas foram denominadas selectinas, cujo sítio ativo, a lectina, se liga aos açúcares dos polímeros nucleares e dos monócitos, que são as primeiras células atraídas para o local da inflamação (Lasky et al., 1992; Baumhueter et al., 1993).

Por outro lado, as moléculas de adesão, situadas na superfície dos leucócitos, do tipo integrinas (como a LFA-1), são ativadas por moléculas quimiotáticas como a PAF (*platelet activating fator*), a IL-8 e outras que são produzidas pelo endotélio sob influência de mediadores da inflamação (a trombina e a histamina). Essas moléculas, após serem secretadas nos vasos e antes de circularem, se associam a outras moléculas da superfície do endotélio, principalmente com a CD44 (Tanaka et al., 1993). Em uma fase subsequente, moléculas como PECAM-1 (*platelet endothelial adhesion molecule-1*) ou CD31 participam da aproximação dos leucócitos e também da ativação das integrinas.

Algumas moléculas de adesão intervêm apenas no sentido de retardar a locomoção dos leucócitos na circulação (Butcher, 1991; Lawrence & Springer, 1991). Fazendo uma análise rápida dos modelos que descrevemos nos trabalhos, vamos ver que os imunomoduladores que empregamos estão em primeiro plano modulando a entrada de células no local da inflamação e, em uma segunda etapa, ativando-as. Uma vez ativadas, as integrinas mudam de forma e podem se ligar às moléculas de adesão da superfície endotelial como ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) e CD31, que garantem uma forte adesão dos leucócitos ao endotélio.

Estes estudos poderão explicar porque, em casos de reativação da doença de Chagas, devido à evolução da síndrome de imunodeficiência adquirida (Aids), ocorre, preferencialmente, o comprometimento do sistema nervoso central, usualmente apresentando sintomas de meningoencefalite (Rocha et al., 1994). A reativação da doença de Chagas ocorre apenas em pacientes imunossuprimidos (Krettli, 1983), sendo nestes casos muito freqüente o comprometimento do sistema nervoso central. Este fato tem sido assinalado em casos de transplantes (Jost et al., 1977; Pizzi et al., 1982; Leiguarda et al., 1990), leucemias (França et al., 1969; Monteverde et al., 1976; Kohl et al., 1982; Corona et al., 1988), linfomas (Monteverde et al., 1976) e Aids (Meneses et al., 1992; Oddó et al., 1992; Rosemberg et al., 1992). Em pacientes imunocomprometidos, têm sido descritas lesões pseudotumorais no sistema nervoso central devidas ao *T. cruzi* (Gluckstein et al., 1988, 1992; Del Castillo et al., 1990; Ferreira et al., 1991). De maneira semelhante, a ativação de tripanosomíase, pela ação da cortisona em macacos rhesus com infecção por *Trypanosoma vickersae* na Índia, mostrou alta incidência de encefalomielite. Assim, poderíamos perguntar quais fatores da resposta imunológica estariam atuando, ou deixando de atuar, sobre a barreira hemato-encefálica favorecendo estas alterações? Seria consequência da depleção das células CD4⁺ e dos fatores por elas induzidos que deixariam de atuar na regulação do endotélio vascular?

Os estudos com pacientes aidéticos são sugestivos. A alta taxa de destruição de células T CD4⁺ é o principal fator que leva ao desencadeamento da patogênese ligada ao HIV-1 (Ho et al., 1992). Entre vários aspectos desta patogênese, destacam-se problemas ligados ao parasitismo do sistema nervoso central, com lesões envolvendo *T. gondii* e *T. cruzi*.

Por outro lado, pacientes crônicos imunocomprometidos em consequência de imunoterapia supressora devido a um transplante cardíaco apresentam lesões cutâneas nodulares (Jatene, 1987). Lesões cutâneas similares foram encontradas em camundongos atímicos (Calabrese & Gonçalves da Costa, 1992), mostrando que o modelo murino é importante neste aspecto. Quando estudamos na leishmaniose tegumentar o espectro das diferentes formas clínicas, o pólo que aparece nos pacientes com lesões localizadas e benignas, bem como o pólo anérgico com formas difusas extremamente graves, podemos analisar este espectro pelo perfil imunológico da pele.

Seria interessante lembrar que a idéia da existência de uma imunidade órgão-específica remonta ao início do século, tendo sido este assunto levantado no Instituto Pasteur de Paris por Alexandre Bessedka, colaborador de Ilya Metchnikoff (Silverstein, 1989). Fichtelius et al. (1970) publicaram um artigo no qual chegaram a sugerir que a pele seria um órgão linfóide de primeira linha, comparável até com o timo. Esta conclusão foi obtida com base nas estruturas linfoepiteliais que ocorrem na pele dos recém-nascidos e fetos humanos. Estes acúmulos linfóides podem reaparecer nos adultos, sendo então diagnosticados como linfomas cutâneos benignos. Esta proposta constitui a hipótese mais interessante para explicar a origem de certas doenças cutâneas de proliferação linfóide não maligna. Entretanto, o conceito que estabelece a pele como um órgão de primeiro nível linfóide não tem bases consistentes.

O sistema imune cutâneo (SIC) é um complexo de células que interagem com a resposta imune, envolvendo um conjunto de fatores humorais que podem estar mais relacionados com a imunidade natural (queratinócito, histiócitos, monócitos, granulócitos e mastócitos) ou com a imunidade adquirida (células de Langerhans, células T e células endoteliais). O processo imunorregulador da pele tem sido descrito como composto de três fases distintas (Nickoloff, 1988): recrutamento, retenção/proliferação, recirculação.

A fase de recrutamento envolve o extravasamento de leucócitos através da estrutura vascular e o subsequente movimento destas células para a epiderme. As fases de retenção e de proliferação compreendem a interação entre as células de Langerhans, queratinócitos, células T e citocinas, bem como a subsequente proliferação destas células T que induzirão a formação do infiltrado inflamatório que poderá evoluir para um granuloma. Finalmente a fase de recirculação é ativada após a eliminação do componente de agressão da pele e envolve processos regulatórios cujos sinais são originados das células de Langerhans e dos queratinócitos.

As lesões cutâneas decorrentes da reativação do doença de Chagas em pacientes imunocomprometidos sugerem algumas questões.

- Seriam conseqüência de uma colonização latente da derme, resultado de um estado de imunidade concomitante que foi reativada pelas alterações dos mecanismos regulatórios do SIC?
- Seriam resultado de alterações dos sistemas regulatórios das estruturas vasculares, que parecem ocorrer também no sistema nervoso central de pacientes chagásicos aidéticos?

Na leishmaniose tegumentar, os dois pólos da doença apresentam alterações marcantes tanto na derme quanto na epiderme: as formas localizadas apresentam na epiderme um número elevado de células de Langerhans e de queratinócitos expressando ICAM e MHC, ao passo que na forma difusa os queratinócitos não expressam ICAM ou MHC, ocorrendo um pequeno número de células de Langerhans. Observando-se a derme na leishmaniose cutânea, nota-se o acúmulo de células T epidermotrópicas e uma resposta imunológica do tipo Th₁, enquanto na forma difusa a resposta é do tipo Th₂ (Tapia et al., 1994).

No momento, desenvolvemos diferentes modelos experimentais, o que permite termos um espectro da doença de Chagas, cujas posições extremas são as seguintes:

- pólo constituído pelos camundongos atímicos e que, por conseguinte, apresenta uma ausência marcante de resposta T-dependente e ausência de miocardite;
- pólo constituído por camundongos resistentes pela imunopotentiação da resposta T-dependente específica, com 100% de sobrevivida à infecção aguda e insignificante miocardite nesta fase.

O estudo da imunologia órgão-específica que estamos iniciando poderá esclarecer muitos destes aspectos ainda obscuros da tripanosomíase americana (Figura 5).

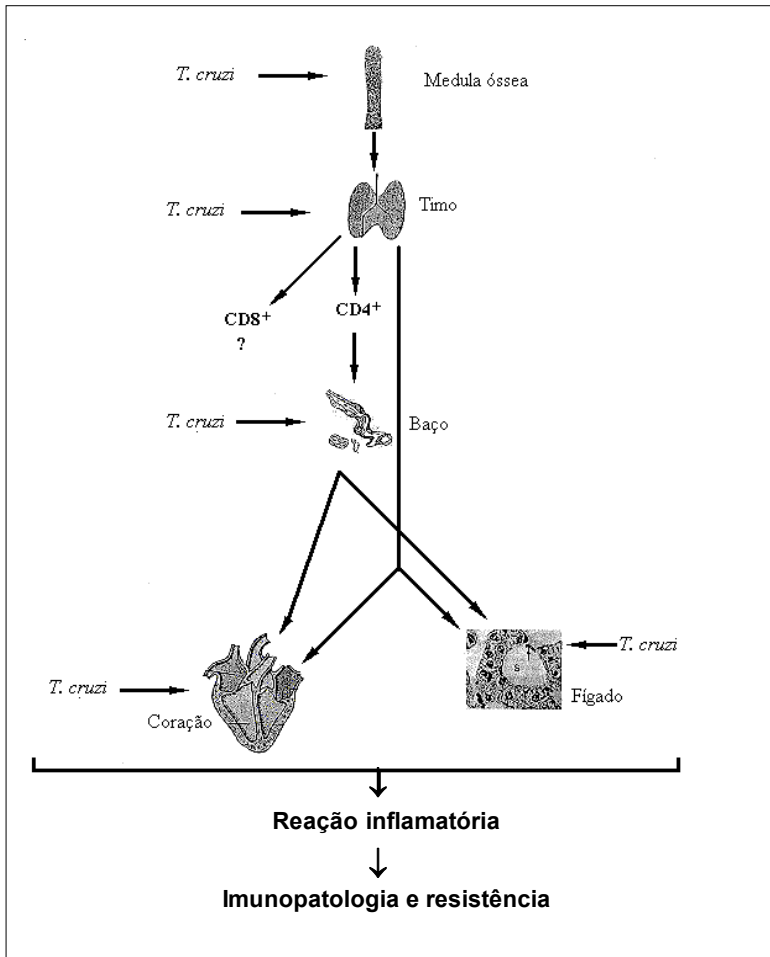


Figura 5 – Esquema mostrando a colonização do sistema linfóide pelo *Trypanosoma cruzi* e a correlação entre a invasão tissular e a reação inflamatória em diferentes órgãos, iniciando os processos imunopatológicos.

4.6.2 A Infecção pelo *T. cruzi* na Ausência de Reação Inflamatória

Camundongos atímicos OF1 (Swiss Webster, Albin) ou singênicos de linhagens sensíveis, intermediários e resistentes ao *T. cruzi* (Nude, C₃H/He, Balb/C e C57BL/6, respectivamente) infectados com 10⁴ tripomastigotas oriundos de culturas em células, ou tripomastigotas sanguíneas, apresentam uma infecção com parasitemias elevadíssimas, sem os perfis observados nos camundongos eutímicos. Apresentam, também, uma correspondente exarcebação da colonização tissular, de caráter sistêmico. As cepas Y e CL, ditas polares do *T. cruzi* pela colonização preferencial de células do sistema fagocítico mononuclear ou do músculo, respectivamente, quando inoculadas em camundongo Balb/C Nude apresentam o mesmo perfil, mostrando que a resposta T-dependente modula o chamado tropismo de cepas do *T. cruzi* (Gonçalves da Costa et al., 1984, 1986). O estudo histopatológico tem demonstrado que na ausência da resposta T-dependente não ocorre nenhum infiltrado inflamatório. A transferência de células T de camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, ou mesmo de camundongos normais, restaura o infiltrado inflamatório, ocorrendo a destruição de pseudocistos quando transferimos células T de camundongo com trinta dias de infecção (Gonçalves da Costa et al., 1984). Com o emprego de anticorpos monoclonais anti CD4⁺, ficou evidenciado que a depleção deste tipo celular favorece o aumento da parasitemia e a densidade das formas amastigotas nos tecidos, bem como a diminuição do infiltrado inflamatório numa evidência clara sobre o papel das células CD4⁺ na resistência e na patologia da doença de Chagas experimental (Russo et al., 1988). Foi demonstrado que estas células são capazes de provocar a destruição de corações singênicos de camundongos recém-nascidos

transplantados para camundongos adultos (transplante inserido na orelha de camundongos adultos) (Mengel et al., 1988). Em recente publicação, Kierszenbaum (1995) pergunta: “O que estão fazendo realmente as subpopulações de células T na doença de Chagas?” A complexidade da participação destas células requer, evidentemente, muitos estudos. Tarleton (1995) sugere que as células T têm um papel regulador na replicação dos parasitas, não apenas no início da fase aguda, mas também na fase crônica. Nos resultados obtidos por Tarleton et al. (1994), tanto a depleção de células CD8⁺ ou CD4⁺ em torno do 20^o dia e dias subsequentes, resulta numa diminuição moderada da inflamação e no aumento da colonização do coração quando avaliada no 30^o dia da infecção.

Recentemente foi demonstrado que a miocardite chagásica crônica é dependente de subpopulações CD8⁺. O número destas células aparece elevado nos pacientes portadores de lesões contendo antígenos do *T. cruzi*, enquanto as células CD4⁺ permanecem baixas. Esta última observação reforça a proposição de que ocorre uma imunodepressão seletiva na fase crônica da doença (Higuchi, 1996).

4.6.3 Imunomodulação Empregando a Fração de Flagelo Associada ao BCG

O emprego de frações subcelulares como antígenos na tripanosomíase americana determinou o desenvolvimento de métodos especiais de fracionamento visando a pureza das preparações contendo as organelas. Os trabalhos iniciais (Segura et al., 1974, 1977) não apresentavam grau de pureza apreciável, o que constituía um obstáculo sério para a análise bioquímica e imunológica das frações. Visando a obtenção de frações subcelulares com um grau elevado de pureza, foram desenvolvidos alguns métodos para obtenção de frações subcelulares de tripanosomatídeos (Pereira et al., 1978; Dwyer, 1980). Outras investigações confirmaram que o fracionamento subcelular de tripanosomatídeos é complexo e que diferentes frações subcelulares não podem ser obtidas simultaneamente nem empregando um único esquema de fracionamento (Piras et al., 1981). Frações enriquecidas de flagelo de *T. cruzi* têm se mostrado como imunógenos importantes, capazes de induzir resistência e imunidade celular (Segura et al., 1977; Gonçalves da Costa & Lagrange, 1981), mas apresentando uma estrutura complexa. Vários trabalhos têm sido publicados sobre a biologia celular dos flagelos e sua caracterização ultra-estrutural, onde se destaca a estrutura paraxial com vários componentes macromoleculares (Cunha et al., 1984).

No caso do *T. brucei* – causador da doença do sono e de um complexo de doenças de interesse veterinário, em grande parte da África – esses estudos estão bem avançados, tendo sido determinada a principal proteína da estrutura paraxial do flagelo e os genes que a codificam (Schlaeppli et al., 1989). A localização e isolamento de imunógenos do *T. cruzi* é de grande importância, não apenas para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais sensíveis e específicos para a doença de Chagas (Patruco et al., 1978; Petry et al., 1987; Lafaille et al., 1989; Affranchino et al., 1989), como também para melhor conhecimento dos processos imunopatológicos (Carlomagno et al., 1994; Gonçalves da Costa et al., 1994; Hansen et al., 1996).

A fração purificada de flagelo (Pereira et al., 1978) e os antígenos recombinantes FRA e CRA (Lafaille et al., 1989), vêm sendo empregados no Laboratório de Imunomodulação, em estudos imunobiológicos no modelo murino, já que o flagelo se constitui na organela mais importante para a doença de Chagas, do ponto de vista antigênico. Os resultados de estudos comparando a ação imunogênica de diferentes frações subcelulares do *T. cruzi* mostraram que a fração flagelar (FF) tem maior capacidade de induzir proteção e apresenta a vantagem de induzir poucos efeitos imunopatológicos (Ruiz et al., 1985). Outros autores, entretanto, realizando estudos sobre o papel de diferentes componentes da FF têm fornecido resultados interessantes. Com o emprego de anticorpos monoclonais, vários antígenos foram identificados e purificados pela técnica

de imunoafinidade. Um destes antígenos (antígeno 123) apresentou propriedades imunossupressoras, e estudos sobre a seqüência de aminoácidos de alguns peptídeos isolados do antígeno 123 mostraram homologia com as alfa-fetoproteínas humanas e de ratos (Carlomagno et al., 1994).

A capacidade que as micobactérias têm de modificar a resposta imunológica tem sido empregada para fins práticos há longo tempo (Freund & McDermott, 1942), e se baseou na observação de Dienes (1928), que mostrou que quando se inocula um antígeno no local previamente preparado por uma injeção de bacilos da tuberculose mortos, algumas vezes obtemos hipersensibilidade retardada (HR) a estes antígenos. Assim, o adjuvante de Freund completo (AFC) tem sido usado durante muito tempo como a maneira mais efetiva de se obter HR (Lagrange & Hurrell, 1979; Gonçalves da Costa & Lagrange, 1980; Gonçalves da Costa et al., 1986) e resistência, associado ou não a antígenos parasitários (Andrade & Carvalho, 1969; Hommel et al., 1982). O uso de imunostimulantes no tratamento de doenças humanas teve origem nos Estados Unidos da América, com o uso de toxinas bacterianas para o tratamento do câncer por William B. Coley. Um número limitado de agentes, entretanto, se encontra liberado para a clínica médica. Entre eles está o BCG, que é largamente empregado nos Estados Unidos e na Europa no tratamento do câncer de bexiga (ver Hadden, 1993) e do carcinoma escamoso (Bier et al., 1980). Seu emprego com interesse veterinário também ocorre, tendo sido usado no tratamento do carcinoma escamoso da vaca, por aplicação intralesional, com excelentes resultados (Bier et al., 1980). Um grande número de publicações tem mostrado uma certa ação estimulatória da imunidade natural por imunomoduladores como o BCG e o *Corynebacterium parvum*. Estes podem influenciar o curso de infecções parasitárias, como a doença de Chagas experimental (Kierszenbaum, 1975; Brener & Cardoso, 1976; Gonçalves da Costa & Lagrange, 1981), babesiose (Clark et al., 1977), malária (Clark et al., 1976) e leishmaniose (Fortier et al., 1987; Gonçalves da Costa et al., 1988), ou controlar o desenvolvimento de tumores (Bast & Bast, 1976). Injeções intralesionais produzem uma reação inflamatória local capaz de provocar a cicatrização de lesões por *L. braziliensis* (Gonçalves, A. P., comunicação pessoal) e provocar a regressão de tumores (Salomon & Cream-Goldberg, 1980).

Resultados muito interessantes foram observados quando pacientes com câncer de pele, sensibilizados com compostos orgânicos de baixo peso molecular, como o 2,4-dinitrochlorobenzeno, receberam uma segunda dose do produto no local do tumor, ocorrendo a erradicação da lesão (Klein, 1968). A exploração da reação inflamatória como um elemento de controle da propagação de tumores e de infecções, entretanto, tem seus resultados mais importantes quando se baseia no fenômeno de Dienes & Schoenheit (1930): “antígenos comuns como albumina do ovo, proteínas séricas e pólen, induzem uma HR do tipo tuberculínico quando introduzidos no local de uma infecção pelo bacilo tuberculínico”. A exploração que se tem deste fenômeno se deve, em grande parte, aos trabalhos desenvolvidos por George Mackaness e Phillipe Lagrange no Trudeau Institute, Saranac Lake, em Nova Iorque, tendo esta linha de pesquisa mais tarde prosseguido no Instituto Pasteur de Paris. Foi demonstrado que a imunopotenciação exercida pelo BCG sobre o antígeno superposto se estende tanto à imunidade humoral quanto à celular. A resposta imunológica é efetiva quando o BCG e o outro antígeno são introduzidos de forma a serem drenados num linfonodo comum (Miller et al., 1973). A HR induzida pelo eritrócito de carneiro (EC), sem ou com modulação por diferentes agentes (BCG, ciclofosfamida -CY-, AFC, etc.), fornece diferentes tipos de HR (Ohmichi et al., 1976). Desta forma, têm-se desenvolvido estudos em que tumores e diferentes microorganismos são inoculados junto com a dose de revelação do EC nestes diferentes modelos de HR e o crescimento tumoral ou o curso das infecções são acompanhados (Lagrange et al., 1978; Lagrange & Trickston, 1979; Gonçalves da Costa & Lagrange, 1981). Estes diferentes tipos de HR são mediados por diferentes subpopulações de linfócitos T, como foi sugerido inicialmente por Lagrange & Mackaness (1975), Hahn et al. (1979) e mais tarde confirmado.

No caso do *T. cruzi*, o mais primitivo dos processos inflamatórios, um granuloma de corpo estranho, é capaz de promover um certo nível de resistência (De Mesquita, 1979). Um nível maior de resistência é alcançado quando a dose desafio de tripomastigotas é aplicada juntamente com a dose de revelação de HR em camundongos previamente sensibilizados (Gonçalves da Costa & Lagrange, 1980). Em infecções por *L. amazonensis*, entretanto, experimentos similares conduzem a um estado de facilitação (Calabrese & Gonçalves da Costa, 1992) ao passo que uma reação de HR inespecífica, de tipo tuberculínico, confere proteção contra *L. enrietti* (Behin et al., 1977).

Um nível muito mais elevado de resistência tem sido obtido quando se substitui o EC pela fração purificada de flagelo (FPF) (Gonçalves da Costa & Lagrange, 1980, 1981). A substituição da FPF por tripomastigotas viáveis em camundongos previamente tratados pelo BCG e FPF é capaz de revelar uma HR. Esta HR é amplificada pela CY injetada dois dias antes da dose de sensibilização com FPF (Gonçalves da Costa & Lagrange, 1981; Abrahamsohn et al., 1981). A análise histopatológica mostrou um intenso processo inflamatório no local da inoculação da dose de infecção no camundongo tratado pelo BCG e muito mais intensa ainda quando ambos os imunomoduladores são usados.

A CY provoca alterações importantes no fluxo de células leucocitárias (Calabrese et al., 1996) e deve influir no teor de linfocinas que têm um papel crítico no curso de infecções. Após uma fase de depressão, em virtude da ação tóxica da CY, ocorre uma explosão de PMN e monócitos no sangue circulante, em estrita correlação com um aumento da miocardite (Calabrese et al., 1996). Embora estas células monocitárias sejam células hospedeiras de alta afinidade para a multiplicação do *T. cruzi*, os macrófagos têm sido considerados um elemento-chave no controle do parasito, desde que ativados (Hoff, 1975). Assim, a atividade tripanosomicida depende da ativação de células T CD4 pela produção de g-interferon cuja produção vai mediar a ativação macrofágica (McCabe et al., 1991; Vandekerckhove et al., 1994). É interessante assinalar que estas reações de HR são T-dependentes (Lagrange & Trickston, 1979).

Como demonstrou Mackaness (1964), no caso de microorganismos que colonizam macrófagos, o controle da infecção depende essencialmente da imunidade celular, sendo a imunidade humoral insignificante. Um começo efetivo e posterior propagação da resposta imunológica requer a produção de um perfil de linfocinas apropriado que vai influenciar o curso da infecção, como veremos mais adiante.

A resistência à infecção pelo *T. cruzi*, induzida por várias formas de HR no camundongo, de certa forma pode explicar os resultados pouco claros sobre o papel de subpopulações de células T auxiliares no controle desta infecção. O conhecimento que se tem sobre o papel de subpopulações Th na doença de Chagas é menos claro que aquele já estabelecido na leishmaniose tegumentar. A função de células auxiliares e o estudo de secreções de linfocinas vêm sendo desenvolvidos em linhagem de células T, denominada G-05, derivada de linfonodo de camundongo cronicamente infectado (Spinella et al., 1990). Estas células têm o perfil de células Th₂, secretando IL-4 mas não IL-2 ou γ -IFN e induzindo células B a produzir anticorpos, produção esta mediada por linfocinas liberadas em cultura, principalmente IL-4, IL-5 e IL-6. Esta linhagem de células T induz, *in vivo*, a ativação de células B, que produzem principalmente IgG2a e IgG2b (Spinella et al., 1990), de forma semelhante ao que se observa em infecções murinas pelo *T. cruzi*. Esta expressão da célula B é considerada, por muitos autores, como resultado de uma ativação policlonal e a ela tem se dado muita atenção recentemente (Ortiz-Ortiz et al., 1980; D'Imperio Lima et al., 1986; Minoprio et al., 1986a,b; Hontebeyrie-Joskowicz, 1991). É interessante analisar neste aspecto o papel dos anticorpos naturais anti Gal identificados inicialmente por Muniz & Santos (1950), que mostraram que anticorpos com propriedades aglutinantes anti *T. cruzi* se ligam em uma fração polissacarídica presente na superfície deste parasito. Como estes anticorpos são absorvidos dos soros de pacientes chagásicos por eritrócito de carneiro, foram chamados de anticorpos heterófilos. Os aspectos da imunidade humoral na doença de Chagas foram discutidos no Capítulo 4.3.

Agradecimentos: a Luciana Freitas Pereira pelo trabalho de preparação do manuscrito, bem como pela organização de um banco de dados em doença de Chagas e a Marlene Lopes Lucena pela elaboração da Figura 5.

Referências Bibliográficas

- ABRAHAMSOHN, I. A. & COFFMAN R. L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology*, 155:3955-3963, 1995.
- ABRAHAMSOHN, I. A. & COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ , e IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Experimental Parasitology*, 84:231-239, 1996.
- ABRAHAMSOHN, I. A.; BLOTTA, M. H. S. L. & CURROTTO, M. A. Enhancement of delayed-type hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* in mice treated with *Mycobacterium bovis* BCG and cyclophosphamide. *Infection and Immunity*, 31: 1145-1151, 1981.
- AFFRANCHINO, J. L.; IBANEZ, C. F.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; REYES, M. B.; MACINA, R. A.; ASLUND, L.; PETERSSON, U. & FRASH, A. C. C. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during acute phase of Chagas' disease. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 34:221-228, 1989.
- AGUILAR, L. K.; AGUILAR-CORDOVA, E.; CARTWRIGHT, J. R. J. & BELMONT, J. W. Thymic nurse cells are sites of thymocyte apoptosis. *Journal of Immunology*, 152:2645-2651, 1994.
- ALBINA, D. J.; HARMON, B. V. & ROBERTS, S. A. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *Journal of Immunology*, 150:5080-5085, 1993.
- ALIBERTI, J. C. S.; CARDOSO, M. G. A.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q. & SILVA, J. S. IL-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection & Immunity*, 64:1961-1967, 1996.
- ALIBERTI, J. C. S.; MACHADO, F. S.; GAZZINELLI, R. T.; TEIXEIRA, M. M. & SILVA, J. S. Platelet-activating factor induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages and mediates resistance to parasite infection in mice. *Infection & Immunity*, 67:810-814, 1999b.
- ALIBERTI, J. C. S.; MACHADO, F. S.; SOUTO, J. T.; CAMPANELLI, A. P.; TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T. & SILVA, J. S. β -Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection & Immunity*, 67:4819-4826, 1999.
- ALMEIDA, I. C.; MILANI, S. R.; GORIN, P. A. & TRAVASSOS, L. R. Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti- α -galactosyl antibodies. *Journal of Immunology* 146:2394-2400, 1991.
- ANDERSON, G.; MOORE, N. C.; OWEN, J. J. T. & JENKINSON, E. J. Cellular interactions in thymocyte development. *Annual Review Immunology*, 14:73-99, 1996.
- ANDRADE, S. G. & CARVALHO, M. L. Efeito da excitação do sistema reticulo-endotelial pelo adjuvante de Freund, na doença de Chagas experimental. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 11:229-235, 1969.
- ANDRADE, V.; BARRAL-NETTO, M. & ANDRADE, S. G. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 18:499-506, 1985.
- ANDREWS, P. & BOYD, R. L. The murine thymic nurse cell: an isolated thymic microenvironment. *European Journal of Immunology*, 15:36-42, 1985.
- ANTAS, P. R. Z. *Quantificação de proteínas de fase aguda em crianças chagásicas buscando, identificar marcadores da evolução da infecção pelo Trypanosoma cruzi*, 1996. Tese de Mestrado em Biologia Parasitária, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.
- ANTAS, P. R. Z.; MEDRANO-MERCADO, N.; TORRICO, F.; UGARTE-FERNANDEZ, R.; GÓMEZ F.; OLIVEIRA, R. C.; CHAVES A.; ROMANHA A. J. & ARAÚJO-JORGE T. C. Early, intermediate, and late acute stages in Chagas' disease: a study combining anti-galactose IgG, specific serodiagnosis, and polymerase chain reaction analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61:308-314, 1999.
- ARAÚJO-JORGE, T. C.; BARBOSA, H. S. & MEIRELLES, M. N. L. *Trypanosoma cruzi*: recognition by macrophages and muscle cells: opening perspectives after a 15-years study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87 (Suppl.V):43-56, 1992a.
- ARAÚJO-JORGE, T. C.; EL BOUHDIDI, A.; RIVERA, M. T.; DAERON, M. & CARLIER, Y. *Trypanosoma cruzi* infections in mice enhances the membrane expression of low affinity Fc receptors for IgG and the release of their soluble forms. *Parasite Immunology*, 15:539-546, 1993.
- ARAÚJO-JORGE, T. C.; LAGE, M. J. F.; RIVERA, M. T.; CARLIER, Y. & VAN LEUVEN, F. *Trypanosoma cruzi*: enhanced α -macroglobulin levels correlate to resistance of BALB/CJ mice to acute infection. *Parasitology Research*, 78:215-221, 1992b.

- AZNAR, C.; LOPEZ-BERGAMI, P.; BRANDARIZ, S.; MARIETTE, C.; LIEGEARD, P.; ALVES, M. D.; BARREIRO, E. L.; CARRASCO, R.; LAFON, S. & KAPLAN, D. Prevalence of anti-R-13 antibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 12:231-238, 1995.
- BAST, R. C. & BAST, B. S. Critical review of previously reported animal studies of tumor immunotherapy with non specific immuno-stimulants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 277:60-93, 1976.
- BAUMHUETER, S.; SINGER, M. S.; HENZEL, W.; HEMMERICH, S.; RENZ, M.; ROSEN, S. D. & LASKY, L. A. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science*, 262:436-438, 1993.
- BEHBEHANI, K.; PAN, S. C. & UNANUE, E. R. Marked increase in Ia-bearing macrophages during *Trypanosoma cruzi* infection. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 19:90-195, 1981.
- BEHIN, R.; MAUEL, J. & ROWE, D. S. Mechanisms of protective immunity in experimental cutaneous leishmaniasis of the guinea pig. III. Inhibition of leishmania lesion the guinea pig delayed-hypersensitivity reaction to unrelated antigens. *Clinical & Experimental Immunology*, 29:320-325, 1977.
- BEVAN, M. J. In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells. *Nature*, 269:417-418, 1977.
- BIER, J.; PICKARTZ, H.; SCHLESINGER, S.; ZBAR, B.; RAPP, H.; BORSOS, T.; KLEINSCHUSTER, S.; RÖLLINGHOFF, M. & WAGNER, H. Intralesional injection of emulsified BCG-cell walls in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Cancer Immunology and Parasite Immunology*, 97:187-198, 1980.
- BONIFACINO, J. S.; MCCARTHY, S. A.; MAGUIRE, J. E.; NAKAYAMA, T.; SINGER, D. S.; KLAUSNER, R. D. & SINGER, A. Novel post-translational regulation of TCR expression in CD4⁺CD8⁺ thymocytes influenced by CD4. *Nature*, 344: 247-251, 1990.
- BORTH W. A2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB Journal*, 6:3345-3353, 1992.
- BOYD, R. L.; TUCEK, C. L.; GODFREY, D. I.; IZON, D. J.; WILSON, T. J.; DAVIDSON, N. J.; BEAN, A. G. D.; LADYMAN, H. M.; RITTER, M. A. & HUGO, P. The thymic microenvironment. *Immunology Today*, 14:445-459, 1993.
- BRENER, Z. Why vaccines do not work in Chagas' disease. *Parasitology Today*, 2: 196-199, 1986.
- BRENER, Z. The pathogenesis of Chagas' disease: an overview of current theories. In: Chagas' disease and the nervous system. *PAHO Scientific Publication*, 547: 30-46, 1994.
- BRENER, Z. & CARDOSO, J. E. Non-specific resistance against *Trypanosoma cruzi* enhanced by *Corynebacterium parvum*. *Journal of Parasitology*, 62:645-646, 1976.
- BRENER, Z & KRETTLI, A. U. Immunology of Chagas' disease. In: *Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects*. New York: Wyllier DJ, Freeman WH & Co, 1990. p. 247-261.
- BRENIERE, F. S.; CARLIER, Y.; CARRASCO, R.; MOLINEDO, S.; LEMESRE, J. L.; DESJEUX, P.; DESJEUX, P. & AFCHAIN, D. Specific immunodiagnosis of Chagas disease: immunodiffusion test using a specific serum anti-*Trypanosoma cruzi* component 5. *Tropical and Geographical Medicine* 39: 281-286, 1987.
- BRENIERE, S. F.; CARRASCO, R.; MIGUEZ, H.; LEMESRE, J. L. & CARLIER, Y. Comparisons of immunological test for serodiagnosis of Chagas' disease in Bolivian patients. *Tropical and Geographical Medicine*, 37:231-238, 1985.
- BRODSKYN, C. I.; SILVA, A. M. M.; TAKEHARA, H. A. & MOTA, I. Characterization of antibody isotype responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunology Letters*, 18:255-258, 1988.
- BRODSKYN, C. I.; SILVA, A. M. M.; TAKEHARA, H. A. & MOTA, I. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunology and Cellular Biology*, 67:343-341, 1989.
- BRUMPT, E. Pénétration du *Schizotrypanum cruzi* à travers la muqueuse oculaire saine. *Bulletin de la Société de Pathologie Expérimentale*, 5:723, 1912.
- BURLEIGH, B. A. & ANDREWS, N. W. The mechanism of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annual Review of Microbiology*, 49:175-200, 1995.
- BUTCHER, E. C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three or more steps to specificity and diversity. *Cell*, 67:1033-1036, 1991.
- CALABRESE, K. S. & GONÇALVES DA COSTA, S. C. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87 (Suppl. I):49-56, 1992.
- CALABRESE, K. S.; LAGRANGE, P. H. & GONÇALVES DA COSTA, S. C. Chagas' disease: Enhancement of systemic inflammatory reaction in cyclophosphamide treated mice. *International Journal of Immunopharmacology*, 18:505-514, 1996.

- CANDOLFI, E.; HUNTER, C. A. & REMINGTON, J. S. Roles of IFN- γ and other cytokines in suppression of the spleen cell proliferative response to concanavalin A and toxoplasma antigen during acute toxoplasmosis. *Infection & Immunity*, 63:751-756, 1995.
- CARDILLO, F., FALCÃO, R. P., ROSSI, M. A. & MENGEL, J. An age-related T cell suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *European Journal of Immunology*, 23:597-2605, 1993.
- CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J. C.; REED, S. G. & SILVA, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by IFN- γ and IL-10: Role of NK cells. *Infection & Immunity*, 64:128-134, 1996.
- CARDING, S. R.; HAYDAY, A. & BOTTOMLY, K. Cytokines in T-cell development. *Immunology Today*, 12:239-245, 1991.
- CARLIER, Y.; BRENIERE, F. S.; LEMESRE, J. L.; CARRASCO, R.; DESJEUX, P. & AFCHAIN, D. The interest of immunoprecipitation test in the immunological diagnosis of Chagas' disease. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 65:85-94, 1985.
- CARLOMAGNO, M. A.; HANSEN, D.; VILLACRÉS-ERIKSSON, M.; AKERBLUM, L.; HELLMAN, V.; SEGURA, E. L. & MOREIN, B. Immune suppression by *Trypanosoma cruzi* antigens identified by monoclonal antibodies prepared with *Trypanosoma cruzi* ISCOMS. *International Congress of Parasitology*, Izmir, Turquia, 1994. Abstracts, p. 81.
- CHER, D. J. & MOSMANN, T. R. Two types of murine "helper" T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. *Journal of Immunology*, 138:3688-3692, 1987.
- CHIQUET-EHRISMANN, R. Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia*, 51:853-862, 1995.
- CLARK, I. A.; ALLISON, A. C. & COX, F. E. Protection of mice against *Babesia* and *Plasmodium* with BCG. *Nature*, 259: 309-311, 1976.
- CLARK, I. A.; WILLS, E. J.; RICHMOND, J. E. & ALLISON, A. C. Suppression of babesiosis in BCG-Infected mice and its correlation with tumor inhibition. *Infection & Immunity*, 17:430-438, 1977.
- COFFMANN, R. L.; SEYMOUR, B.; LEBMAN, D.; HIRAKI, D.; CHRISTIANSEN, J. SHRADER, B. CHERWINSKI, H.; SAVELKOUL, H.; FILKENMAN, F.; BOND, M. & MOSMANN, T. M. The role of "helper" T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunological Reviews*, 102:5-28, 1988.
- CORONA, S. S.; AMANALES, C.; AVARIA, M. B. & DE LOS, A. Granuloma chagásico del cerebro en un paciente con leucemia linfoblástica. *Revista Médica do Chile*, 116:676-680, 1988.
- COTTA-DE-ALMEIDA, V. *O timo na imunopatologia da doença de Chagas experimental. Estudos sobre as alterações fenotípicas e funcionais na diferenciação e migração intratímicas de células T*, 1996. Tese de Doutorado, Programa de Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.
- COTTA-DE-ALMEIDA, V.; BERTHO, A. L.; VILLA-VERDE, D. M. S. & SAVINO, W. Phenotypic and functional alterations of thymic nurse cells following acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Clinical Immunology Immunopathology*, 82:125-132, 1997.
- COUTINHO, C. M. L. M., CAVALCANTI, G. H., BONALDO, M. C., MORTENSEN, R. F. & ARAÚJO-JORGE, T. C. *Trypanosoma cruzi*: detection of a surface antigen cross-reactive to human C-reactive protein. *Experimental Parasitology*, 90:43-153, 1998.
- CUNHA, N. L.; SOUZA, W. & HASSÓN-VOLOCH, A. Isolation of the flagellum and characterization of the paraxial structure of *Herpetomonas megasaliae*. *Journal of Submicroscopic Cytology*, 16:705-713, 1984.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92: 3541-3545, 1995.
- DALMASSO, A. P. & JARVINEN, J. A. Experimental Chagas' disease in complement-deficient mice and guinea pigs. *Infection & Immunity* 28:434-440, 1980.
- D'AVILA REIS, D.; GAZINELLI, R. T.; GAZINELLI, G. & COLLEY, D. G. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* express idiotypic patterns that can differentiate between patients with asymptomatic or severe Chagas' disease. *Journal of Immunology*, 150: 1611-1618, 1993b.
- D'AVILA REIS, D.; JONES, E. M.; TOSTES, S.; LOPES, E. R.; GAZINELLI, G.; COLLEY, D. G. & CURLEY, M. C. Characterization of inflammatory in chronic Chagas myocardial lesions: Presence of a few TNF- α cells, and a predominance of granzyme A⁺ CD8⁺ lymphocytes. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 48:637-644, 1993a.

- DEL CASTILLO, M.; MENDONZA, G.; OVIEDO, J.; BIANCO, R. P. P.; ANSELMO, A. E. & SILVA, M. AIDS and Chagas' disease with central nervous system tumor-like lesion. *American Journal of Medicine*, 88:693-694, 1990.
- DE MESQUITA, R. P. The protective effect of non-immunologic granulomatous inflammation in *Trypanosoma cruzi* infection of mice. *Revista Brasileira de Biologia*, 39:99-102, 1979.
- DE TITTO, E. H.; CATTERALL, J. R. & REMINGTON, J. S. Activity of recombinant tumor necrosis factor on *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology*, 137:1342-1345, 1986.
- DEUTSCHLÄNDER, N.; VOLLERTHUN, R. & HUNGERER, K-D. Histopathology of experimental Chagas disease in NMRI-mice: a long term study following paw infection. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 29:323-329, 1978.
- DE WAAL MALEFIJT, R.; LEENE, W.; ROHOLL, P. J. M.; WORMMEESTER, J. & HOEBEN, K. A. T cell differentiation within thymic nurse cells. *Laboratory Investigation*, 55:25-34, 1986.
- DIAS, E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 27:1-110, 1934.
- DIENES, L. Further observations concerning the sensitization of tuberculous guinea pigs. *Journal of Immunology*, 15:153-174, 1928.
- DIENES, L. & SCHOENHEIT, E. W. Certain characteristics of the infections process in connection with the influence exerted on the immunity response. *Journal of Immunology*, 19:44-61, 1930.
- D'IMPERIO LIMA, M. R.; EISEN, H.; MINOPRIO, P.; JOSKOWICZ, M. & COUTINHO, A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *Journal of Immunology*, 137:353-356, 1986.
- D'IMPERIO LIMA, M. R.; JOSKOWICZ, M.; COUTINHO, A.; KIPNIS, T. & EISEN, H. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Immunology*, 15:201-203, 1985.
- DING, A.; NATHAN, C. F.; GRAYCAR, J.; DERYNCK, R.; STUEHR, D. J. & SRIMAL S. Macrophages deactivating factor and transforming growth factors-1, 2, 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . *Journal of Immunology*, 145:940-944, 1990.
- DOS REIS, G. & LOPES, M. F. A resposta imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais: Vias de acesso a mecanismos de imunoproteção e de patogênese na doença de Chagas. In: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, Capítulo 9, p.153-169.
- DRAGON, E. A.; BROTHERS, V. M.; WRIGHTSMAN, R. A. & MANNING, J. A Mr. 90000 surface polypeptide of *Trypanosoma cruzi* as a candidate for a Chagas' disease diagnostic antigen. *Molecular Biochemical Parasitology*, 16:213-219, 1985.
- DUTRA, W. O.; LUZ, Z. M.; CANÇADO, J. R.; PEREIRA, M. E.; BRIGIDO-NUNES, R. M.; GALVAO, L. M.; COLLEY, D. G.; BRENER, Z.; GAZZINELLI, G. & CARVALHO-PARRA, J. F. Influence of parasite presence on the immunologic profile of peripheral blood mononuclear cells from chagasic patients after specific drug therapy. *Parasite Immunology*, 18:579-585, 1996.
- DUTRA, W. O.; MARTINS-FILHO, O. A.; CANÇADO, J. R.; PINTO-DIAS, J. C.; BRENER, Z.; FREEMAN JUNIOR, G. L.; COLLEY, D. G.; GAZZINELLI, G. & PARRA, J. C. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas'disease. *International Immunology*, 6:499-506, 1994.
- DWYER, D. M. Isolation and partial characterization of surface membranes from *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Protozoology*, 27:176-182, 1980.
- EL BOUHDIDI, A.; TRUYENS, C.; RIVERA, M. T.; BAZIN, H. & CARLIER, Y. *Trypanosoma cruzi* infection in mice induces a polyisotypic both hypergammaglobulinemia and parasite-specific response involving high levels of IgG2a and highly avid IgG1 antibodies. *Parasite Immunology*, 16:69-76, 1994.
- FEARON, D. & LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272:50-54, 1996.
- FEHSEL, K.; KRÖNCKE, K. D.; MEYER, K. L.; HUBER, H.; WAHN, V. & KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *Journal of Immunology*, 155:2858-2865, 1995.
- FERREIRA, A. W. Tests for Chagas disease serodiagnosis: a review. In: *Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine*. São Paulo: ISBT-Brazil, 1992. p. 179-193.
- FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, S. A.; ROCHA, A.; SILVA, A. M.; FERREIRA, R. G.; OLIVIER, W. & TOSTES Jr, S. Acute fatal *Trypanosoma cruzi* meningoencephalitis in a human immunodeficiency virus-positive hemophiliac patient. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 45:723-727, 1991.

- FICHTELIUS, K. E.; GROTH, O. & LIDÉN, S. The skin, a first level lymphoid organ? *International Archives of Allergy*, 37:607-620, 1970.
- FIorentino, D. F.; BOND M. A. & MOSMANN, T. R. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *Journal of Experimental Medicine*, 179:2081-2095, 1989.
- FORTIER, A. H.; MACK, B. A.; MELTZER, M. S. & NACY, C. A. *Mycobacterium bovis* BCG-induced protection against cutaneous and systemic *Leishmania major* infections of mice. *Infection & Immunity*, 55:1707-1714, 1987.
- FOWLKES, B. J. & PARDOLL, D. M. Molecular and cellular events of T cell development. *Advances in Immunology*, 44:207-264, 1989.
- FRANÇA, L. C. M.; FLEURY, R. N.; RAMOS Jr., H. A.; LEMOS, S.; MELARAGNO FILHO, R. & PASTERNAK, J. Moléstia de Chagas crônica associada a leucemia linfática. Ocorrência de encefalite aguda como alteração do estado imunitário. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 27:59-66, 1969.
- FREUND, J. & MCDERMOTT, K. Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proceedings of Society Experimental Biology and Medicine*, 49:548-553, 1942.
- GAJEWSKI, T. F. & FITCH, F. W. Anti-proliferative effect of IFN- γ in immune regulation. I. IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clone. *Journal of Immunology*, 140:4245-4252, 1988.
- GALLATIN, W. M.; WEISSMAN, I. L. & BUTCHER, E. C. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*, 304:30-34, 1983.
- GALLIARD, H. Envahissement précoce et intense de la cavité abdominale chez la souris au cours des infections a *Trypanosoma cruzi*. *Annales de Parasitologie*, 7:377-380, 1929.
- GAZINELLI, R. T. Natural anti-Gal antibodies prevent, rather than cause autoimmunity in human Chagas' disease. *Research in Immunology*, 42:164-167, 1992.
- GAZZINELLI, G. & BRENER, Z. Immune response in Chagas' disease. *Research in Immunology*, 142:180-182, 1991.
- GAZZINELLI, R. T.; GALVÃO, L. M.; CARDOSO, J. E.; CANÇADO, J. R.; KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. & GAZZINELLI, G. Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-laminin antibodies in chagasic patients after specific treatment. *Journal of Clinical Microbiology* 26:1795-1800, 1988.
- GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L. & SHER, A. The microbicidal activity of IFN- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and TGF- β . *European Journal of Immunology*, 22:2501-2506, 1992.
- GAZINELLI, R. T.; PEREIRA, M. E. S.; ROMANHA, A.; GAZINELLI, G. & BRENER, Z. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: A novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. *Parasite Immunology*, 13:345-356, 1991.
- GIRARD, J. P. & SPRINGER, T. A. High endothelial venules HEVS: Specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunology Today*, 16:449-457, 1995.
- GLUCKSTEIN, D.; CIFERRI, F. & RUSKIN, J. Chagas' disease: another cause of cerebral mass in the acquired immunodeficiency syndrome. *American Journal of Medicine*, 92:429-432, 1992.
- GLUCKSTEIN, D.; RUSKIN, J.; CIFERRI, F.; WEICHL, W. D. & GROGL, M. Chagas' disease: A new case of cerebral mass in AIDS. In: *Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy*, 28, Los Angeles, American Society for Microbiology, 1988. abstr, nº 1230.
- GODFREY, D. I. & ZLOTNIK, A. Control points in early T-cell development. *Immunology Today*, 14:547-553, 1993.
- GOLDEN, J. M. & TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Experimental Parasitology*, 72: 391-402, 1991.
- GOMES, N. A.; PREVIATO, J. O.; ZINGALES, B.; MENDONÇA-PREVIATO, L. & DOS REIS, G. A. Down regulation of T-lymphocyte activation in vitro and in vivo induced by glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*: assignment of the T-cell suppressive determinant to ceramine domain. *Journal of Immunology*, 156:628-635, 1996.
- GONÇALVES DA COSTA, S. C. & LAGRANGE, P. H. Immune modulation which increases resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Cancer Immunology and Parasite Immunology* INSERM, 97:383-405, 1980.
- GONÇALVES DA COSTA, S. C. & LAGRANGE, P. H. Development of cell mediated immunity to flagellar antigens and acquired resistance to infection by *Trypanosoma cruzi* in mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 76:367-381, 1981.
- GONÇALVES DA COSTA, S. C.; BARBOSA SANTOS, E. & LAGRANGE, P. H. Vaccination of mice against *Leishmania mexicana amazonensis* with microsomal fraction associated with BCG. *Annales de l'Institut Pasteur Immunologie*, 139:143-156, 1988.

- GONÇALVES-DA-COSTA, S. C.; CALABRESE, K. S.; BAUER, P. G.; SAVINO, W. & LAGRANGE, P. H. Studies on the thymus in Chagas' disease. III. Colonization of the thymus and other lymphoid organs of adult and newborn mice by *Trypanosoma cruzi*. *Pathology Biology*, 39:91-97, 1991.
- GONÇALVES DA COSTA, S. C.; CALABRESE, K. S.; OLEMANN, W. & LAGRANGE, P. H. , 1994. Immunopotentialization of protective antigens in experimental Chagas' disease. *International Congress of Parasitology*, Izmir, Turquia: Abstracts, p. 82.
- GONÇALVES DA COSTA, S. C.; HURTREL, B. & LAGRANGE, P. H. Non specific resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* strain CL induced by delayed type hypersensitivity to unrelated antigen. *Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro*, 26:15-24, 1986.
- GONÇALVES DA COSTA, S. C.; LAGRANGE, P. H.; HURTREL, B.; KERR, I. & ALENCAR, A. Role of T lymphocytes in the resistance and immunopathology of experimental Chagas' disease. I. Histopathological studies. *Annales d'Immunologie Insitute Pasteur*, 135:317-332, 1984.
- GRANGER, D. & LEHNINGER, A. L. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *Journal of Cell Biology*, 95: 527-35, 1982.
- GRAUERT, M. R.; HOUSSAYER, M. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactivity antibody response in an acute case of human Chagas' disease. *Clinical and Experimental Immunology* 93:85-92, 1983.
- GREGORY, S. H.; WING, E. J.; HOFFMAN, R. A. & SIMMONS, R. L. Reactive nitrogen intermediates suppress the primary immunologic response to *Listeria*. *Journal of Immunology*, 150:2901-2909, 1993.
- GUIDOS, C.; DANSKA, J. S.; FATHMAN, C. G. & WEISSMAN, I. L. T cell receptor-mediated negative selection of autoreactive T lymphocyte precursors occurs after commitment to the CD4 or CD8 lineages. *Journal Experimental Medicine*, 172:835-845. 1990.
- HADDEN, J. W. Immunostimulants. *Immunoogy Today* 14:275-280, 1993.
- HAHN, H.; KAUFMANN, S. H. E.; MILLER, T. E. & MACKANESS, G. B. Peritoneal exudate T-lymphocytes with specificity to sheep red blood cells: I. Production and characterization as to function and phenotype. *Immunology*, 36:691-696, 1979.
- HANSEN, D. S.; ALIEVI, G.; SEGURA, E. L.; CARLOMAGNO, M.; MOREIN, B.; VILLACRES-ERIKSSON, M. The flagellar fraction of *Trypanosoma cruzi* depleted of an immunosuppressive antigen enhances protection to infection and elicits spontaneous T cell responses. *Parasite Immunology* 18:607-615, 1996.
- HARDY, R. R.; CARMACK, C. E.; SHENG, Y. & HAYAKAWA, K. Distinctive developmental origins and specificities of murine CD5+ B cells. *Immunological Reviews*, 137:90-118, 1994.
- HAREL-BELLAN, A.; JOSKOWICZ, M.; FRADELIZI, D. & HEISEN, H. Modification of T-cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 80:3466-3469, 1983.
- HAREL-BELLAN, A.; JOSKOWICS, M.; FRADELIZI, D. & EISEN, H. T lymphocyte function during experimental Chagas' disease: Production of and response to interleukin 2. *European Journal of Immunology*, 15:438-442, 1985.
- HATCHER, F.M. & KUHN, R.E. Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells. *Science* 218:295-296, 1982.
- HATCHER, F.M.; KUHN, R. E.; CERRONE, M. C. & BURTON, R. C. Increased natural killer cell activity in American trypanosomiasis. *Journal of Immunology* 127: 1126-1128, 1981.
- HIGUCHI, M. L. Chronic chagasic myocarditis is *Trypanosoma cruzi* antigen and CD8⁺ T cell-dependent. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91 (Suppl.): 42, 1996.
- HO, J. L.; REED, S. G.; SOBEL, J.; ARRUDA, S.; HE, S. H.; WICK, E. A. & GRABSTEIN, K. H. Interleukin-3 induces antimicrobial activity against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi* and tumoricidal activity in human peripheral blood-derived macrophages. *Infection & Immunity*, 60:1984-1993, 1992.
- HOFF, R. Killing in vitro of *Trypanosoma cruzi* by macrophages from mice immunized with *Trypanosoma cruzi* or BCG, and absence of cross-immunity on challenge in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 142:299-311, 1975.
- HOFFLIN, J. M.; SADLER, R. H.; ARAUJO, F.G.; PAGE, W. E. & REMINGTON, J. S. Laboratory-acquired Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* 81:437-440, 1987.
- HOMMEL, M.; DAVID, P. H.; GURLLOTTE, M. & PEREIRA DA SILVA, L. Protection against *Plasmodium chabaudi* malaria. I - Vaccination of mice with merozoites and Freund's adjuvants. *Annales d'Immunologie Inst. Pasteur*, 133C:57-67, 1982.
- HONTEBEYRIE-JOSKOWICS, M. Murine *Trypanosoma cruzi* infection: a role for Th2 cells in the immunopathology of chronic infection. *Research Immunology*, 142: 141-143, 1991.

- HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Humoral and cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and disease. In: *Chagas' disease and the nervous system*. Washington DC: PAHO, 1994. Sci. Publi. no 547, p. 273-283.
- HOUBEN-DEFRESNE, M. P.; VARLET, A.; GOFFINET, G. & BONIVER, J. Thymic nurse cells are the first site of virus replication after inoculation of the radiation leukemia virus. *Leukemia Research*, 2:231-241, 1982.
- HUNTER, C. A. & ARAUJO, F. IL-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on TNF- α and IFN- γ . *Infection & Immunity*, 64:2381-2386, 1996.
- HUNTER, C. A.; ELLIS-NEYES, L. A.; SLIFER, T.; KANALY, S.; GRUNIG, G.; FORT, M.; RENNICK, D.; ARAUJO, F.G. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology* 158:3311-3316, 1997.
- JAMES, S. L.; KIPNIS, T.; SHER, A. & HOFF, R. Enhanced resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice treated with an interferon inducer. *Infection & Immunity* 35:588-591, 1982.
- JATENE, A. D. Transplante de coração em pacientes com miocardiopatia chagásica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 20 (Supl. II):C5-C6, 1987.
- JOINER, K. A.; DA SILVA, W. D.; RIMOLDI, M. T.; HAMMER, C. H.; SHER, A. & KIPNIS, T. L. Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertase. *Journal of Biological Chemistry*, 263:11327-11335, 1988.
- JOST, L.; TURIN, M.; ETCHEGOYEN, P.; LEIGUARDA, R.; TARATUTO, A. L. & TOFFI, R. Meningoencefalitis chagásica em paciente com tratamento immunosupresor por transplante renal. *Revista Neurologica Argentina*, 3:425-428, 1977.
- KAGAN, I. G. & NORMAN, L. Immunological studies of *Trypanosoma cruzi*. III. Duration of acquired immunity in mice initially infected with a North American strain of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Infections Diseases* 108:213-217, 1961.
- KAHN, S.; WLEKLINSKI, M.; ARUFFO, A.; FARR, A.; CODER, D. & KAHN, M. *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *Journal of Experimental Medicine* 182:1243-1258, 1995.
- KAHN, S. J.; WLEKLINSKI, M.; EZEKOWITZ, R.A.. CODER, D.; ARUFFO, A. & FARR, A. The major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. *Infection & Immunity* 64:2649-2656, 1996.
- KANETO, H.; FUJII, J.; SEO, H. G.; KEIICHIRO, S.; MATSUOKA, T.; NAKAMURA, M.; TATSUMI, H.; YAMASAKI, Y.; KAMADA, T. & TANIGUCHI, N. Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic-cells. *Diabetes*, 44:733-734, 1995.
- KAPPLER, J. W.; ROEHM, N. & MARRACK, P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*, 49:273-280, 1987.
- KIERSZENBAUM, F. Enhancement of resistance and suppression of immunization against experimental *Trypanosoma cruzi* infection by *Corynebacterium parvum*. *Infection & Immunity*, 12:1227-1229, 1975.
- KIERSZENBAUM, F. On evasion of *Trypanosoma cruzi* from the host immune response. Lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic experimental Chagas' disease. *Immunology*, 44:641-648, 1981.
- KIERSZENBAUM, F. What are T-cell subpopulations really doing in Chagas' disease? *Parasitology Today*, 11:6-7, 1995.
- KIERSZENBAUM, F. & HOWARD, J. G. Mechanism of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibody forming in the Biozzi high and low responder mice. *Journal of Immunology*, 116:1208-1211, 1976.
- KIERSZENBAUM, F. & PIENKOWSKY, M. M. Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection & Immunity*, 24:117-120, 1979.
- KIERSZENBAUM, F. & SZTEIN, M. B. Chagas' disease American Trypanosomiasis. In: *Parasitic infections and the immune system*. Academic Press Inc., 1994. p.53-85.
- KIERSZENBAUM, F.; SZTEIN, M. B. & BELTZ, L. A. Decreased human IL-2 receptor expression due to a protozoan pathogen. *Immunology Today*, 10:129-131, 1989.
- KILBOURN, R. G.; KLOSTERGAARD J. & LOPEZ-BERESTEIN, G. Activated macrophages secrete a soluble factor that inhibits mitochondrial respiration of tumor cells. *Journal of Immunology*, 133:2577-2581, 1984.
- KIM, Y. M.; BOMBECK, C. A. & BILLIAR, T. R. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circulation Research* 84 253-256, 1998.
- KIPNIS, T. L.; JAMES, S. L.; SHER, A. & DAVID, J. R. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. II. Antibody-dependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 30: 47-53, 1981.
- KLEIN, E. Tumors of skin. X-Immunotherapy of cutaneous and mucosal neoplasms. *Journal of Medicine*, 68:900-911, 1968.

- KOHL, S.; PICKENING, L. K.; FRANKEL, L. S. & YAEGER, R. G. Reactivation of Chagas' disease during therapy of acute lymphocytic leukemia. *Cancer*, 50: 827-828, 1982.
- KOJ, A. Definition and classification of acute phase proteins. In: *The acute phase response to injury and infection*. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, 1984. p.139-144.
- KRAUTZ, G. M.; COUTINHO, M. G.; GALVÃO, L. M.; CANÇADO, J. R. & KRETTLI, A. U. Soluble antigens released by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes used in ELISA to detect cure in chagasic patients following specific treatment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 27:199-207, 1994.
- KRETTLI, A. U. Resposta imune humoral na doença de Chagas. *Interciência*, 8:374-382, 1983.
- KRETTLI, A. U. & BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *Journal of Immunology*, 116:755-760, 1976.
- KRETTLI, A. U. & BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *Journal of Immunology*, 128:2009-2012, 1982.
- KRETTLI, A. U.; WEISZ-CARPINGTON, P. & NUSSENSZWEIG, R. S. Membrane bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice. Strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. *Clinical and Experimental Immunology*, 37:416-423, 1979.
- KYEWski, B. A. Thymic nurse cells: possible sites of T-cell selection. *Immunology Today*, 12:374-379, 1986.
- KYEWski, B. S. & KAPLAN, H. S. Lymphoepithelial interactions in the mouse thymus: phenotypic and kinetic studies on thymic nurse cells. *Journal of Immunology*, 128:2287-2294, 1982.
- LAFAILLE, J. J.; LINSS, J.; KRIEGER, M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W. & GOLDENBERG, S. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 35:127-136, 1989.
- LAGRANGE, P. H. & HURTEL, B. The influence of BCG vaccination on murine leprosy in C57 BL/6 and C3H mice. *Annales d'Immunologie Institute Pasteur*, 130C: 687-709, 1979.
- LAGRANGE, P. H. & MACKANESS, G. B. A stable form of delayed-type hypersensitivity. *Journal of Experimental Medicine*, 141:82-96, 1975.
- LAGRANGE, P. H. & TRICKSTON, P. M. *In vivo* antitumor activity of various forms of delayed-type hypersensitivity in mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 62:429-436, 1979.
- LAGRANGE, P. H.; TSIANG, H.; HURTREL, B. & RAVISSE, P. Delayed-type hypersensitivity to rabies virus in mice: Assay of active or passive sensitization by the footpad test. *Infection & Immunity*, 21:931-939, 1978.
- LASKY, L. A.; SINGER, M. S.; DOWBENKO, D.; IMAI, Y.; HENZEL, W.J.; GRIMLEY, C.; FENNIE, C.; GILLET, N.; WATSON, S. R. & ROSEN, S. D. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell*, 69:927-938, 1992.
- LAUCELLA, S.; SALCEBO, R.; CASTAÑOS-VELEZ, E.; RIARTE, A.; DE TITTO, E.H.; PATARROYO, M.; ORN, A. & ROTTENBERG, M.E. Increased expression and secretion of ICAM-1 during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*, 18:227-239, 1996.
- LAWRENCE, M. B. & SPRINGER, T. A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, 65:859-873, 1991.
- LEENE, W.; DE WAAL MALEFIJT, R.; ROHOLL, P. J. M. & HOEBEN, K. A. Lymphocyte depletion in thymic nurse cells: A tool to identify in situ lympho-epithelial complexes having thymic nurse cells characteristics. *Cell Tissue Research*, 253:61-68, 1988.
- LEGRÈS, L. G.; POCHON, F.; BARRAY, M.; HEINRICH, P.C.; DELAIN, E. Human α 2-macroglobulin as a cytokine-binding plasma protein. *Annals New York Academy of Sciences*, 737:439-443, 1994.
- LEGUIZAMON, M. S.; CAMPETELLA, O.; RUSSOMANDO, G.; ALMIRON, M.; GUILLEN, I.; GONZALEZ CAPPA, S. M. & FRASCH, A. C. C. Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity in sera from human infections. *Journal of Infectious Diseases*, 170:1570-1574, 1994.
- LEIGUARDA, R.; RONCORONI, A.; TARATUTO, A.L.; JOST, L.; BERTHIER, M.; NOGUES, M. & FREILIG, H. Acute CNS infection by *Trypanosoma cruzi* Chagas' disease in immunosuppressed patients. *Neurology*, 40:850-851, 1990.
- LEITE-DE-MORAES, M. C. *Étude des alterations thymiques et du répertoire des cellules T chez les souris infectées par le Trypanosoma cruzi*, 1993. Ph.D. Thesis. Paris: Université Paris V.
- LEITE-DE-MORAES, C.; HONTEBEYRE-JOSKOWICZ, M.; LÉBOULENGER, F.; SAVINO, W.; DARDENNE, M. & LEPAULT, F. Studies on the thymus in Chagas' disease. II. Thymocyte subset fluctuations in *Trypanosoma cruzi*-infected mice: relationship to stress. *Scandinavian Journal Immunology*, 33: 267-275, 1991.

- LEITE-DE-MORAES, M. C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; DARDENNE, M. & SAVINO, W. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*, 77:95-98, 1992.
- LEITE-DE-MORAES, M. C.; MINOPRIO, P.; DY, M.; DARDENNE, M.; SAVINO, W. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Endogenous IL-10 and IFN- γ production controls thymic cell proliferation in mice acutely infected by *Trypanosoma cruzi*. *Scandinavian Journal Immunology*, 39:51-58, 1994.
- LEMESRE, J. L.; AFCHAIN, D.; OROZCO, O.; LOYENS, M.; BRENIERE, F. S.; DESJEUX, P.; CARLIER, Y.; MARTIN, U.; NOGUEIRA-QUEIROZ, A.; LE RAY, D. & CAPRON, A. Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas' disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *Trypanosoma cruzi*-specific monoclonal antibody. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 35:86-93, 1986.
- LEPOIVRE, M.; CHENAIS, B.; YAPO, A.; LEMAIRE, G.; THELANDER, L. & TENU, J. P. Alterations of ribonucleotide reductase activity following induction of nitrite-generation pathway in adenocarcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 265:14143-14149, 1990.
- LES, W. C. & VAN VOORHIS, W. C. Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *Journal of Infectious Diseases*, 172:1573-1580, 1995.
- LI, Y.; PEZZANO, M.; PHILIP, D.; REID, V. & GUYDEN, J. Thymic nurse cells exclusively bind and internalize CD4⁺CD8⁺ thymocytes. *Cellular Immunology*, 140:495-506, 1992.
- LOPES, M. F. & DOS REIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: Blockade of costimulatory T cell responses in infected hosts due to defective T cell receptor-CD3 functioning. *Infection & Immunity*, 62:1484-1488, 1994.
- LOPES, M. F. & DOS REIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: selective triggering of CD4⁺ T-cell death by the T-cell receptor CD3 pathway and not by the CD69 or Ly-6 activation pathway. *Infection & Immunity*, 64: 1559-1564, 1996.
- LOPES, M. F.; DA VEIGA, V. F.; SANTOS, A. R.; FONSECA, M. E. F. & DOS REIS, G. A. Activation-induced CD4⁺ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *Journal of Immunology*, 154:744-752, 1995.
- LUZ, M. R. P.; VAN LEUVEN, F. & ARAÚJO-JORGE, T. C. Heterogeneity on the plasma levels of two acute phase proteins in mice from inbred strains during *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Research*, 80:439-441, 1994.
- LUZ, M. R. M. P.; VAN LEUVEN, F. & ARAÚJO-JORGE, T. C. Heterogeneity on the synthesis of alpha-macroglobulins in outbred Swiss albino mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 81:662-667, 1995.
- McHARDY, N. Passive immunization of mice against *Trypanosoma cruzi* using convalescent mouse serum. *Tropenmedizin Parasitologie*, 28:195-201, 1977.
- MACKANESS, G. B. The immunological basis of acquired cellular resistance. *Journal of Experimental Medicine*, 120:105-120, 1964.
- MAJUMDER, S. & KIERSZENBAUM, F. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi*-induced down-regulation of lymphocyte function. Inhibition of transcription and expression of IL-2 receptor γ (p64IL-2R) and β (p70IL-2R) chain molecules in activated normal human lymphocytes. *Journal of Immunology*, 156:3866-3874, 1996.
- MARINHO, C. R.; D'IMPERIO-LIMA, M. R.; GRISOTTO, M. G. & ALVAREZ, J. M. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infection & Immunity* 67:308-318, 1999.
- MARTIN, U. O.; TAIBL, A.; LOYENS, M.; MAIDANA, C.; CORNETTE, J.; CANDOITI, C.; MARTELEUR, A.; AFCHAIN, D.; MARTY, B.; VELGE, P.; OAISSI, M. A. & CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi*: IgM antibodies to 84 kDa polypeptide epitope as a possible marker of the acute phase of human Chagas' disease. *Medical Science Research*, 18:725-726, 1990.
- MARTINEZ, O. M.; GIBBONS, R. S.; GAROVOY, M. R. & ARONSON, F. R. IL-4 inhibits IL-2 receptor expression and IL-2-dependent proliferation of human cells. *Journal of Immunology*, 144:2211-2215, 1990.
- MARTINS, G. A.; CARDOSO, M. G. A.; ALIBERTI, J. C. S. & SILVA, J. S. Nitric oxide-induced apoptotic cells death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunology Letters* 63:113-120, 1998.
- MARTINS, G. A.; VIEIRA, L. Q.; CUNHA, F. Q. & SILVA, J. S. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infection & Immunity* 67:3864-3871, 1999.
- MARTINS, M. S.; HUDSON, L.; KRETTLI, A. U.; CANÇADO, J. R. & BRENER, Z. Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Clinical and Experimental Immunology* 61:343-350, 1985.

- MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, M. E.; CARVALHO, J. F.; CANÇADO, J. R. & BRENER, Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. *Clinical Diagnostic for Laboratory Immunology* 2:569-573, 1995.
- MCCABE, R. E.; MEAGHER, S. G. & MULLINS, B. T. Endogenous interferon, macrophage activation, and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Infectious Diseases*, 163:912-915, 1991.
- MEDRANO-MERCATO, N.; LUZ, M. R. M. P.; CABELLO, P.; TAPIA, G. T.; VAN LEUVEN, F. & ARAÚJO-JORGE, T. C. Acute Chagas' disease: plasma levels of α -2-macroglobulin and C-reactive protein in children under 13 years in a high endemic area of Bolivia. *Journal of Tropical Pediatrics*, 42:68-74, 1996a.
- MEDRANO-MERCATO, N.; LUZ, M. R. M. P.; TORRICO, F. T.; TAPIA, G. T.; VAN LEUVEN, F. & ARAÚJO-JORGE, T. C. Acute phase proteins and serological profiles of chagasic children from an endemic area in Bolivia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54:154-161, 1996b.
- MENESES, A. C. O.; ROCHA, A.; FERREIRA, M. S.; NETO, A. N.; TORQUATO Jr., G.; ALMEIDA, E. A.; METZE, K.; MACIEL Jr., J. A. & LOPES, E. R. AIDS and Chagas' disease. In: *Neuropathology International Scientific Exchange*, Niteroi, 1992. p. 2.
- MENGEL, J. O.; LANS, J. L.; ROSSI, M. M. O.; ROSSI, M. A.; SAVINO, W. & RIBEIRO DOS SANTOS, R. Anticardiac muscle autoreactive lymphocytes in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* bear the CD4 phenotype. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83 (Suppl. I):167, 1988.
- MEYER ZUM BUSCHENFELDE, C.; CRAMER, S.; FLEISCHER, B.; FROSCH, S. Resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice does not necessarily correlate with production of interferon-gamma *in vivo*. *Medical and Microbiological Immunology (Berl)* 187:107-113, 1998.
- MILANI, S. R. & TRAVASSOS, L. R. Anti- α -galactosyl antibodies in chagasic patients. Possible biological significance. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 21:1275-1278, 1988.
- MILLER, T. E.; MACKANESS, G. B. & LAGRANGE, P. H. Immunopotentiality with BCG. II. Modulation of the response to sheep red blood cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 51:1669-1676, 1973.
- MINOPRIO, P.; CURY-EL-CHEIKH, M.; ROSS, D.; COUTINHO, A.; EISEN, H. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICS, M. Chagas' disease: consequence of unbalanced immune system. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86 (Suppl. I):39-40, 1991.
- MINOPRIO, P.; CURY-EL-CHEIKH, M.; MURPHY, E.; HONTEBERYE-JOSKOWICS, M.; COFFMAN, R.; COUTINHO, A. & O'GARRA, A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease in IFN- γ -dependent. *Journal of Immunology*, 151:4200-4208, 1993.
- MINOPRIO, P.; EISEN, H.; JOSKOWICZ, M.; PEREIRA, P. & COUTINHO, A. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. *Journal of Immunology*, 139:545-550, 1987.
- MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEUSSER, C.; TONEGAWA, S. & COUTINHO, A. Immunobiology of murine *Trypanosoma cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunological Reviews*, 112:183-207, 1989.
- MINOPRIO, P.M.; COUTINHO, A.; JOSKOWICZ, M.; D'IMPERIO LIMA, M.R. & EISEN, H. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 24: 669-679, 1986b.
- MINOPRIO, P.M.; EISEN, H.; FORNI, L.; D'IMPERIO LIMA, M.R.; JOSKOWICZ, M. & COUTINHO, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scandinavian Journal of Immunology*, 24:661-668, 1986a.
- MONTÉON, V.; FURUZAWA-CARBALLEDA, J.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; ARANDA-FRAUSTRO, A.; ROSALES-ENCINA, J.L. & REYES, P. A. American trypanosomiasis: *in situ* and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. *Experimental Parasitology*, 83:267-274, 1996.
- MONTEVERDE, D.A.; TARATUTO, A.L. & LUCATELLI, N. Meningoencefalite chagásica aguda en pacientes inmunossuprimidos. *Revista Neurológica Argentina*, 2:260-266, 1976.
- MOSMANN, T. R. & SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today*, 17:138-146, 1996.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M.A. & COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*, 136: 2348-2355, 1986.
- MUNIZ, J. & SANTOS, M. C. F. Heterophile antibodies in American trypanosomiasis. *O Hospital*, 38:601-610, 1950.

- NABORS, G. S. & TARLETON, R. L. Differential control of IFN- γ and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology*, 146:3591-3598, 1991.
- NGUYEN, T.; BRUNSON, D.; CRESPI, C. L.; PENMAN, B. W.; WISHNOK, J. S. & TANNENBAUM, S. R. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 89: 3030-3034, 1992.
- NICKOLOFF, B. J. Role of Interferon- γ in cutaneous trafficking of lymphocytes with emphasis on molecular and cellular adhesion events. *Archives of Dermatology*, 124:1835-1843, 1988.
- NOGUEIRA, N. & COHN, Z.A. *Trypanosoma cruzi*: *in vitro* induction of macrophage microbicidal activity. *Journal of Experimental Medicine*, 148:288-300, 1978.
- NOGUEIRA, N.; GORDON, S. & COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: the immunological induction of macrophage plasminogen activator requires thymus-derived lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 146:172-183, 1977a.
- NOGUEIRA, N.; GORDON, S. & COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: modification of macrophage function during infection. *Journal of Experimental Medicine*, 146: 157-171, 1977b.
- NOGUEIRA, N.; ELLIS, J.; CHAPLAN, S. & COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: *in vivo* and *in vitro* correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. *Experimental Parasitology*, 51:325-334, 1981.
- NORRIS, K. A.; BRADT, B.; COOPER, N. R. & SO, M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *Journal of Immunology* 147:2240-2247, 1991.
- NORRIS, K. A.; GALVÃO, L. M. C.; SCHRIMPF, J. E.; CANÇADO, J. R. & KRETTLI, A. U. Humoral immune response to the *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein as an indicator of parasitologic clearance in human Chagas' disease. *Infection & Immunity*, 62:4072-4074, 1994.
- ODDÓ, D.; CASANOVA, M.; ACUNA, G.; BALESTEROS, J. & MORALES, B. Acute Chagas' disease, trypanosomíasis americana, in acquired immunodeficiency syndrome: report of two cases. *Human Pathology*, 23:41-44, 1992.
- OHMACHI, Y.; NOMOTO, K.; YAMADA, H. & TAKEYA, K. Relationship among differentiated T-cell sub-populations. I - Dissociated development of tuberculin-type hypersensitivity, Jones-Mote hypersensitivity and activation of helper function. *Immunology*, 31:101-110, 1976.
- OKABE, K.; KIPNIS, T. L.; CALICH, V. L. G. & DIAS DA SILVA, W. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. I. Antibody dependent cell mediated cytotoxicity to trypomastigotes bloodstream forms. *Clinical Immunology & Immunopathology*, 46:344-353, 1980.
- OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. *Interações celulares heterotípicas durante a diferenciação intratímica de linfócitos T: estudo em camundongos nocautes*, 1997. Tese de Doutorado. Programa de Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.
- ORTIZ-ORTIZ, L.; PARKS, D. E.; RODRIGUEZ, M. & WEIGLE, W. O. Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology*, 124:121-126, 1980.
- OUAISSI, M. A. Role of RDG sequence in parasite adhesion to host cells. *Parasitology Today*, 4:169-173, 1988.
- OUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; AFCHAIN, D.; CAPRON, A.; GRAS-MASSE, H. & TARTAR, A. *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. *Science*, 234:603-306, 1986.
- PARANHOS-BACALLA, G. S.; SANTOS, M. R. M.; COTRIM, P. C.; RASSI, A.; JOLIVET, M.; CAMARGO, M. E. & DA SILVEIRA, J. F. Detection of antibodies in sera from Chagas' disease patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. *Parasite Immunology*, 16:165-169, 1994.
- PATRUÇO, A.; CERISOLA, J. A.; MICHEL, M.; CHIALE, P.; ALVAREZ, M. & SEGURA, E. L. Flagellar antigens and the leucocyte migration-inhibition test in Chagas patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 72:425-426, 1978.
- PELEMAM, R.; WU, J.; FARGEAS, C. & DELESPESE, G. Recombinant IL-4 suppresses the production of IFN- γ by human mononuclear cells. *Journal of Experimental Medicine*, 170:1751-1756, 1989.
- PENNINGER, J. & WICK, G. Thymic nurse cell lymphocytes react against self major histocompatibility complex. *European Journal of Immunology*, 22:79-83, 1992.
- PEREIRA, N. M.; TIMM, S. L.; GONÇALVES DA COSTA, S. C.; REBELLO, M. & DE SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: isolation and flagellar fractions. *Experimental Parasitology*, 46:225-234, 1978.
- PETRY, K.; SCHOTTELIUS, J. & BALTZ, T. H. Characterization of a 19.000 mol. wt. flagellum-specific protein of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma dionisii* and *Trypanosoma vespertilionis* by monoclonal antibody. *Parasitology Research*, 73:180-181, 1987.

- PHILP, D.; PEZZANO, M.; LI, Y.; OMENE, C.; BOTO, W. & GUYDEN, J. The binding, internalization, and release of thymocytes by thymic nurse cells. *Cellular Immunology*, 148:301-315, 1993.
- PIMENTA DE MELLO, R. A new method for detection of cancer cells in peripheral blood using the Bertalanffy's fluorochrome method. *Acta Cytologica*, 7:62-65, 1963.
- PIRAS, M. P.; DE RODRIGUEZ, O. O. & PIRAS, R. *Trypanosoma cruzi* antigenic composition of axonemes and flagellar membranes of epimastigotes culture *in vitro*. *Experimental Parasitology*, 51:59-73, 1981.
- PIZZI, T.; CROIZET, V. A.; SMOK, G. & DIAS, M. Enfermedad de Chagas en un paciente con transplante renal y tratamiento inmunosupresor. *Revista Medica do Chile*, 110:1207-1211, 1982.
- POWELL, M. R.; MORGAN, J.; GUARNER, J. & COLLEY, D.G. Cytokine mRNA levels in the hearts of inbred mice that develop different degrees of cardiomyopathy during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology* 20:463-471, 1998.
- REED, S. G. *In vivo* administration of recombinant IFN- γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Journal of Immunology*, 140: 4342-4347, 1988.
- REED, S.G. Immunology of *Trypanosoma cruzi* infections. *Chemical Immunology* 70:124-143, 1998.
- REED, S. G.; BROWNELL, C. E.; RUSSO, D. M.; SILVA, J. S.; GRABSTEIN, K. H. & MORRISSEY P. J. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology*, 153:3135-3140, 1994.
- REED, S. G.; NATHAN, C. F.; PIHL, D. L.; RODRICK, S. P.; SHANEBECK, K.; CONLON, P. J. & GRABSTEIN, K. H. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. *Journal of Experimental Medicine*, 166:1734-1746, 1987.
- REED, S. G.; PIHL, D. L. & GRABSTEIN, K. H. Immune deficiency in chronic *Trypanosoma cruzi* infection. Recombinant IL-1 restores Th function for antibody production. *Journal of Immunology*, 142:2067-2071, 1989.
- REVELLI, S.; GOMEZ, L.; WIETZERBIN, J.; BOTTASSO, O. & BASOMBRIO, M. A. Levels of tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukins 4,6, and 10 as determined in mice infected with virulent or attenuated strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research* 85:147-150, 1999.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; ROSSI, M. A.; LAUS, J. L.; SANTANA-SILVA, J.; SAVINO, W. & MENGEL, J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal Experimental Medicine*, 175:29-39, 1992.
- ROCHA, A.; MENEZES, A. C.O.; SILVA, A. M.; FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, S. A.; BURGARELLI, M. K. N.; ALMEIDA, E.; TURCATO Jr, G.; METZE, K. & LOPES, E. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 50:261-268, 1994.
- ROCKETT, K. A.; AWBURN, M. M.; ROCKETT, E. J.; COWDEN, W. B. & CLARK, I.A. Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression. *Parasite Immunology*, 16:243-249, 1994.
- ROMAÑA, C. Contribuição ao conhecimento da patogenia da tripanosomose americana: período inicial de infecção. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 39:253-264, 1943.
- ROSEMBERG, S.; CHAVES, C. J.; HIGUSHI, M. L.; LOPES, M. B. S.; CASTRO, L. H. M. & MACHADO, L. R. Fatal meningoencephalitis caused by reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in a patient with AIDS. *Neurology*, 42:640-642, 1992.
- ROTTENBERG, M. E.; BAKHIET, M.; OLSSON, T.; KRISTENSSON, K.; MAK, T.; WIGZELL, H. & ORN, A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *Infection & Immunity*, 61:5129-5133, 1993.
- RUIZ, A. M.; ESTEVA, M.; CABEZA MECKERT, P. & LAGUENS, M. Protective immunity and pathology induced by inoculation of mice with different subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 42:299-309, 1985.
- RUSSO, M. & STAROBINAS, N. Macrophage activation and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Research on Immunology*, 142:144-146, 1991.
- RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; MINOPRIO, P.; COUTINHO, A. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi* infected mice after inactivation of helper T cells. *Annales d' Immunologie Institute Pasteur*, 139:225-236, 1988.
- RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; MINOPRIO, P.; EISEN, H. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*, 11:385-395, 1989.
- SALOMON, J. C. & CREAM-GOLDBERG, N. Treatment of primary methylcholanthrene induced tumors by intramural BCG. In: Israel, Lagrange & Salomon, *Cancer Immunology and Parasite Immunology*, INSERM, 97:255-265, 1980.

- SANDERSON, C. J.; LOPEZ, A. F. & BUNN MORENO, M. M. Eosinophils and not lymphoid K cells kill *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Nature*, 268: 340-341.
- SANTOS-LIMA, E. C. & MINOPRIO, P. Chagas' disease is attenuated in mice lacking gamma delta T cells. *Infection & Immunity* 64:215-221, 1996.
- SARIH, M.; SOUVANNAVONG, V. & ADAM, A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 191:503-508, 1993.
- SAVINO, W. The thymic microenvironment in infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85:255-260, 1990.
- SAVINO, W.; LEITE DE MORAES, M. C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. & DARDENNE, M. Studies on the thymus in Chagas' disease. I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Immunology*, 19:1727-1733, 1989.
- SAVINO, W.; LEITE DE MORAES, M. C.; SILVA BARBOSA, S. D.; FONSECA, E. C.; COTTA DE ALMEIDA, V. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Is the thymus a target organ in infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87 (Suppl. V):73-78, 1992.
- SAVINO, W.; VILLA VERDE, D. M. S. & LANNES VIEIRA, J. Extracellular matrix proteins in intrathymic T cell migration and differentiation? *Immunology Today*, 14:158-161, 1993.
- SCHARFSTEIN, J.; BARCINSKI, M. A. & LEON, L. L. Indication of the acute-phase protein serum amyloid P in experimental Chagas' disease. *Infection & Immunity*, 35:46-51, 1982.
- SCHLAEPPI, K.; DEFLOIRIN, J. & SEEBECK, T. The major component of the paraflagellar rod of *Trypanosoma brucei* is a helical protein that is encoded by two identical, tandemly linked genes. *Journal of Cell Biology* 109(4 Pt 1):1695-1709, 1989.
- SCHLEIFER, K. W. & MANSFIELD, J. M. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. *Journal of Immunology*, 151:5492-5503, 1993.
- SCHMUNIS, G. A.; CAPP, S. M. G.; TRAVERSA, O. C. & JANOVSKY, K. The effects of immuno-depression due to neonatal thymectomy on infections with *Trypanosoma cruzi* in mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 65:89-94, 1971.
- SCOTT, M. T. Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* in mice: specific suppressor cells in chronic infection. *Immunology* 44:409-417, 1981.
- SCOTT, M. T. & GOSS-SAMPSON, M. Restricted IgG isotype profiles in *Trypanosoma cruzi* infected mice and Chagas' disease patients. *Clinical Experimental Immunology*, 58:372-379, 1984.
- SEGURA, E. L.; CURA, E. N.; PAULONE, L.; VAZQUEZ, C. & CERISOLA, J. A. Antigenic makeup of subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Protozoology*, 21:571-574, 1974.
- SEGURA, E. L.; VAZQUEZ, C.; BRONZINA, A.; CAMPOS, J. M.; CERISOLA, J. A. & GONZALEZ CAPP, S. M. Antigens of the subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. II - Flagellar and membrane fraction. *Journal of Protozoology*, 24:540-543, 1977.
- SICHER, C. S.; VAZQUEZ, M. A. & LU, C. Y. Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide. *Journal of Immunology*, 153:1293-1300, 1994.
- SILVA, A. C.; ESPINOZA, A. G.; TAIBI, A.; OUAISSI, A.; MINOPRIO, P. A 24,000 MW *Trypanosoma cruzi* antigen is a B-cell activator. *Immunology* 94:189-196, 1998.
- SILVA, J. S.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDERSON, D. & REED, S. G. IL-10 and IFN- γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 175:169-174, 1992.
- SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R. & REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by TGF- β . *Journal of Experimental Medicine*, 174: 539-545, 1991.
- SILVA, J. S.; VESPA, G. N.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C. & CUNHA, F. Q. TNF- α mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected IFN- γ -activated macrophages. *Infection & Immunity*, 63:4862-4867, 1995.
- SILVERSTEIN, A. M. *A history of immunology*. New York: Acad. Press, 1989. p. 269.
- SNAPPER, C. M. & MOND, J. J. A model for induction of T-cell independent humoral immunity in response to polysaccharide antigens. *Journal of Immunology*, 157: 2229-2233, 1996.
- SPINELLA, S.; LIEGEARD, P. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. *Experimental Parasitology*, 74:6-56, 1992.

- SPINELLA, S.; MILON, G. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. A CD4⁺ Th2 cell line isolated from mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* induces IgG2 polyclonal response *in vivo*. *European Journal of Immunology*, 20:1045-1051, 1990.
- SPRENT, J.; LO, D.; GAO, E.-K. & RON, Y. T cell selection in the thymus. *Immunological Reviews*, 101:73-190, 1988.
- STADNYK, A. & GAULDIE, J. The acute phase protein response during parasitic infection. *Immunology Today* 12:A7-A12, 1991.
- STAROBINAS, N.; RUSSO, M.; MINOPRIO, P. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Is TNF- α involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? *Research in Immunology*, 142:177-122, 1991.
- STEEL, D. M. & WHITEHEAD, A. S. The major acute phase reactants: C-Reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunology Today*, 15:81-87, 1994.
- STEFANI, M. M. A.; MÜLLER, I. & LOUIS, J. *Leishmania major*-specific CD8⁺ T cells are inducers and targets of nitric oxide produced by parasitized macrophages. *European Journal of Immunology*, 24:746-752, 1994.
- STERNBERG, J. & MCGUIDAN, F. Nitric oxide mediates suppression of T cell responses in murine *Trypanosoma brucei* infection. *European Journal of Immunology*, 22:2741-2744, 1992.
- STOUT, R. D. & BOTTOMLY, K. D. Antigen specific activation of effector macrophages by IFN- γ producing Th1. T cell clones. Failure of IL-4-producing Th2. T cell clones to activate effector function in macrophages. *Journal of Immunology*, 142:760-765, 1989.
- SZARFMAN, A., TERRANOVA, V. P., RENNARD, S. I., FOIDART, J.-M., LIMA, M. F., SCHEINMAN, J. ., MARTIN, G. R. Antibodies to laminin in Chagas' disease. *Journal of Experimental Medicine* 155:1161-1171, 1982.
- TAIBI, A.; GUEVARA-ESPINOZA, A.; SCHONECK, R.; YAHIAOUI, B. & OUAISSI, A. Improved specificity of *Trypanosoma cruzi* identification by polymerase chain reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein. *Parasitology* 111:581-590, 1995.; errata em *Parasitology*, 112:437, 1996.
- TAKEHARA, H. A.; PERINI, A.; DA SILVA, M. H. & MOTA, I. *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Journal of Experimental Medicine*, 52:137-146, 1981.
- TAKLE, G. B. & HUDSON, L. Autoimmunity and Chagas' disease. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 145:79-92, 1988.
- TAMBOURGI, D. V.; KIPNIS, T. L. & DIAS DA SILVA, W. *Trypanosoma cruzi*: antibody-dependent killing of bloodstream trypomastigotes by mouse bone marrow-derived mast cell and by mastocytoma cells. *Experimental Parasitology*, 68:192-201, 1989.
- TANAKA, Y.; ADAMS, D. H. & SHAW, S. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunology Today*, 14: 111-115, 1993.
- TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M. & WITTNER, M. Chagas' disease. *Clinical Microbiology Review*, 5: 400-419.
- TAPIA, F. J., CÁCERES-DIFFMAR, G. & SÁNCHEZ, M. A. 1994. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology Today*, 15:160-165, 1992.
- TARLETON, R. L. Tumor necrosis factor cachectin. Production during experimental Chagas' disease. *Clinical Experimental Immunology*, 73:186-190, 1988.
- TARLETON, R.L. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology*, 144:717-724, 1990.
- TARLETON, R.L. Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Experimental Parasitology*, 73:106-109, 1991.
- TARLETON, R.L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Today*, 1:7-9, 1995.
- TARLETON, R. L.; KOHLER, B. H.; LATOUR, A. & POSTAN, M. Susceptibility of β_2 -microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*, 356:338-340, 1992.
- TARLETON, R. L.; SUN, J.; ZHANG, L. & POSTAN, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infection & Immunity*, 62:1820-1829, 1994.
- TRUYENS, C.; ANGELO-BARRIOS, A.; TORRICO, F.; VAN DAMME, J.; HEREMANS, H. & CARLIER, Y. Interleukin-6 production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral response. *Infection & Immunity*, 62:692-696, 1994.
- TRUYENS, C.; RIVERA, M. T.; OUAISSI, A. & CARLIER, Y. High circulating levels of fibronectin and antibodies against its RDG adhesion site during mouse *Trypanosoma cruzi* infection: relation to survival. *Experimental Parasitology*, 80 499-506, 1995.

- UMEKITA, L. F.; TAKEHARA, H. A. & MOTA, I. Role of the antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. *Immunological Letters*, 17:85-89, 1988.
- VANDEKERCKHOVE, F.; DARJI, A.; RIVERA, M. T.; CARLIER, Y.; VRAY, B.; BILLIAU, A. & DE BAETSELIER, P. Modulation of T-cell responsiveness during *Trypanosoma cruzi* infection: analysis in different lymphoid compartments. *Parasite Immunology*, 16:77-85, 1994.
- VAN DE WIJNGAERT, F. P.; KENDALL, M. D.; SCHUURMAN, H.-J.; RADEMAKERS, L. H. P.M. & KATER, L. Heterogeneity of epithelial cells in the human thymus. An ultrastructural study. *Cell Tissue Research*, 237:227-237, 1984.
- VAN VLIET, E.; MELIS, M. & EWIJK, W. V. Immunohistology of thymic nurse cells. *Cellular Immunology*, 87:101-109, 1984.
- VESPA, G. N. R.; CUNHA, F. Q. & SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infection & Immunity*, 62:5177-5182, 1994.
- VILALTA, E.; ZHANG, Y.; BIBB, K. E.; KAPPES, J. C. & LIMA, M. F. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infection & Immunity* 66:4690-4695, 1998.
- VILLA-VERDE, D. M. S.; MELLO COELHO, V.; LAGROTA-CANDIDO, J.; CHAMMAS, R. & SAVINO, W. The thymic nurse cell complex: an *in vitro* model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, 28:2259, 1995.
- VON BOEHMER, H. & KISIELOW, P. Lymphocyte lineage commitment: instruction *versus* selection. *Cell*, 73:207-208, 1993.
- VON BOEHMER, H.; SWAT, W. & KISIELOW, P. Positive selection of immature T cells. *Immunological Reviews*, 135:67-79, 1993.
- WEKERLE, H. & KETELSEN, U-P. Thymic nurse cells-Ia-bearing epithelium involved in T-lymphocyte differentiation? *Nature*, 283:402-404, 1980.
- WICK, G. & OBERHUBER, G. Thymic nurse cells: a school for alloreactive and autoreactive cortical thymocytes? *European Journal of Immunology*, 16:855-858, 1986.
- WICK, G.; RIEKER, T. & PENNINGER, J. Thymic nurse cells: a site for positive selection and differentiation of T cells. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 173:99-105, 1991.
- WIRTH, J. J. & KIERSZENBAUM, F. Fibronectin enhances macrophage association with invasive forms of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology*, 133:460-464, 1984.
- WIRTH, J. J. & KIERSZENBAUM, F. Recombinant tumor necrosis factor enhances macrophage destruction of *Trypanosoma cruzi* in the presence of bacterial endotoxin. *Journal of Immunology*, 141:286-288, 1988.
- WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S. & WATSON, J. Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing the parasitemia and survival. *Infection & Immunity*, 36:637-644, 1982.
- WU, L.; SCOLLAY, R.; EGERTON, M.; PEARSE, M.; SPANGRUDE, G. J. & SHORTMAN, K. CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature*, 349:71-74, 1991.
- ZHANG, L. & TARLETON, R. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by *in situ* immunohistochemistry: lack of dissociation between susceptibility and type 2 cytokine production. *European Journal of Immunology*, 26:102-109, 1996.