



*Este exemplar entregue
ao núcleo final da tes
para o trabalho de
defesa da tese
de doutorado
em imunologia
na Universidade
Estadual de Campinas.*

ELIZABETH MALAGUEÑO DE SANTANA

TRYPANOSOMA CRUZI: RESPOSTA HUMORAL NO INÍCIO DA INFECÇÃO EM
CAMUNDONGOS "INBRED"

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como um dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Ciências (área de Imunologia).

ORIENTADOR: Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

CAMPINAS - SÃO PAULO

1990

Este exemplar corresponde
ao livro de defesa de
pelo l.

ELIZABETH MALAGUEÑO DE SANTANA

Trypanosoma cruzi: resposta humoral
no início da infecção em camundongos "inbred"

CAMPINAS - SP
1990

Trypanosoma cruzi: resposta humoral

no início da infecção em camundongos "inbred"

A

VALFRIDO,

RICARDO e FERNANDO

pelo apoio e compreensão

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia é diferentes setores que compõem o Departamento de Microbiologia e Imunologia pelos laboratórios e recursos fornecidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Universidade Federal de Pernambuco, em particular, aos Departamentos de Medicina Tropical e Patologia pela concessão de afastamento.

Ao Biotério Central da UNICAMP (CEMIB) e aos seus técnicos e funcionários pelo pronto atendimento aos nossos pedidos de camundongos.

Ao Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel pela orientação e constante apoio e ensinamentos.

À Profa. Júlia K. Sakurada (I.B-UNICAMP) pela Co-orientação, discussão e ensinamentos.

Ao Prof. Marcos G. Costa (I.B-UNICAMP) pela orientação e ajuda na realização de PFCs e análise crítica deste trabalho.

Aos Profs. Irineu B. Camargo, Leonilda Barbosa dos Santos e Paulo Ferreira de Araújo (I.B-UNICAMP) pela análise crítica e sugestões.

Ao Prof. Manoel Ricardo da Costa Carvalho (Deptº de Medicina Social da UFPE) pela análise estatística dos resultados, ensinamentos e exemplo de colaboração profissional.

Ao Prof. José Figueredo da Silva (Deptº de Patologia da UFPE) pela

análise histopatológica.

Aos Profs. Marlene Ueta, Wirla Tamashiro, Marlene Serafim, Ana Maria Guaraldo, Silvia Gatti (I.B-UNICAMP) pela colaboração e amizade.

Aos colegas Luciano Montenegro, Nicodemos Pontes e Paulo Miranda por assumirem minha carga didática enquanto durou a parte experimental deste trabalho.

Aos colegas Paulo P. Andrade e José V. Santana pelas inúmeras correções de forma e linguagem na redação deste trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação em Imunologia pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do Deptº de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP , D. Amália, D. Alzira, Célia e Dirce pela colaboração técnica.

A todos os que de alguma ou outra forma colaboraram para a elaboração e êxito deste trabalho

MEUS AGRADECIMENTOS

A parte experimental deste trabalho
foi realizada no Departamento de
Microbiologia e Imunologia da UNICAMP
- Campinas, SP.

RESUMO

Diferentes parâmetros de resposta humoral foram analisados em camundongos suscetíveis CBA/J, resistentes C₅₇BL/10 e o híbrido resistente (C₅₇BL/10 x CBA/J) F₁, durante os primeiros 20 dias de infecção com 100 tripanosomas da cepa Y.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os títulos de anticorpos específicos para as formas amastigotas e tripomastigotas. IgG₁, IgG_{2a} e IgG_{2b} não diferiram entre as linhagens. Porém, os camundongos CBA/J apresentaram discreto aumento inicial de IgM.

As formas tripomastigotas isoladas da linhagem suscetível não apresentaram imunoglobulinas do hospedeiro na superfície do parasito, enquanto estas foram detectadas nos parasitos de camundongos resistentes.

Todos os soros do 20º dia pós-infecção, precipitaram antígenos de Mr na faixa de 94 a 84 kDa, além de polipeptídeos 50 kDa. Apenas C₅₇BL/10, reconhece polipeptídeos de Mr 60 kDa.

Os anticorpos detectados nas três linhagens, neste período, não apresentaram efeito tripanosomicida na ausência ou presença de complemento murino, parecendo não exercerem função no controle inicial da parasitemia.

A análise de estimulação espontânea de PFC para hemácias de carneiro, revelou ativação precoce das células esplênicas nos camundongos CBA/J, com súbita depressão a partir do 15º dia. A cinética de ativação policlonal dos camundongos (C₅₇BL/10 x CBA/J) F₁ é diferente. A raça C₅₇BL/10 atinge o máximo de ativação no 20º dia, enquanto o híbrido F₁, apresenta dois picos: um no 5º e outro no 20º dias após infecção.

A correlação com os achados histopatológicos do baço das raças estudadas, demonstrou maior dano tecidual e parasitose na raça CBA/J. O significado destes achados é discutido.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	01
MATERIAL E MÉTODOS	08
- PARASITOS	08
- ANIMAIS	08
- INFECCÃO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS	08
- DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA	09
- OBTENÇÃO DE COMPLEMENTO	09
- OBTENÇÃO DE SOROS DE ANIMAIS INFECTADOS DURANTE OS PRIMEIRO 20 DIAS DE INFECCÃO SORO DE FASE AGUDA INICIAL (F.A.i.)	10
- OBTENÇÃO DE SORO IMUNE DE FASE CRÔNICA (S.C.)	10
- ISOLAMENTO DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS	10
- REAÇÕES DE IMUNOFLOURESCÊNCIA	11
PREPARAÇÃO DE ANTÍGENOS	11
REAÇÕES DE IMUNOFLOURESCÊNCIA DIRETA	12
REAÇÕES DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA	12
- IMUNOFLOURESCÊNCIA COM TRIPOMASTIGOTAS VIVOS	13
- REAÇÃO DE ELISA	13
- DETECÇÃO DE CÉLULAS FORMADORAS DE ANTICORPOS ANTI-HEMÁCIAS DE CARNEIRO (PFC-DIRETAS)	15
- ESTUDO HISTOPATOLOGICO DOS BAÇOS DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS...	15
- DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	16
- REAÇÕES DE IMUNOPRECIPITACAO COM LISADOS DE TRIPOMASTIGOTAS...	16
- PESQUISA DE ANTICORPOS LÍTICOS NOS SOROS F.A.i.	19
- ANÁLISE ESTATISTICA	20

RESULTADOS	21
- PARASITEMIA E MORTALIDADE DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM 100 FORMAS TRIPOMASTIGOTAS	21
- AÇÃO BIOLÓGICA DE TRIPOMASTIGOTAS SANGUÍCOLAS ISOLADOS PELO HYPAQUE: CAPACIDADE INFECTANTE	22
- PESQUISA DE IMUNOGLOBULINAS ADSORVIDAS NA SUPERFÍCIE DE TRIPOMASTIGOTAS ISOLADOS DE CAMUNDONGOS CBA/J E (C57BL/10 x CBA/J) F ₁	22
- CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS PARA ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE DO <u>T. CRUZI</u> NOS SOROS F.A.i.	25
- ISÓTIPOS DE IMUNOGLOBULINAS ANTI-TRIPOMASTIGOTAS	25
- ISÓTIPOS DE IMUNOGLOBULINAS ANTI-AMASTIGOTAS PRESENTES EM SOROS DE FASE AGUDA INICIAL (F.A.i.)	27
- NÍVEIS TOTAIS DE ANTICORPOS PARA LISADOS DE TRIPOMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS	29
- NÍVEIS TOTAIS DE ANTICORPO PARA ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE.....	29
- REATIVIDADE DOS SOROS F.A.i. CONTRA FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DE SU - PERFÍCIE DAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS	31
- PROPRIEDADES DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS AO LONGO DA FASE INICI - AL DA INFECÇÃO	33
- EFEITO DA CAPACIDADE LÍTICA DOS SOROS F.A.i. NA INFECTIVIDADE	38
- EFEITO DA INFECÇÃO ESPONTÂNEA DE ANTICORPOS ANTI-HEMÁCIAS DE CARNEIRO	40
- ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DOS BAÇOS	44
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

INTRODUÇÃO

Na natureza os seres vivos se relacionam entre si, de modo a assegurar a continuidade da espécie. Nestas interações, estabelecem-se associações onde uma das partes obtém mais proteção ou nutrientes a partir de outro organismo, geralmente mais evoluído. Esta associação expoliativa unilateral, é identificada como Parasitismo.

De um modo geral, a associação é perfeita quando tende para o equilíbrio, garantindo assim a sobrevivência de ambas as partes. Um parasito não pode encurtar a vida do hospedeiro sem prejuízo da sua perpetuação como espécie. Para atingir este equilíbrio de expoliação constante, mas, não lesiva, insuficiente para provocar a resposta agressora do hospedeiro, longos períodos de interação foram permitindo a adaptação parasito-hospedeiro numa associação muito antiga.

A infecção pelo Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi (CHAGAS, 1909) é um exemplo deste fenómeno de interações mútuas.

Desde os primeiros trabalhos de CHAGAS (1918, 1924), é conhecido o caráter zoonótico da trypanosomiasis americana. O Trypanosoma cruzi infecta pelo menos oito ordens diferentes de mamíferos silvestres, que são reservatórios naturais do parasito. Entre alguns dos diferentes mamíferos hospedeiros da protozoonose, citados por PEREIRA & BARRETO (1979), estão: morcêgos, tatus, tamanduás, preguiças, macacos, furões e gambás e mais de 50 espécies diferentes de roedores silvestres.

JANSEN (1988) descreve a associação que se estabelece entre diversas cépas de T. cruzi e gambá (Didelphis marsupialis), que a autora estima num

provável convívio de 70 milhões de anos. Os gambás infectados experimental ou naturalmente, eliminaram rapidamente cêpas de T. cruzi, virulentas para camundongos (cêpas Y e Fl); enquanto convivia com outras cêpas menos virulentas, como a cêpa F, por um período superior a dois anos sem apresentar qualquer tipo de lesão devida à parasitose. Os tripanossomas que se estabelecem no gambá, após algum tempo desapareceram da circulação, porém os títulos de anticorpos específicos para T. cruzi se mantiveram inalterados.

Análises mais detalhadas, revelaram que os parasitos localizavam-se nas criptas da glândula anal, onde se multiplicavam na forma de epimastigotas extracelulares e aparentemente, conseguiam se proteger da ação dos anticorpos do hospedeiro.

O homem entrou na cadeia epidemiológica recentemente, na medida em que afastou os insetos vetores dos seus hospedeiros silvestres, naturais, e apesar de um convívio com o T. cruzi de aproximadamente 2500 anos, ainda não está perfeitamente adaptado (ROTHHAMER, 1985).

No entanto, indivíduos inseridos diretamente na cadeia epidemiológica, teriam conseguido estabelecer algum tipo de resistência natural frente a infecção pelo T. cruzi, como pode ser observado em estudos epidemiológicos realizados entre índios de diferentes regiões do Brasil (DEANE, et al., 1963; DEANE, 1965).

Segundo a OMS (WHO, 1974), as populações de áreas endêmicas podem apresentar frente a infecção, padrões de suscetibilidade diferentes, compondo três grupos característicos: a) indivíduos que dificilmente se infectam; b) indivíduos que adquirem a infecção, porém não apresentam doença de Chagas que os leve a óbito e c) indivíduos que adquirem a infecção e morrem de Doença de Chagas.

Os indivíduos do primeiro grupo, seriam completamente resistentes à

infecção. O parasito não conseguiria superar as barreiras naturais do hospedeiro sem chegar a parasitá-lo. Os indivíduos do segundo grupo, aparentemente conseguem desenvolver um equilíbrio parasito-hospedeiro harmônico, sem danos entre ambos. O terceiro grupo de indivíduos, menos numeroso, desenvolveria toda a patologia da Doença de Chagas, quer seja, por um excesso de resposta imune como tem sido proposto, para justificar os fenômenos autoimunes descritos por alguns autores (SANTOS-BUCH et al., 1974; TEIXEIRA et al., 1975 ; KIERSZEMBAUM, 1986 e COUTINHO, 1988) ou pela incapacidade do sistema imune de neutralizar fatores lesivos do parasito que dariam origem a reações inflamatórias exacerbadas, desencadeando uma cascata de lesões tissulares (TAFURI, 1987 e KOBERLE, 1968).

Esta variação da resistência, também é observada nos camundongos que vem sendo utilizados como modelo experimental para o T. cruzi. As diferentes raças de camundongos desenvolvem um espectro de suscetibilidade que vai desde os animais resistentes que sobrevivem à infecção aguda, eliminando os parasitos circulantes, até os animais altamente suscetíveis que morrem logo após o pico de parasitemia

No modelo murino a infecção evolui de acordo com fatores específicos da cêpa do parasito (ANDRADE, 1985; POSTAN, et al., 1983), carga parasitária e porta de entrada (CORSINI, 1980 e MURFIN, 1989), além de fatores intrínsecos ao camundongo, como: idade (CULBERTSON & KESSLER, 1983), sexo (HAUSCHKA, 1974) e sobretudo, a raça do animal (PIZZI, et. al., 1949; TRISCHMANN et. al., 1978). Estudos realizados por TRISCHMANN, et.al., (1982) , demonstraram através de cruzamentos entre raças C₃H/An suscetível e C₅₇BL/10 resistente que a resistência é um caráter dominante, porém, controlado por mais de um gene, como observado através de retrocruzamentos dos F₂ resistentes com o parental suscetível. Os autores também determinaram que o haplotipo H-2^k nos camundongos suscetíveis, tem alguma importância na maior mortalidade, porém, não no

controle da parasitemia.

Em geral, altas parasitemias são comumente achadas na fase inicial da infecção pelo T. cruzi em camundongos suscetíveis, enquanto que as raças resistentes, controlam a parasitemia sem aparecimento de lesões letais e, eliminam os parasitos localizados nos tecidos nesta fase (OLIVEIRA, 1982). É possível verificar que altas parasitemias não necessariamente provocam morte do animal.

Camundongos resistentes, C₅₇BL/10 depletados de linfócitos B ou T (SCOTT, 1981) ou tratados com sílica, para alterar o funcionamento das células fagocitárias ou irradiados (TRISCHMANN et al., 1978 e TRISCHMANN, 1986), previamente a infecção pelo Tripanossoma, mostraram aumento significativo da parasitemia, atingindo valores próximos aos alcançados pelos animais suscetíveis. Estas experiências confirmaram o envolvimento da resposta imune do hospedeiro no controle da parasitemia.

Durante a infecção são produzidos anticorpos que desempenham importante papel no controle da parasitose. Este fato ficou bem estabelecido a partir das experiências em que camundongos geneticamente selecionados como maus produtores de anticorpos (camundongos Biozzi), os quais são suscetíveis à infecção pelas cepas Tulahuen e Y, foram protegidos pela administração passiva de soros imunes (KIERSZEMBAUM, 1976).

A transferência passiva de plasma de camundongos com 28 a 42 dias de infecção para camundongos infectados um dia antes, diminuiu nestes últimos, a parasitemia e a mortalidade (Mc HARDY, 1980). Segundo o autor, estes anticorpos presentes no plasma teriam função no período pré-patente durante a multiplicação do parasito no hospedeiro.

A transferência passiva de soros obtidos de camundongos resistentes -

tes (C57BL/10 x CBA/J) F₁ na fase crônica da infecção, diminuiu significativamente a mortalidade de camundongos suscetíveis CBA/J, quando realizada uma hora antes de infectar estes últimos animais com dose letal de 10^5 tripomastigotas da cêpa Y (LOUREIRO, 1985).

WIRTH & KIERSZEMBAUM (1987), demonstraram em experiências "in vitro" que os soros de fase crônica poderiam também agir sobre os tripomastigotas metacíclicos, impedindo sua penetração em células suscetíveis.

TAKEHARA et al. (1981) e SCOTT et al. (1984) demonstraram o envolvimento do isótipo IgG2 nestes fenômenos de proteção.

O modo como estes anticorpos exerceriam a função protetora até hoje não está bem definido, apesar da abundância de trabalhos abordando a questão (TEIXEIRA, 1987). O que se conclui é que, estes anticorpos teriam função opsonizante, participariam em reações de citotoxicidade mediada por anticorpos (ADCC), e seriam líticos para formas tripomastigotas.

SCOTT & MOYES (1982) observaram que a opsonização de formas tripomastigotas com soro de fase crônica facilitavam a depuração dos parasitos pelas células fagocitárias esplênicas e hepáticas. Posteriormente, foi demonstrado por UMEKITA et al. (1988) que a fração da IgG destes soros facilitava a depuração das formas tripomastigotas sanguíneas através da ativação do C₃ do complemento. Tanto as formas tripomastigotas sanguíneas como metacíclicas eram facilmente fagocitadas pelos macrófagos estimulados (KIERSZEMBAUM, 1985).

Anticorpos líticos foram identificados em soros humanos e de camundongos em fase crônica. Estes anticorpos seriam específicos para a superfície das formas tripomastigotas sanguíneas, a qual se fixariam, ativando o complemento com conseqüente lise do parasito (KRETTLI et al, 1979).

A transferência passiva destes anticorpos conferia proteção contra in

fecção pelo T. cruzi a camundongos suscetíveis (KRETTLI & BRENER, 1976). Este efeito foi conseguido também, utilizando anticorpos monoclonais específicos para a superfície das formas tripomastigotas sanguíneas (HUDSON & GUHL, 1987).

Tem-se observado que estes anticorpos pertencem aos isótipos IgG2, provavelmente IgG2b (STEPHANI, et.al. 1983; ROMEIRO, et.al. 1984) e que fixariam complemento humano ou de cobaio através da via alternativa, visto que, fragmentos de IgG Fab e F(ab)'₂ mas não Fc, promovem a lise (KIPNIS, et.al. , 1985). Estas imunoglobulinas, pareciam agir sobre a superfície do parasito , facilitando a ativação da cascata do complemento, de modo similar a ação da tripsina sobre a superfície das formas tripomastigotas (KIPNIS, et. al. 1987).

Os estudos que analisam a especificidade dos anticorpos líticos , não são conclusivos. Por exemplo: a experiência de MARTINS et al. (1985) sugere que estes seriam específicos para antígenos de Mr 160 e 70 kDa, enquanto que YOSHIDA (1986) identificou anticorpos líticos com especificidade para polipeptídeos de Mr 77, 88 e 82 kDa, utilizando tripomastigotas metacíclicos das cepas CL e G.

Existem diferentes hipóteses sobre os mecanismos reais envolvidos no controle da parasitose: se este é exercido através de lise do parasito, ou de opsonização e fagocitose ou de ambos, as evidências até aqui não são conclusivas.

Todos os trabalhos referidos anteriormente foram realizados com anticorpos produzidos durante a fase crônica por camundongos que superaram a fase aguda. Muito pouco se conhece sobre os eventos celulares e humorais que acontecem na fase aguda, apesar da importância que esta tem na evolução da infecção.

Intensa proliferação celular com ativação policlonal de todos os

isótipos, foi observada por MINOPRIO et. al. (1986), utilizando raças suscetíveis de camundongos C3H infectados pelas cêpas Y ou Cl, assim como, aumento progressivo de células produtoras de IgM e IgG específicas para T. cruzi da cêpa Brasil (TARLETON et. al., 1983). Do início da infecção até o 129 dia, haveria intensa estimulação da população de células T - auxiliaadoras para posteriormente serem reguladas pelas células T - supressoras até a fase crônica (TARLETON & SCOTT, 1987).

O controle exagerado exercido pelas células supressoras se refletiria na imunossupressão descrita por LALONDE et. al. (1985); CORSINI & COSTA (1981) e TARLETON e KUHN (1985), após os primeiros dias de infecção.

A nível sérico, foi possível verificar cinética semelhante de produção de anticorpos (SCOTT et. al., 1984), estes autores observaram que havia uma produção inicial de IgM até a 3a. semana após infecção e que os níveis de isótipos de IgG aumentaram progressivamente, até atingir valores máximos na 6a. semana.

TRISCHMANN (1986) sugere a existência de um controle precoce da proliferação parasitária, que seria efetivo durante as duas primeiras semanas de infecção, parecendo depender parcialmente de linfócitos T mais não de células NK ou interferon. Segundo o autor, este controle precoce é decisivo, os fenômenos que possam ocorrer mais tarde, teriam menor importância no controle da infecção, sendo inútil nesta fase, tentar estabelecer algum mecanismo.

Frente a estes questionamentos ainda sem resposta, propusemos estudar a fase aguda inicial, começando por uma análise da resposta humoral, tentando correlacionar com anticorpos de importância no controle das formas tripomastigotas bem estudadas na fase crônica. Assim como, estabelecer uma comparação das respostas iniciais entre as raças suscetíveis CBA/J, resistentes C57BL/10 e o híbrido de ambos (C57BL/10 x CBA/J) F₁ de maior resistência que o parental resistente.

MATERIAL E MÉTODOS

PARASITAS

Formas tripomastigotas de Trypanosoma cruzi da cepa Y (PERREIRA DA SILVA e NUSSENZWEIG, 1953), vem sendo mantidas no laboratório desde 1970, por infecção semanal em camundongos swiss de três meses de idade, através de inoculações intraperitoneais de 10^5 formas sangüíneas.

Para os propósitos deste trabalho, os parasitas foram adaptados por passagens sucessivas semanais em camundongos CBA, utilizando como inóculo infectante, formas tripomastigotas na concentração de 10^5 . Estes parasitas foram utilizados tanto para a infecção experimental, como fonte de antígeno.

ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos de 3 meses de idade das linhagens CBA/J (CBA), C57BL/10 (C57), swiss e (C57BL/10 x CBA/J) F1 (F1), provenientes do Biotério Central da UNICAMP. Durante as experiências foram alimentados com ração para biotérios e água "ad libitum".

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS

Camundongos das diferentes linhagens em estudo, foram infectados pela inoculação intraperitoneal de 100 formas tripomastigotas da cepa Y.

DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA

O número de parasitas foi determinado segundo TRISCHMANN et al. (1980). O sangue de camundongos infectados era misturado numa diluição de 1:10 com cloreto de amônio 0,87%, a fim de lisar as hemácias. O número de parasitas vivos era contado em câmara de Neubauer e expressas em número de parasitas/mL de sangue.

OBTENÇÃO DE COMPLEMENTO

- a) Complemento de cobaio - Cinquenta cobaios normais foram sangrados através de punção cardíaca. A separação dos soros foi realizada individualmente em banho de gelo. Em seguida, fez-se um "pool" de soros que, foi separado em alíquotas e mantido em freezer a -70 C. Previamente ao uso, o soro era absorvido com papa de hemácias, para eliminar os anticorpos heterófilos. Estas alíquotas de soros foram utilizadas como fonte de complemento, para realizar a técnica de PFC direta.
- b) Complemento de camundongos - Seguindo as instruções de KLAUSS et. al. (1979), foi obtido um "pool" de soros de camundongos F1 normais sangrados individualmente. Toda a operação de separação foi realizada a -4 C.
- c) Complemento humano - Soros obtidos de indivíduos normais, estudantes e funcionários da UNICAMP, foram separados em alíquotas de 0,2mL e mantidos até o momento de uso a -70 C.

OBTENÇÃO DE SOROS DE ANIMAIS INFECTADOS DURANTE OS PRIMEIROS 20 DIAS DE INFECÇÃO: SORO DE FASE AGUDA INICIAL (F.A.i.)

Grupos de 50 camundongos das raças em estudo, foram infectados com 100 tripomastigotas. Os animais foram sangrados pela veia cava superior nos dias 0, 5, 10 e 20 após a infecção. A comprovação da parasitemia foi realizada no 99 dia, em animais escolhidos ao acaso nos diferentes grupos.

Os soros foram separados a 5 C, e novamente centrifugados a 1040 g por 15 minutos, a fim de eliminar uma possível contaminação por tripomastigotas. Prévio ao uso, os soros foram incubados a 56 C durante 30 minutos.

OBTENÇÃO DE SORO IMUNE DE FASE CRÔNICA (S.C.)

Dois grupos de animais de ambos os sexos, de linhagem híbrida (C₅₇BL/10 x CBA/J) F1, foram inoculados com 100 parasitas. A parasitemia foi controlada a partir do 99 dia. Após 42 dias, contados do início da inoculação, os animais foram sangrados e, o soro separado conforme condições descritas acima para F.A.i. Antes do uso, o soro foi incubado a 56 C.

ISOLAMENTO DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS

Camundongos infectados foram sangrados pelo plexo braquial. O sangue colhido com heparina (20 U/mL), foi diluído 1:2 em meio de Hanks e depositado

na superfície de igual volume de Hypaque (diatrizoato de sódio, Wintrop labs.) já diluído a uma concentração de 10% em Hanks. O gradiente assim formado, era rapidamente centrifugado a 192 g a 4 C durante 25 minutos.

O sobrenadante foi aspirado totalmente, evitando-se ressuspender a interfase rica em leucócitos. Diluía-se o sobrenadante 1:3 em meio de Hanks, a fim de diminuir a viscosidade e favorecer a sedimentação dos tripanossomas, quando centrifugados a 1700 g por 20 min. a 4 C. As lavagens subsequentes foram realizadas com Hanks adicionado de soro bovino fetal 1%. O rendimento obtido com este método é de aproximadamente 63%, com uma baixa contaminação de leucócitos e plaquetas.

Dependendo das necessidades de uso, o soro bovino fetal era substituído por BSA ou, simplesmente retirado.

Os tripomastigotas assim obtidos, foram utilizados nas experiências de lise, imunofluorescência direta, imunoprecipitação e virulência após tratamento com soros S.A.

REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

PREPARAÇÃO DE ANTÍGENOS

Formas tripomastigotas - isoladas, foram submetidas a tratamentos específicos conforme a necessidade:

- a) Tripomastigotas formolados: A suspensão de parasitas foi fixada e tratada segundo indicações de CAMARGO (1966);
- b) Tripomastigotas vivos: Os parasitas foram lavados com PBS adicionado de soro bovino fetal 5% e azida sódica 0.2%, quando necessária.

Formas amastigotas: Foram isoladas a partir de culturas de células HeLa mantidas em meio RPMI 1640 (Flow Lab.) contendo 10% de soro fetal bovino a 37 C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após 7 dias de incubação, as formas amastigotas foram separadas por gradiente de hypaque 10%, lavadas com meio Hanks e posteriormente, formolizadas com salina fosfatada 0,01 M pH 7,2 contendo 2% de formaldeído.

REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

As formas tripomastigotas foram isoladas de camundongo, separadas em gradiente de hypaque e protegidas com azida sódica 0,2%. As lavagens foram realizadas com meio de Hanks sem soro bovino fetal. Aliquotas de 50 µL contendo aproximadamente 10⁶ tripomastigotas, foram incubadas com igual volume de soro de coelho anti-Imunoglobulina de camundongo FITC, durante 40 minutos a 37 C. O conjugado não ligado, foi lavado duas vezes com PBS e a fluorescência observada em microscópio de luz ultravioleta (u.v.) com aumento de 40 x.

REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Os diferentes soros F.A.i, foram titulados segundo a técnica de CAMARGO (1966). Como antígenos foram utilizadas preparações formolizadas de tripomastigotas e amastigotas fixadas na lâmina.

Os soros imunes de coelho dirigidos contra os diferentes isótipos de imunoglobulinas de camundongo, foram gentilmente cedidos pela Dra. J. Sakurada.

Como conjugado, foi utilizado IgG de carneiro anti Ig de coelho FITC, diluído 1:30.

IMUNOFLUORESCÊNCIA COM TRIPOMASTIGOTAS VIVOS

Os testes de Imunofluorescência com tripomastigotas vivos foram realizados segundo as instruções de KRETTLI et. al. (1979).

Suspensões de 10^6 tripomastigotas sangüíneas, foram incubadas com soros F.A.i, durante 30 minutos a 37 C em banho maria. Após este tempo, os parasitas foram lavados duas vezes em tampão PBS - BSA 1% - azida 0.2% a 1732gx 15 min. e ressuspensos à metade do volume inicial. Incubados a 4 C durante 2 horas com soro de carneiro anti-Ig de camundongo FITC diluído 1:30. Após retirada do excesso de conjugado, mediante lavagens, a suspensão de parasitas foi examinada ao microscópio U.V. com aumento de 400 x. Como controle de qualidade da reação, foi utilizado sempre um soro crônico na diluição de 1:50.

REAÇÃO DE ELISA

Antígeno: Suspensões salinas de tripomastigotas de cultura (7×10^7 formas/mL) foram lisadas por congelamento e descongelamento e, posteriormente, submetidas a ultra-som com uma frequência de 40 watts durante três horas e meia. O material assim solubilizado, foi separado por centrifugação (12.100 g por 30 min.).

Sensibilização das placas: O antígeno foi incubado na concentração de 3 µg por poço, em placas de microaglutinação de fundo chato (Petecil)

durante 18 h a 4 C.

A técnica de ELISA descrita por VOLLER et. al. (1976) foi modificada e adaptada às condições do laboratório, conforme descrição abaixo:

- lavagens das placas com PBSCT (PBS + 1% caseína e 0,05% tween) durante três vezes para retirar o excesso de antígeno;
- bloqueio com PBSCT por 2 h a temperatura ambiente;
- lavagem uma vez com PBSCT;
- incubação com as diluições dos soros (100 μ L) durante 1 h e lavadas 5 vezes com PBSCT;
- incubação com soro de coelho anti-Ig de camundongo conjugado a peroxidase, diluído 1:100 (100 μ L) durante 1 h a 37 C e lavadas com PBSCT;
- a reação foi revelada pela adição de 100 μ L do cromógeno o-phe-nilendiamina (Sigma) na concentração de 300 μ g/mL, em tampão citrato 0,1 M, pH 5,0 suplementado com 0,1% do substrato peróxido de hidrogênio.

A reação enzimática foi interrompida após 15 min com 10 μ L de ácido sulfúrico 4 M.

A absorvância foi determinada a 488 nm num "micro ELISA Reader" (BIORAD), estabelecendo como padrão de positividade duas vezes o desvio padrão da média obtida de determinações de 4 "pools" de soros de camundongos swiss normais.

Os níveis de anticorpos foram expressados como título.

Uma vez marcados, os parasitas foram lavados duas vezes em solução de Hanks por centrifugação a 1732 g por 20 min a 4 C lisados por incubação de 10 min a 37 C com uma mistura contendo N-P40 (Nonidet P-40, Sigma) 1% (v/v), 40 mM de Tris-HCl pH 7,5 e inibidores de proteases PMSF 1 mM (Fenil metilsulfonilfluoreto, Sigma) e TLCK 1 mM (N-tosil-L-lisilclorometilcetona, Sigma).

Os lisados foram centrifugados a 4.340 g por 30 min. a 4 C e os sobrenadantes estocados a - 70 C até o momento de uso.

c) Imunoprecipitação

Realizada segundo a técnica descrita por ZINGALES et. al., (1982). A um mililitro dos lisados iodinados, descritos acima, foram adicionados 100 μ L de Staphylococcus aureus. Esta mistura foi incubada por 15 min a temperatura ambiente com agitação esporádica, centrifugada a 4340 g por 30 min a 4 C.

O sobrenadante pré-clareado, foi dividido em alíquotas equivalentes a 5×10^7 parasitas e incubados em alíquotas iguais dos soros S.A. em estudo, durante 120 min a 4 C com agitação ocasional. Após este tempo, foi adicionado a mistura, volume igual de Staphylococcus aureus, reincubando-se a temperatura ambiente durante 30 minutos com agitação esporádica.

Os complexos assim formados, foram lavados duas vezes em tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,5 com EDTA 1 mM e NaCl 0,3 M e, uma vez com Tampão Tris-HCl 7,5 adicionado de NaCl 0,3 M e 0,1% de SDS (Sodium dodecilsulfato, Sigma) e 0,05% de N-P40 por centrifugação a 4340 g por 30 min a 4 C.

Os imunoprecipitados foram ressuspensos em 50 μ L de tampão amostra indicado por TAKACS (1979): 10 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% de 2-Mercaptoetanol (Sigma), glicerol 20%, SDS 1%, e 0.01% de azul de bromofenol e incubados a

DETECÇÃO DE CÉLULAS FORMADORAS DE ANTICORPOS ANTI-HEMÁCIAS DE CARNEIRO (PFC - DIRETAS)

Grupos de 60 camundongos CBA e 25 de cada uma das outras raças, foram infectados experimentalmente da maneira usual.

Nos dias 5, 10, 15 e 20 após a inoculação, grupos de cinco destes animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os baços retirados, macerados em homogeneizador, lavados três vezes com meio MEM+SBF 1%, sendo processado em seguida a modificação para lâmina da técnica de PFC de Jerne (DRESSER et al., 1973). Foram utilizadas diluições celulares de 1:2 e 1:4.

Após fixação com PBS contendo 4% de formol, as placas de hemólise, foram contadas e os resultados submetidos a análise estatística.

Utilizou-se como controles, grupos de 5 animais normais, para cada grupo de animais experimentais.

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DOS BAÇOS DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS

Os baços de dois camundongos infectados com 100 formas tripomastigotas, eram retirados 48 horas após infecção e a cada cinco dias. Estes órgãos eram pesados e fixados em Bouin e/ou Formol tamponado a 4%. Cortes de 5 μ de espessura foram corados com hematoxilina-eosina.

Os experimentos foram realizados em duplicata, em ocasiões diferentes e, todos os cortes foram analisados simultaneamente pelo mesmo patologista.

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

O teor protéico dos antígenos solúveis utilizados foi dosado pela técnica de Folin Ciocalteu modificada por Hartree (1972), adotando como padrão albumina bovina (Sigma).

REAÇÕES DE IMUNOPRECIPITAÇÃO COM LISADOS DE TRIPOMASTIGOTAS

Foi realizada segundo método descrito por ZINGALES et. al. (1982). A técnica compreende várias etapas:

a) Preparação do antígeno

Formas tripomastigotas foram obtidas de camundongos swiss imunossuprimidos com Ciclofosfamida (Enduxan, Pravaz), na dosagem de 200 mg/kg de peso, inoculados 24 h depois com 10^5 formas tripomastigotas e, sangrados por decapitação no pico da parasitemia 7º dia.

O isolamento das formas tripomastigotas foi realizado da maneira usual com hypaque 10%.

b) Iodinação das proteínas de superfície dos tripomastigotas

As proteínas de membrana dos parasitas foram ligadas a I^{131} segundo as indicações de FRAKER et. al. (1978). Em tubos recobertos com 20µg de Iodogen (1, 3, 4, 6 tetracloro 3, 6 difenil glicouril)(Sigma), foram adicionados tripomastigotas na concentração de 2 a 5×10^7 e 0,5 ml de solução de Hanks contendo 500 µCi de NaI^{131} (IPEN, São Paulo). Essa mistura foi incubada por 10 min a 4 C, após verificação da viabilidade dos parasitas.

100 C por 3 min.

Este material foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo 1% de SDS.

d) Análise dos imunoprecipitados

Aliquotas de 20 μ L dos imunoprecipitados foram analisadas por gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%. Utilizando Acrilamida e bisacrilamida (Canalco inc.), persulfato de amônio (Biorad Lab), Temed (Sigma) e SDS (Sódio-Dodecyl Sulfato), segundo a técnica descrita por LAEMLI (1970).

As corridas eletroforéticas foram realizadas a 100 volts à temperatura ambiente por 6 h.

Como padrões de peso molecular, foram usadas na concentração de 2 μ g: miosina "MIOS" 205 kDa (Sigma); Soroalbumina bovina "BSA" 68 kDa; cadeias pesadas "IgGH" 50 kDa e cadeias leves "IgGL" 21 kDa de IgG2 monoclonal (obtidas pela Dra. W. M. Tamashiro); ovoalbumina "OVA" 43 kDa (Sigma) e Mioglobina "MIO" 16 kDa (cedido pelo Departamento de Bioquímica da UNICAMP).

Os geis foram corados com Coomassie brilliant blue (Biorad) a 0,25%.

As autoradiografias foram feitas com filme Sakura para raios X, utilizando-se como intensificador o EKTRAN (Kodak). O tempo de exposição variou entre 5 a 7 dias - 70 C, dependendo do antígeno iodinado.

Os pesos moleculares das bandas das proteínas marcadas foram estimados tomando como referência as bandas dos padrões nos geis corados pelo Coomassie blue.

e) Obtenção de Staphylococcus aureus

Foram utilizados estafilococos da Cêpa Cowan I, mortos e fixados pe

lo calor segundo as indicações de Kessler (1975) na concentração de 10% em PBS 0.15 M, pH 7,2. Este material foi gentilmente cedido pela Prof^a M. S. Gatti do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP.

PESQUISA DE ANTICORPOS LÍTICOS NOS SOROS F.A.i.

Para este propósito, foram realizadas reações de lise mediadas por Complemento. Utilizaram-se tripomastigotas isolados no pico da parasitemia a partir de camundongos swiss imunossuprimidos. Os tripomastigotas isolados, foram tratados segundo as instruções de KRETTLI et. al. (1979).

Diluições seriadas de soros F.A.i., em alíquotas de 500 μ L, foram incubadas com suspensões de parasitas contendo 6×10^7 tripomastigotas durante 30 min a 37 C. As amostras foram centrifugadas uma vez a 1732 g durante 15 min para retirar o excesso de anticorpos e, ressuspensas em tampão Hanks contendo 5 % de FCS. Posteriormente, foram divididas em alíquotas de 50 μ L. As alíquotas foram incubadas com volumes iguais de soro normal humano (HC) ou de camundongo da raça F1 (CF1) como fonte de Complemento. Outras alíquotas foram incubadas com os mesmos soros normais, porém, previamente inativados a 56 C por 30 min (Ci).

Após incubação durante 1 h a 37 C, foi realizada a contagem dos parasitas vivos presentes nas diferentes amostras. Esta contagem, foi realizada em hemocitômetro de Neubauer e para efetuar o cálculo de percentual de lise, utilizou-se a fórmula padronizada por KRETTLI & BRENER (1982).

$$\% \text{ de lise} = 100 - \frac{\text{Nº de parasitos (CH ou CF1)}}{\text{Nº de parasitos (CHi ou CF1i)}} \times 100$$

Entre as incubações, os tripomastigotas foram mantidos em gelo, inclusive, na hora da contagem.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados, foi realizada através dos testes não paramétricos: Prova de Kruskal-Wallis para análise entre as três raças e a Prova "U" de Mann Whitney para análise entre duas variáveis (SIEGEL, 1975).

As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

RESULTADOS

PARASITEMIA E MORTALIDADE DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM 100 FORMAS TRIPOMASTIGOTAS

A parasitemia e mortalidade dos camundongos CBA, C57 e F1, experimentalmente infectados, foi controlada durante os primeiros 20 dias.

Os resultados encontram-se resumidos na TABELA I.

TABELA I

Parasitemia e mortalidade das raças CBA/J, C57BL/10 e (C57BL/10 x CBA/J) F1 infectadas com 100 tripomastigotas

R A Ç A	PARASITEMIA		MORTALIDADE ** 20º dia (%)
	Dia do pico	Nº parasitas*	
CBA	10,2 $\pm$ 0,6	5,4 $\pm$ 0,2	98
C57	10,8 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,3	10
F1	10,5 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,2	0

* $\log_{10}$ do nº de parasitas no dia de máxima parasitemia (dia do pico)/ml

** (valores médios de 7 animais/grupo)

Pela TABELA I, pode-se observar que na infecção produzida pela inoculação de 100 formas tripomastigotas os camundongos C57 e os híbridos F1, apresentaram parasitemias máximas no 10º dia, enquanto que os camundongos CBA,

apresentam duas vezes mais parasitas que os animais resistentes no dia do pico. Os índices de mortalidade entre estes animais mostraram-se significativamente diferentes. Os camundongos CBA suscetíveis a cepa Y sofrem 98% de mortalidade até o 20º dia de infecção, enquanto que os camundongos C57 e FI mais resistentes, apresentavam índices de mortalidade de 10% e 0% respectivamente.

ACÇÃO BIOLÓGICA DE TRIPOMASTIGOTAS SANGÜÍCOLAS ISOLADOS PELO HYPaque: CAPACIDADE DE INFECTANTE.

Frente a necessidade de trabalhar com tripomastigotas livres de células do hospedeiro, padronizamos a técnica de gradiente em hypaque. Uma vez isolados, tornou-se necessário verificar se estes parasitas não teriam sido modificados durante o processo de isolamento. Com esse propósito, 15 camundongos CBA foram inoculados com 100 tripomastigotas isolados por hypaque e 7 outros camundongos CBA foram inoculados com 100 tripomastigotas sangüícolas não isolados. As parasitemias foram acompanhadas nos dois grupos e os resultados podem ser observados na FIGURA 1.

Os valores médios das parasitemias não diferem em ambos os grupos ao longo dos dias estudados. Pode-se constatar que não há diferenças entre os tripomastigotas devido ao processo de separação.

PESQUISA DE IMUNOGLOBULINAS ADSORVIDAS NA SUPERFÍCIE DE TRIPOMASTIGOTAS ISOLADOS DE CAMUNDONGOS CBA/J E (C57BL/10x CBA/J) FI

Para verificar se os parasitas recuperados do sangue das diferen -

tes raças, apresentavam anticorpos aderidos a sua superfície, como já havia sido descrito para cêpa Y isolada de camundongos swiss, realizou-se reações de Imunofluorescência direta com os tripomastigotas isolados de camundongos CBA, F1 e C57 no 7º, 8º e 9º dia após infecção com 10^5 parasitas.

Em cada experimento, tripomastigotas isolados de camundongos swiss infectados com a mesma carga parasitária, serviram de controles.

Os resultados referentes a este experimento, estão apresentados na TABELA II. Pode-se observar que os tripomastigotas isolados de CBA não apresentaram imunoglobulinas até o dia 9º após infecção diferentemente dos parasitas isolados de camundongos F1, que apresentaram imunoglobulinas a partir do 8º dia. Todos os parasitas provenientes de camundongos swiss, apresentaram imunoglobulinas a partir do 7º dia.

A partir destes dados, utilizamos tripomastigotas provenientes de camundongos CBA/J para os trabalhos subsequentes.

TABELA II

Reação de Imunofluorescência direta com tripomastigotas
recém-isolados de camundongos

DIA APÓS INFECÇÃO	RAÇA DE CAMUNDONGO		
	CBA	F1	Swiss
7	negativo	negativo	positivo
8	negativo	positivo	positivo
9	negativo	positivo	positivo

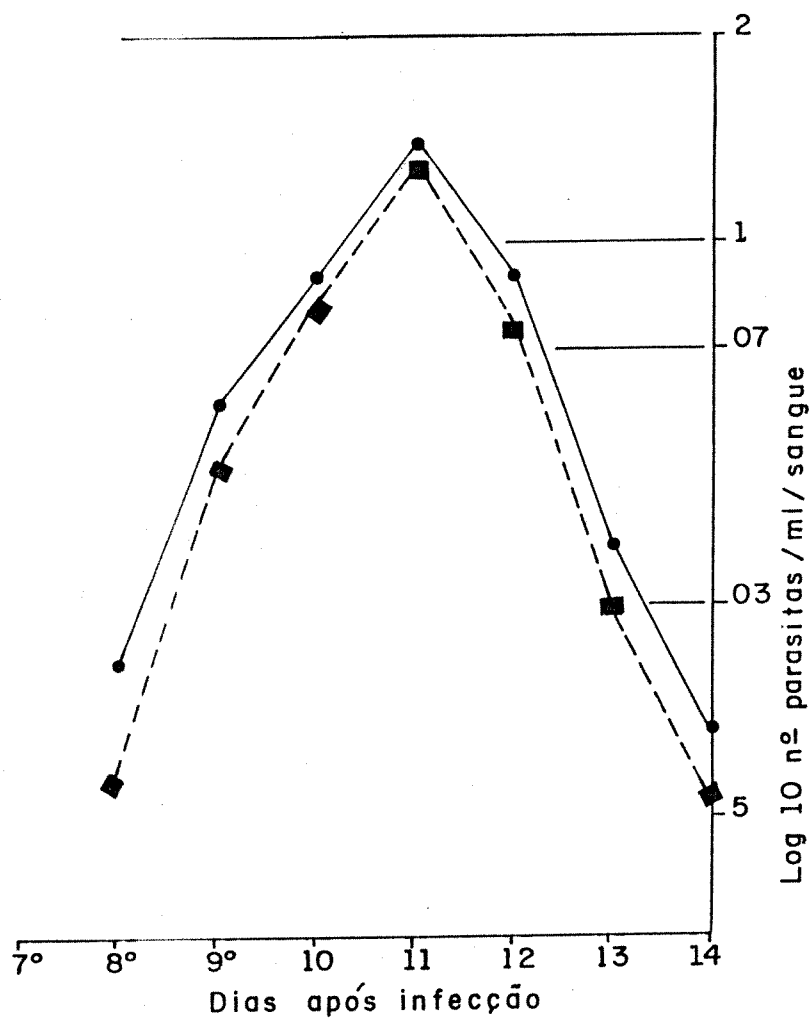


Fig. 1 - Curva de parasitemia em camundongos CBA infectados com 100 formas tripomastigotas isolados em Hypaque (■) e sem tratamento prëvio (●).

CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS PARA ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE DO T. CRUZI NOS SOROS F.A.i.

Sendo os antígenos de superfície dos parasitas, os primeiros imunógenos a entrarem em contato com o hospedeiro, fomos pesquisar a produção de anticorpo e seus isótipo nas raças suscetíveis e resistentes em estudo, para as formas tripomastigotas e amastigotas.

Utilizamos para este estudo, a reação de imunofluorescência indireta.

ISÓTIPOS DE IMUNOGLOBULINAS ANTI-TRIPOMASTIGOTAS

Os resultados encontram-se resumidos na FIGURA 2 e apresentam o perfil de produção de IgM e subclasses de IgG. Observa-se um rápido aumento de IgM em todas as raças de camundongos a partir do 5º dia. A mesma dinâmica de produção é observada com os isótipos IgG2 a partir do 10º dia pós infecção.

No 5º dia, os camundongos CBA apresentam todos os isótipos ligeiramente superiores às outras raças, exceto nos níveis de IgG1.

A cinética de produção de IgG1 e IgG2b é mais homogênea entre CBA, C57 e F1, embora os níveis de IgG1 mantêm-se relativamente baixos quando comparados com os outros isótipos produzidos nesta fase.

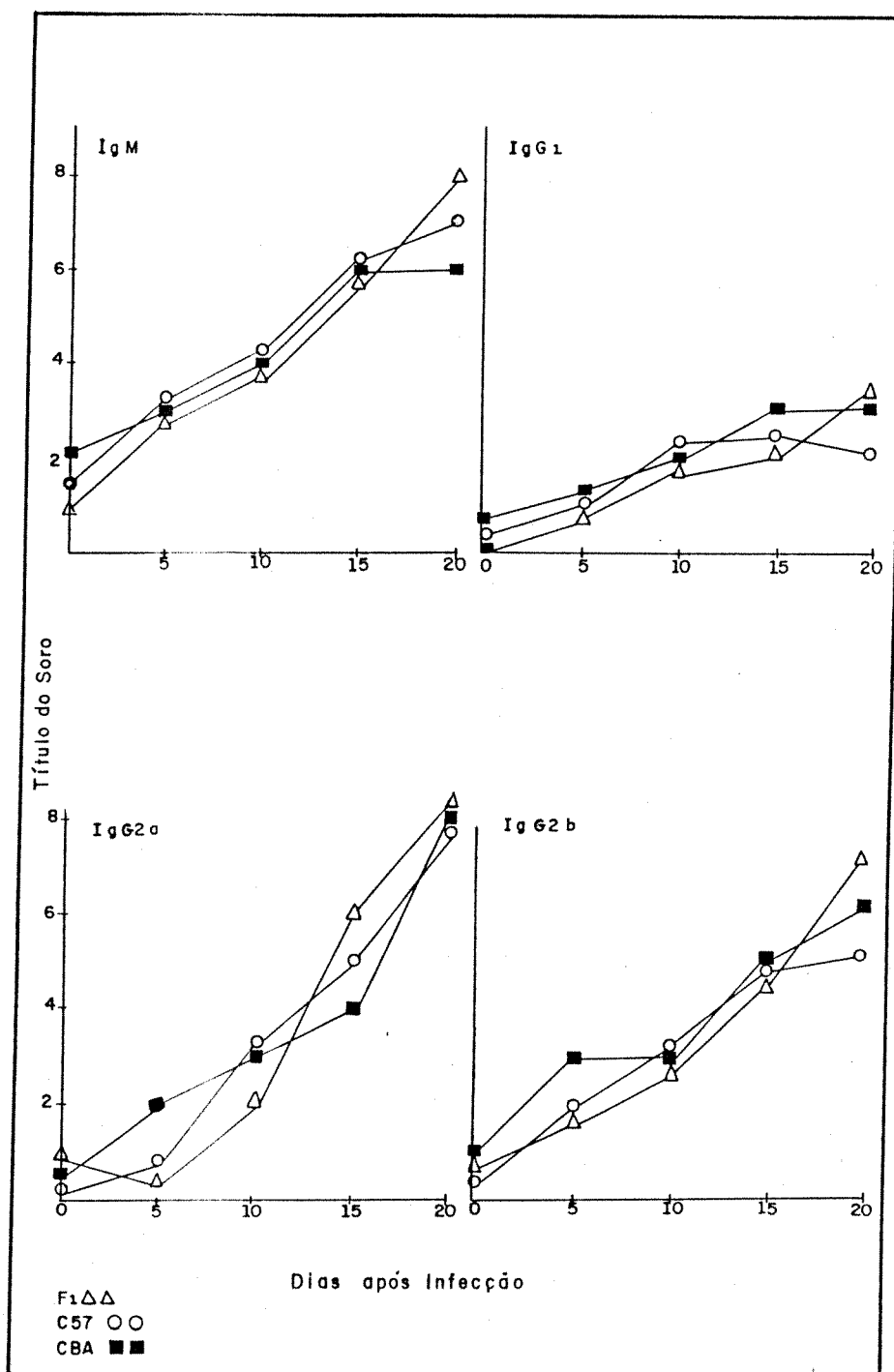


Fig. 2 - Níveis dos diferentes isôtipos de anticorpos anti-tripomastigotas durante a fase aguda inicial. Reação de imunofluorescência indireta. "Log. 2 do inverso da diluição dos soros.

ISOTIPOS DE IMUNOGLOBULINAS ANTI-AMASTIGOTAS PRESENTES EM SOROS DE FASE AGUDA INICIAL (F.A.i).

A FIGURA 3 mostra o perfil de produção de anticorpos anti-amastigotas nos soros colhidos em diferentes dias da infecção dos camundongos CBA, C57 e F1. Não se observa diferenças entre os títulos de anticorpos produzidos, de modo que no 20º dia após infecção, todos os animais apresentam títulos muito parecidos de IgG 2b, IgG 2a e IgM. A subclasse IgG1, a semelhança dos anticorpos dirigidos para tripomastigotas, se apresenta em níveis baixos e é produzida com uma cinética diferente daquela apresentada pela IgG2.

Os níveis de IgM nas diferentes raças de camundongos, aumentaram significativamente até o 15º dia após infecção enquanto que IgG2a sofre aumento significativo a partir do 10º dia.

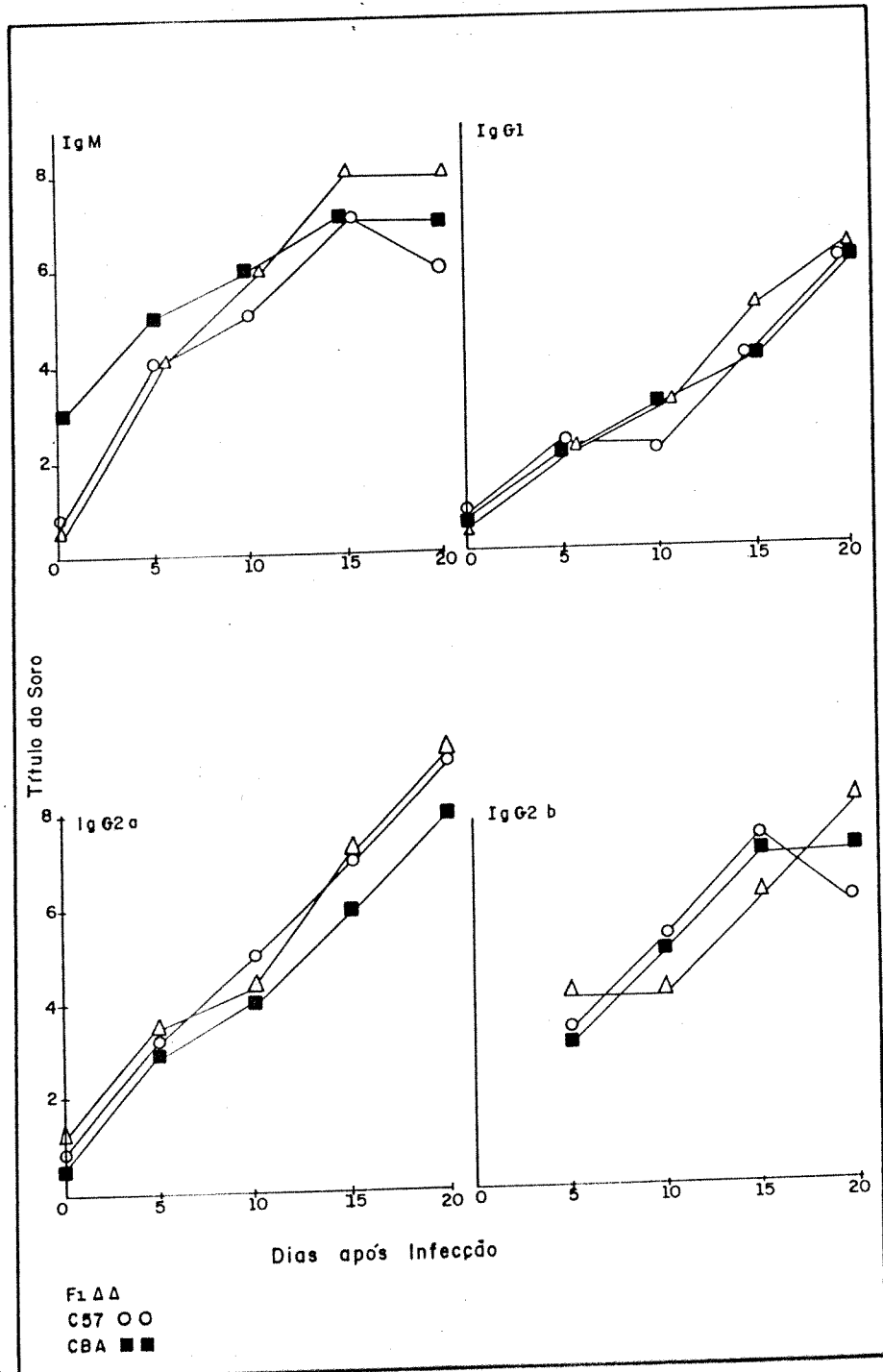


Fig. 3 - Níveis dos diferentes isôtipos de anticorpos anti-amastigotas durante a fase aguda inicial. Reação de imunofluorescência indireta.

* Log 2 do inverso da diluição dos soros.

NÍVEIS TOTAIS DE ANTICORPOS PARA LISADOS DE TRIPOMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS

A FIGURA 4A, mostra o padrão de resposta entre as raças CBA, C57 e o híbrido F₁ a antígenos de *T. cruzi* nos primeiros 20 dias da infecção.

Observou-se pequena diferença no padrão de resposta entre as raças suscetíveis e resistentes. Os soros de camundongos CBA não infectados, (dia 0), apresentaram níveis de anticorpos específicos superiores em relação às outras linhagens. Observou-se rápido aumento dos títulos no 5º dia após infecção e, a partir do 10º dia, a produção de anticorpos aumentou mais lentamente. No 20º dia, não foram observadas diferenças entre os níveis de anticorpo produzidos pelas raças CBA ou C57 ou F₁. Nos camundongos C57 assim como no híbrido F₁, observou-se um aumento constante dos teores de anticorpos específicos até o 20º dia após infecção.

NÍVEIS TOTAIS DE ANTICORPO PARA ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE

A presença de anticorpos foi medida através de reações de Imunofluorescência indireta utilizando antígenos de cultura. Não foram observadas diferenças significativas entre os títulos de anticorpos produzidos pelas raças em estudo (FIGURA 4b).

A raça CBA apresentou níveis de anticorpos naturais para antígenos de superfície das formas tripomastigotas de 1:4 enquanto que, C57 e F₁ só apresentaram títulos de 1:2.

No 20º dia, C57 e F₁ atingiram os títulos de anticorpos de 1:256, enquanto CBA parecia seguir uma cinética de produção de anticorpos ligeiramente diferente.

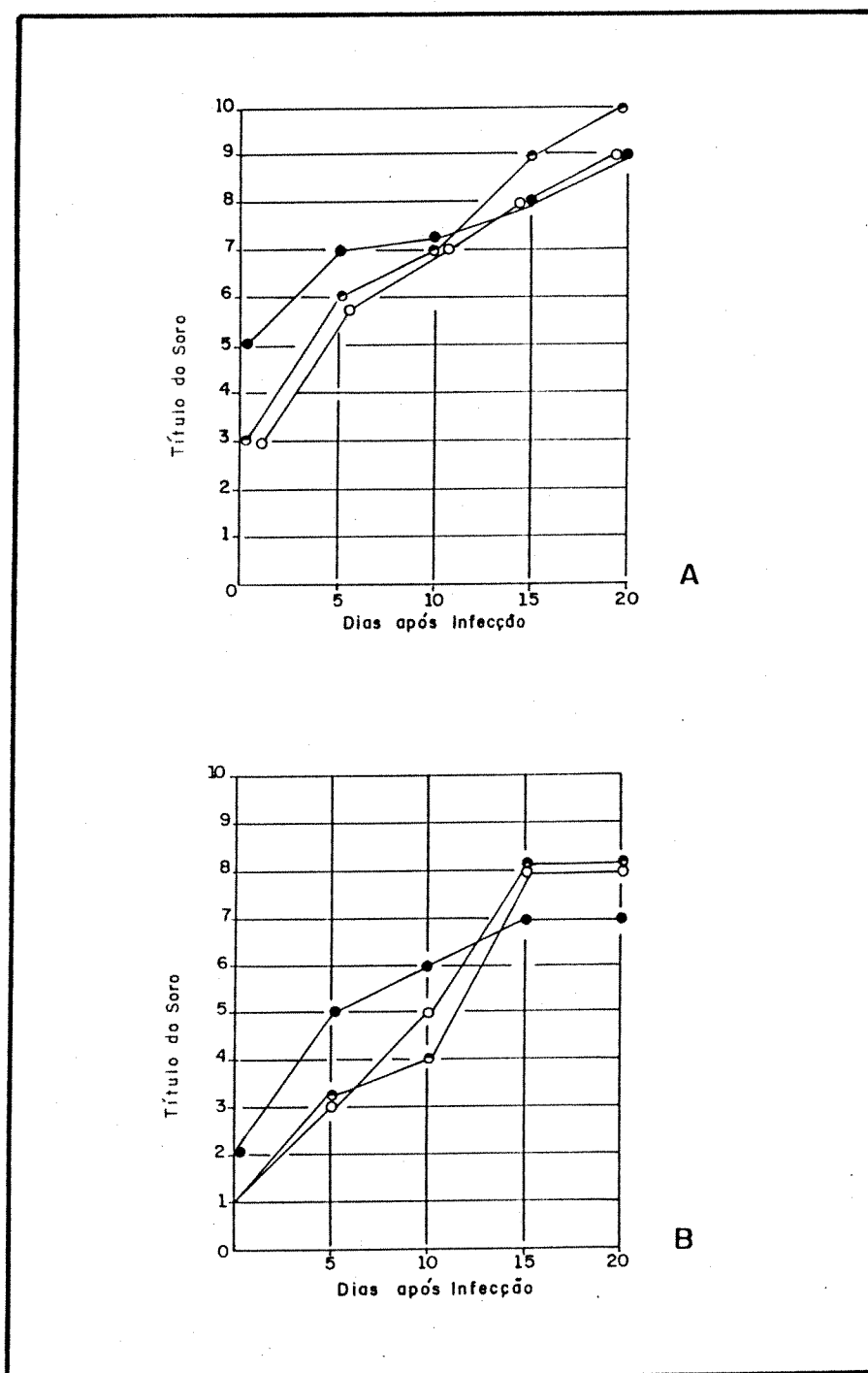


Fig. 4 - Imunoglobulinas produzidas pelas raças CBA(●), C57(○) e F1 (◐) na fase aguda inicial da infecção. Anticorpos anti-amastigotas e tripomastigotas,

A Reação de ELISA

B Reação de Imunofluorescência indireta

log. 2 da recíproca da diluição do soro

REATIVIDADE DOS SOROS F.A.i. CONTRA FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DE SUPERFÍCIE DAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS

A reatividade dos soros de fase aguda inicial(F.A.i.),foi analisada através de Imunoprecipitação de antígenos de superfície de formas tripomastigotas sangüícola marcadas com NaI^{131} , com proteína A de S. aureus, de modo a evidenciar a especificidade dos anticorpos do tipo IgG. Observou-se reação apenas com os soros coletados 20 dias após infecção (FIGURA 7). Os soros das 3 raças de camundongos, precipitaram uma ampla gama de determinantes antigênicos de Mr compreendidos entre 92 e 84 kDa, formando áreas radioativas pouco definidas.

O material precipitado, parecia ser maior nos soros de camundongos CBA e F1. Todos os soros do 20º dia, precipitam polipeptídeos de Mr aproximado de 50 kDa.

Os soros de camundongos C57 reagiram fracamente com polipeptídeos de Mr 84 kDa, mas reconheceram antígenos de 60 kDa.

Os soros de camundongos normais e os coletados 5, 10 e 15 dias após infecção, não precipitaram os antígenos de tripomastigotas.

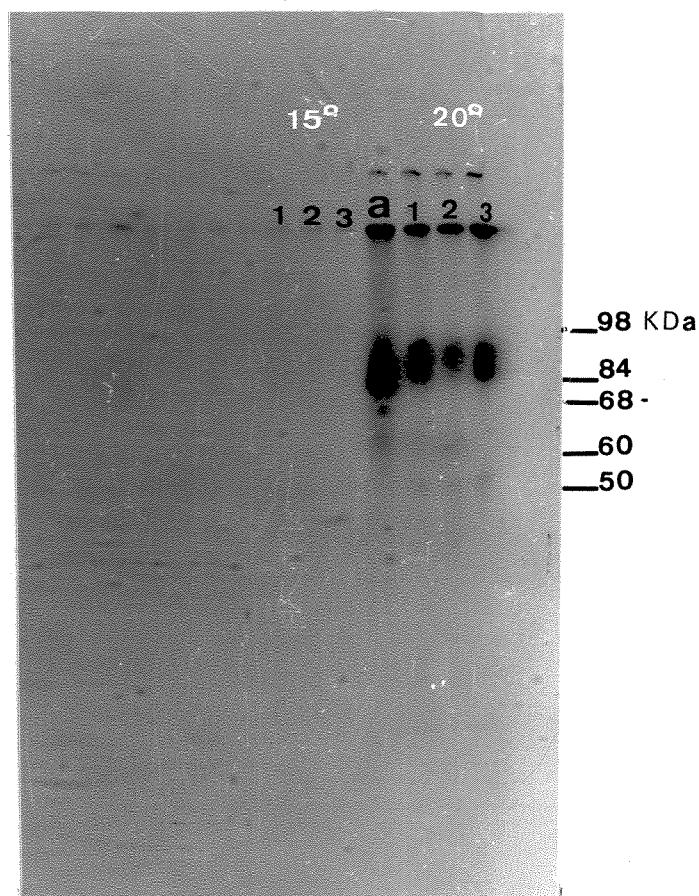


Fig. 7 - Autoradiograma de antígenos de formas tripomastigotas de T. cruzi marcados com NaI^{131} (a) imunoprecipitados pelos soros F. A.i. colhidos nos dias 5º, 10º, 15º e 20º. Foram analisados os soros de camundongos: CBA (1); C57 (2) e F1 (3).

PROPRIEDADES DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS AO LONGO DA FASE INICIAL DA INFECÇÃO

a) Efeito sobre a parasitemia e mortalidade

Para verificar o efeito de anticorpos sobre a viabilidade dos parasitas, realizou-se a experiência abaixo:

Aliquotas de suspensão contendo 200 formas tripomastigotas vivas foram adicionadas em partes iguais com soros de fase aguda inicial, proveniente de CBA e C57. Incubando-se durante 30 minutos a 37 C. Após este período, frações de 100 μ L da mistura foram inoculadas em 10 grupos de 5 camundongos/grupo e em um grupo controle constituído de 5 animais.

Na TABELA III acham-se os resultados deste experimento, cujos valores médios das parasitemias estão expressados em Log 10.

TABELA III

Parasitemia e mortalidade em camundongos CBA inoculados
com T. cruzi tratados com soros F. A. i.

Tripomastigotas (tratamento)	PARASITEMIA MÁXIMA		Mortalidade *
	dia do pico	Nº parasitas	
Hanks	10,1 $\pm$ 0,7	5,6 $\pm$ 0,4	80
Soros F.A.i. CBA			
dia 0	10,2 $\pm$ 0,6	5,4 $\pm$ 0,3	60
5	10,0 $\pm$ 0,7	5,4 $\pm$ 0,8	70
10	10,0 $\pm$ 0,0	5,9 $\pm$ 0,1	50
15	9,2 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,2	50
20	10,1 $\pm$ 0,4	5,7 $\pm$ 0,2	59
Soros F.A.i. C57			
dia 0	10,7 $\pm$ 0,8	5,8 $\pm$ 0,4	60
5	10,0 $\pm$ 0,5	5,6 $\pm$ 0,6	70
10	10,1 $\pm$ 0,4	5,7 $\pm$ 0,3	47
15	10,0 $\pm$ 0,0	5,7 $\pm$ 0,3	50
20	10,1 $\pm$ 0,6	5,4 $\pm$ 0,7	25

* Mortalidade no 14º dia após infecção.

Os dados da TABELA III mostram que não houve diferenças nos grupos nem entre os grupos, no percentual de mortalidade e aparecimento do pico de parasitemia.

b) Pesquisa de anticorpos anti-Tripomastigotas vivos em soros
F.A.i.

Conhecendo a importância que se atribui aos anticorpos que reagem com tripomastigotas vivos, na defesa do hospedeiro, fomos pesquisar nos soros dos animais em estudo o aparecimento destes anticorpos ao longo dos primeiros 20 dias de infecção. Utilizamos para isto, a técnica descrita por KRETTLI, et. al. (1982).

Na TABELA IV, é possível observar que, a produção de anticorpos anti-Tripomastigotas vivos podem ser detectados a partir do 10º dia no híbrido F1 e a partir do 15º dia após inoculação, nos camundongos C57 e CBA. No 20º dia, não há diferenças entre as linhagens.

TABELA IV

Reações de Imunofluorescência com tripomastigotas vivos

Soros Fase aguda inicial	DIAS APÓS INFECÇÃO				
	0	5	10	15	20
	Título de anticorpos*				
CBA	< 1	< 1	< 1	6	6
C57	< 1	< 1	< 1	5	5
F1	< 1	< 1	2	5	6

* Os resultados estão expressos como Log 2 do inverso da diluição do soro.

c) Efeito lítico de soros de Fase aguda inicial (F.A.i.) e Complemento murino ou humano

A fim de verificar a capacidade lítica dos anticorpos detectados nos soros F.A.i., no sistema murino, foram utilizados "pool" de soros normais de camundongos CBA (SNCBA), C57 (SNC57) e F1 (SNF1), como fonte de complemento e incubados com parasitas previamente tratados com soros de fase crônica (SC) e soros F.A.i. Também foi utilizado um "pool" de soros normais humanos como fonte de complemento, para compará-lo a efetividade lítica do complemento de camundongo.

Os resultados, valores médios de sete experiências, com partidas diferentes de complemento e soros S.C. e F.A.i. encontram-se na TABELA V.

Utilizando soro humano como fonte de complemento, pode-se observar que todos os soros F.A.i. apresentam percentuais de lise muito próximos a soro S.C. (soro lítico).

Utilizando soro S.C. e diferentes fontes de complemento, pode-se verificar que o soro normal de camundongo F1, possuem a melhor capacidade lítica (57%). Valor bem menor que aquele obtido com soro humano.

Com soros de camundongos do 20º dia de infecção e seus correspondentes soros normais, os percentuais líticos são muito deficientes: 32% para as raças resistentes e 6% para a raça suscetível CBA.

TABELA V

LISE DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS MEDIADA POR COMPLEMENTO DE
DIFERENTES ORIGENS E SOROS DE FASE AGUDA INICIAL (F.A.i.)

S O R O S	FONTE DE COMPLEMENTO			
	SNH	SNF ₁	SNC ₅₇	SN _{CBA}
	% de Lise			
SC	89,5	57,0	19,5	28,0
F.A.i.*				
CBA-20	73,2	n.r	n.r	6,0
C57-20	65,0	n.r	32,0	n.r
F1-20	66,0	32,0	n.r	n.r

n.r = não realizado

S.C. = soro de fase crônica (controle positivo)

F.A.i. = soros de fase aguda inicial, coletados no 20º dia após infecção.

EFEITO DA CAPACIDADE LÍTICA DOS SOROS F.A.i. NA INFETIVIDADE

Pesquisou-se, a seguir, se os anticorpos presentes nos soros F.A.i. do 15º dia fixavam complemento murino lisando tripomastigotas. Para isto, 100 formas tripomastigotas incubadas previamente com soros do 15º dia após infecção e complemento de F₁, foram inoculados em camundongos suscetíveis CBA (2 horas).

A parasitemia assim como a mortalidade destes animais, foram observados durante 20 dias.

Como controle, suspensões idênticas de parasitas foram incubados com os soros F.A.i. e Complemento de F₁ aquecido a 56 C por 30' (F₁Ci).

Na TABELA VI é possível observar que os diferentes soros não afetaram a evolução da parasitemia nem a mortalidade independentemente da presença do Complemento.

Não foram observadas diferenças significativas nas parasitemias entre os grupos, indicando que o tratamento não exerceu efeito nas formas tripomastigotas.

O dia da parasitemia máxima é igual a seus respectivos controles em que as formas tripomastigotas foram tratadas com Complemento de F₁ inativado a 56 C.

TABELA VI

Parasitemia de camundongos CBA infectados com 100 formas tripomastigotas tratados previamente com soros F.A.1. e complemento murino

Tratamento	PARASITEMIA		Mortalidade (%)
	dia do pico	Nº de parasitas**	
Hanks+C	10,0 $\pm$ 0,8	5,5 $\pm$ 0,5	70
*CBA15+C	11,1 $\pm$ 0,4	5,0 $\pm$ 0,5	60
CBA 15+Ci	11,8 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,6	58
C57 15+C	11,8 $\pm$ 0,4	4,8 $\pm$ 0,4	50
C57 15+Ci	11,6 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,6	60
F1 15+C	11,5 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,4	60
F1 15+Ci	11,6 $\pm$ 0,5	4,5 $\pm$ 0,3	63

Complemento utilizado = soro fresco de F1

*Soro coletado no 15º dia de infecção

** Log 10 do nº de parasitas/mL no pico de parasitemia

Ci = Soro de F1 normal incubado 30 min a 56º

EFEITO DA INFECÇÃO NA PRODUÇÃO ESPONTÂNEA DE ANTICORPOS ANTI-HEMÁCIAS DE CARNEIRO

Este efeito foi analisado através da quantificação de células produtoras de anticorpos (PFC diretas) nos baços das três raças de camundongos em estudo. Os animais não sofreram outro estímulo que a infecção pelo I. cruzi nas condições já padronizadas.

A TABELA VII compara as PFC entre as raças, considerando os valores em números de PFC por baço de animal e os valores referidos a 10^6 células esplênicas.

Os camundongos CBA sofreram aumento significativo de PFC em relação aos controles (CBAC) desde o 5º até o 15º dia.

Os camundongos C57, sô apresentaram aumento significativo de PFC / baço e PFC/ 10^6 a partir do 15º dia, enquanto que os camundongos F1, embora apresentem aumento significativo de PFC em relação aos controles desde o 5º dia, sofrem uma diminuição do número de células a partir do 10º dia, para novamente aumentar subitamente no 20º dia.

A FIGURA 5 mostra estes resultados em relação a 10^6 células esplênicas.

A comparação da esplenomegalia sofrida pelos camundongos e o número de células viáveis ao longo dos 20 dias, entre as raças, pode ser observada na FIGURA 6. As raças CBA e F1 sofrem um aumento do número de células viáveis e do peso do baço, parâmetro indicativo de esplenomegalia, a partir do 5º dia. A esplenomegalia estabiliza-se a partir do 10º dia em ambas as raças.

Os camundongos C57, sofreram aumento gradual de peso conjuntamente com o número de células viáveis até o 20º dia.

TABELA VII

Comparação de células formadoras de placas (PFC) em baço de camundongos durante a infecção pelo I. cruzi

CÉPAS	DIAS APÓS INFECÇÃO					
	5	10	15	20		
	PFC/baço	PFC/10 ⁶ céls	PFC/baço	PFC/10 ⁶ céls	PFC/baço	PFC/10 ⁶ céls
CBA	423,4*	7,2*	740,0*	5,06*	260,0*	4,43*
CBA(c)	100,0	2,65	132,0*	2,9	70,0	1,38
C57	144,0	1,85	270,0*	3,81	580,0*	4,99*
C57(c)	72,5	1,71	75,0	2,43	92,5	1,65
F1	326,3*	6,88*	265,0*	2,53*	324,0*	1,9*
F1(c)	39,0	0,79	45,6	1,52	75,0	0,95
**p=0,01		p<0,01	p<0,09	p>0,05 n.s	p=0,1 n.s	p>0,05 n.s
					p=0,3 n.s	p=0,014

(c) Camundongos normais sacrificados no mesmo dia

* Teste U de Mann-Whitney entre os grupos infectados e controles. Significância $p = 0,05$

** Análise de variância entre raça (Kruskal-Wallis)

n.s. Não significativo

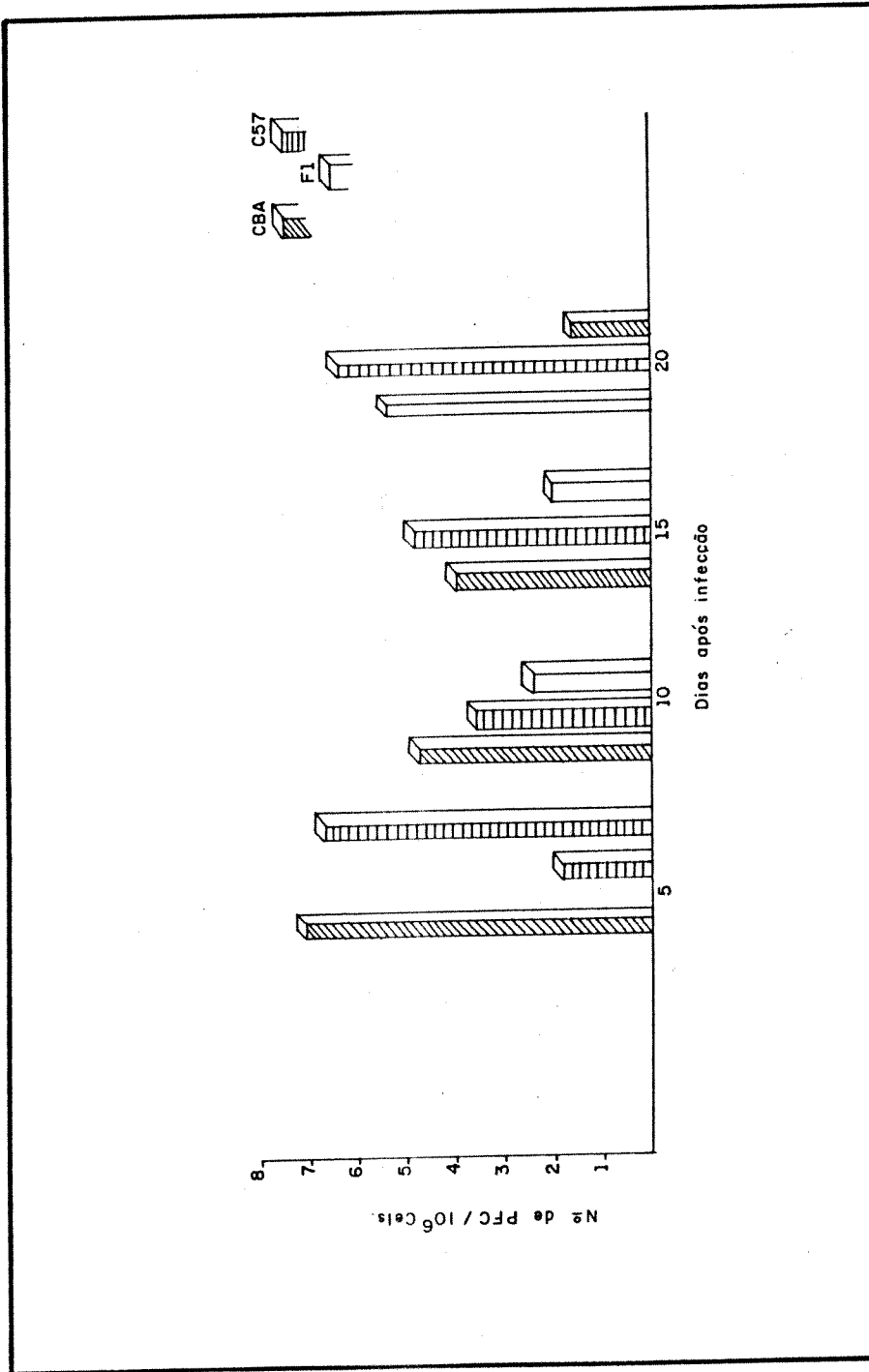


Fig. 5 - PFC diretas contra hemácias de carneiro nas raças CBA, C57 e F1 ao longo da infecção. PFC em relação a 10^6 células esplênicas. (Resultados representativos de 3 experiências).

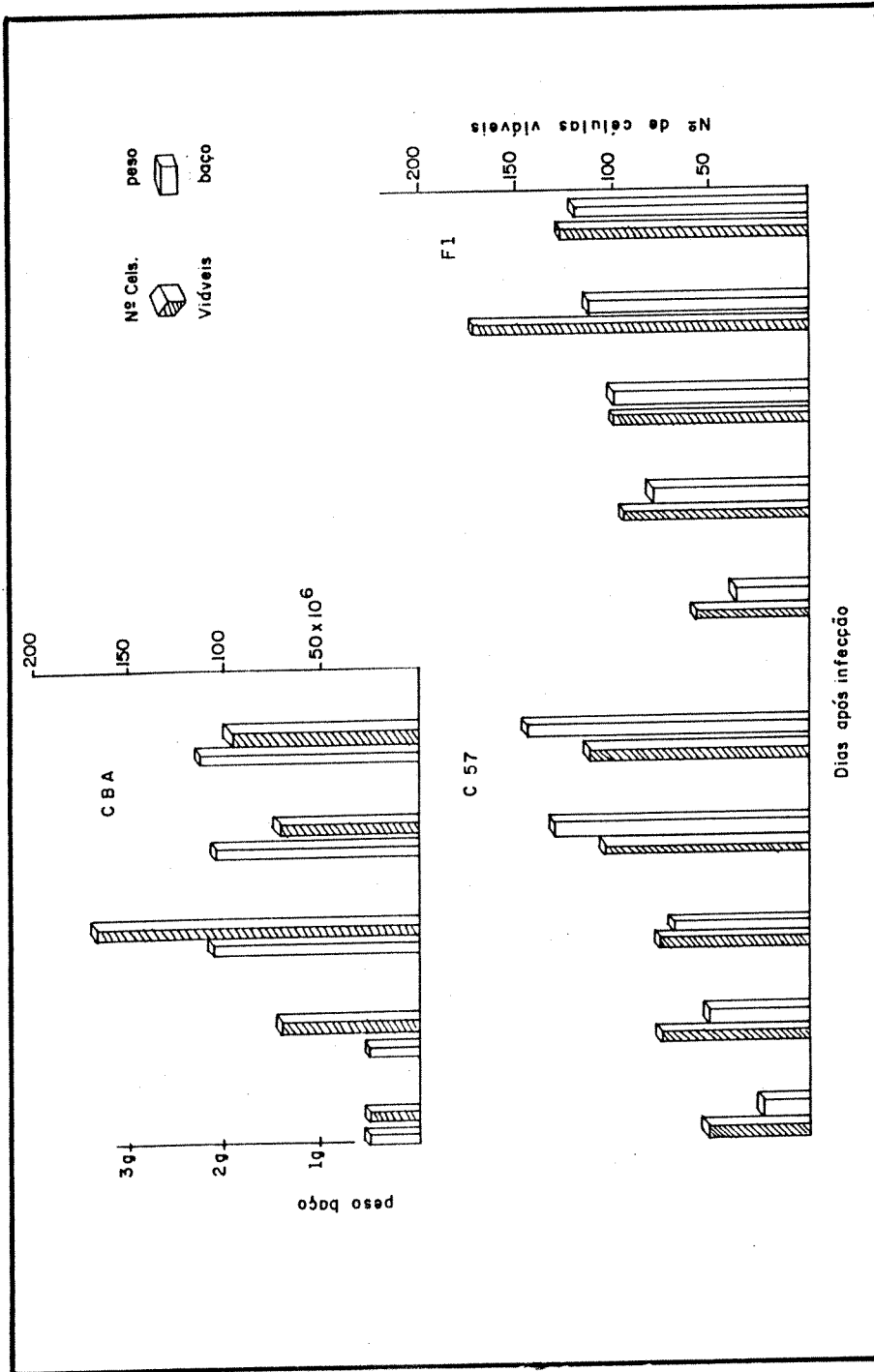


Fig. 6 - Comparação entre o peso e número de células viáveis nos baços de camundongos C₅₇, CBA e F1 ao longo da infecção com 100 parasitas.

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DOS BAÇOS

a) ANIMAIS CONTROLES

O estudo histopatológico de secções transversais ou longitudinais de baços de animais não infectados das raças CBA, C57 e F1, revelou aspectos semelhantes (FIGURAS 8,9 e 10). A polpa vermelha apresentou-se moderadamente congesta, com focos eritropoieticos esparsos, mais evidentes nas áreas subcapsulares e peritrabeculares. Os folículos linfáticos aparentemente maiores nos animais CBA (FIGURA 10) e com atividade fagocitária expressa pela presença de "corpos tintos". As bainhas linfocitárias periarteriolares (BLPA) parecem similares nos três grupos estudados.

b) ANIMAIS INFECTADOS

Nos animais infectados, após 48 horas de infecção, observa-se aumento moderado do componente linfóide do baço caracterizado pelo alargamento dos folículos linfáticos e das BLPAS. Nos animais de cêpa CBA, acentuam-se os centros germinativos intrafoliculares e a atividade fagocitária parece aumentada (FIGURA 11). A partir dos cinco dias após infecção, a celularidade mostra-se progressivamente maior tanto na polpa vermelha quanto na branca. Os centros germinativos exibem intensa atividade mitótica (FIGURA 12). As áreas de eritropoiese se ampliam significativamente (FIGURAS 13, 14 e 15). A presença de formas amastigotas de T. cruzi, foram detectadas nos baços da raça CBA a partir do 10º dia de infecção. O parasitismo limitou-se a macrófagos da polpa vermelha, associando-se frequentemente, a focos de necrose (FIGURA 16). Eventualmente, células parasitadas foram observadas em focos de eritropoiese (FIGURA 17). No 15º dia, amastigotas se encontravam livres no

interstício da polpa vermelha (FIGURA 18) e áreas de necrose eram muito evidentes. Nenhum parasitismo foi observado no 20º dia. Neste estágio, a hiper celularidade esplênica era semelhante nas três raças estudadas.

Apenas a raça C57 foi examinada no 30º dia de infecção, surpreendendo-se mitoses, tanto nos centros germinativos (FIGURA 20) como na polpa vermelha.

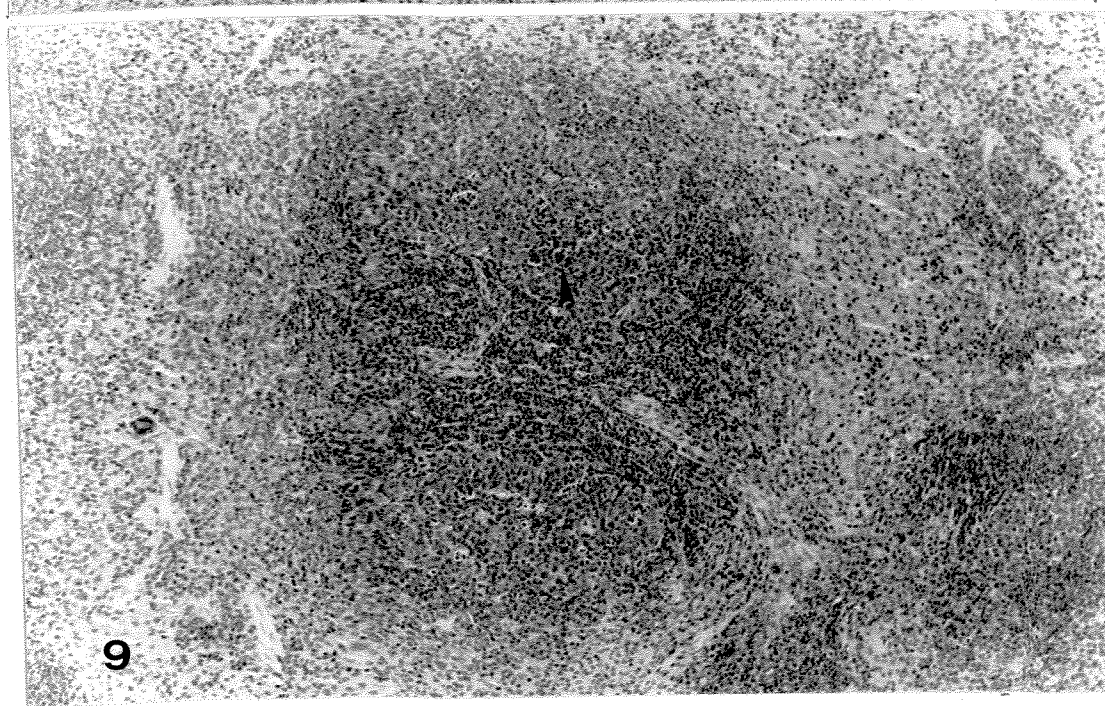
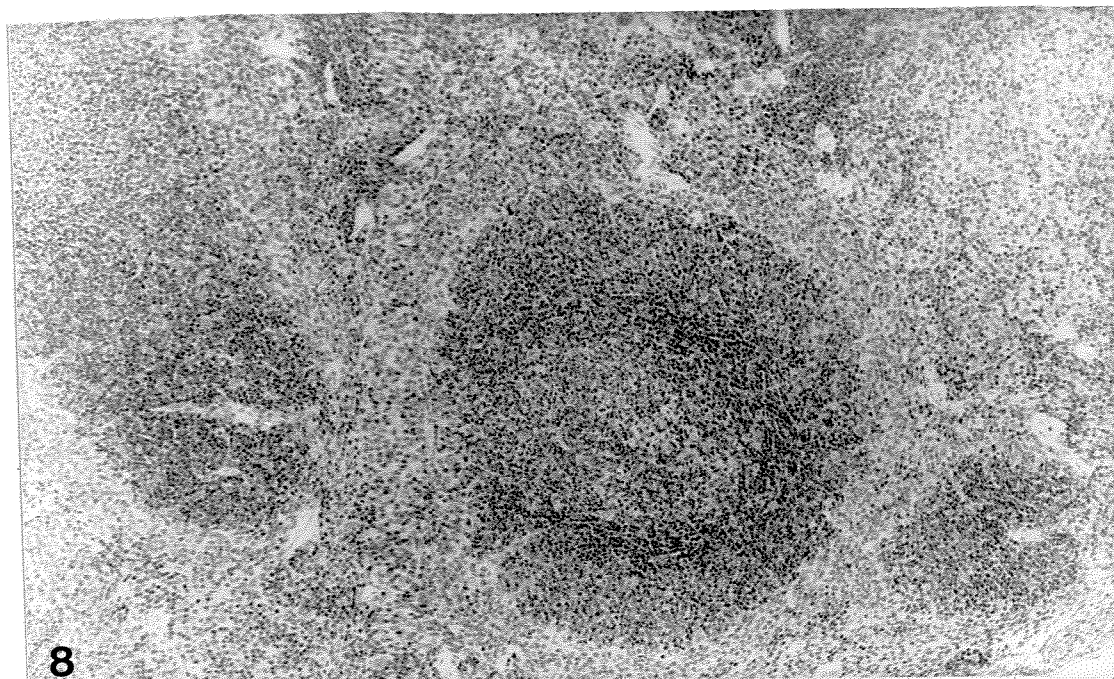


Fig. 8 - C57 controle. Folículos bem individualizados. Bainha linfocitária periarteriolar evidente. (HE 138 x).

Fig. 9 - F1 controle. Folículos linfóides com atividade fagocitária em centro germinativo. Foco hematopoietico na polpa vermelha (HE 138 x).

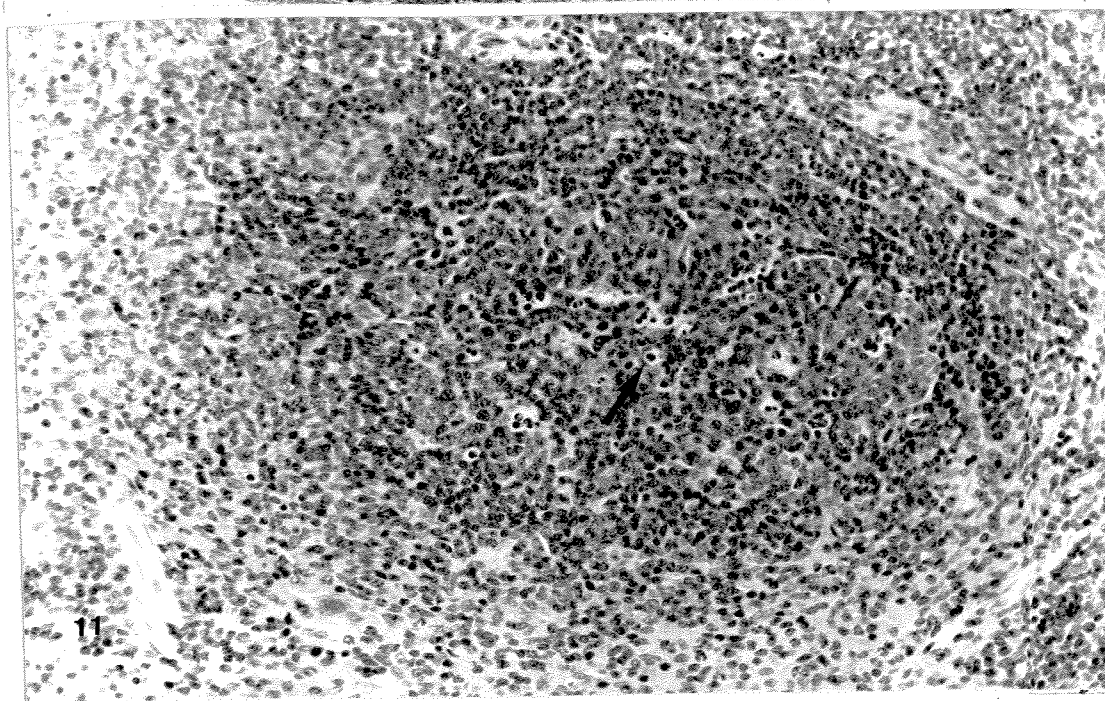
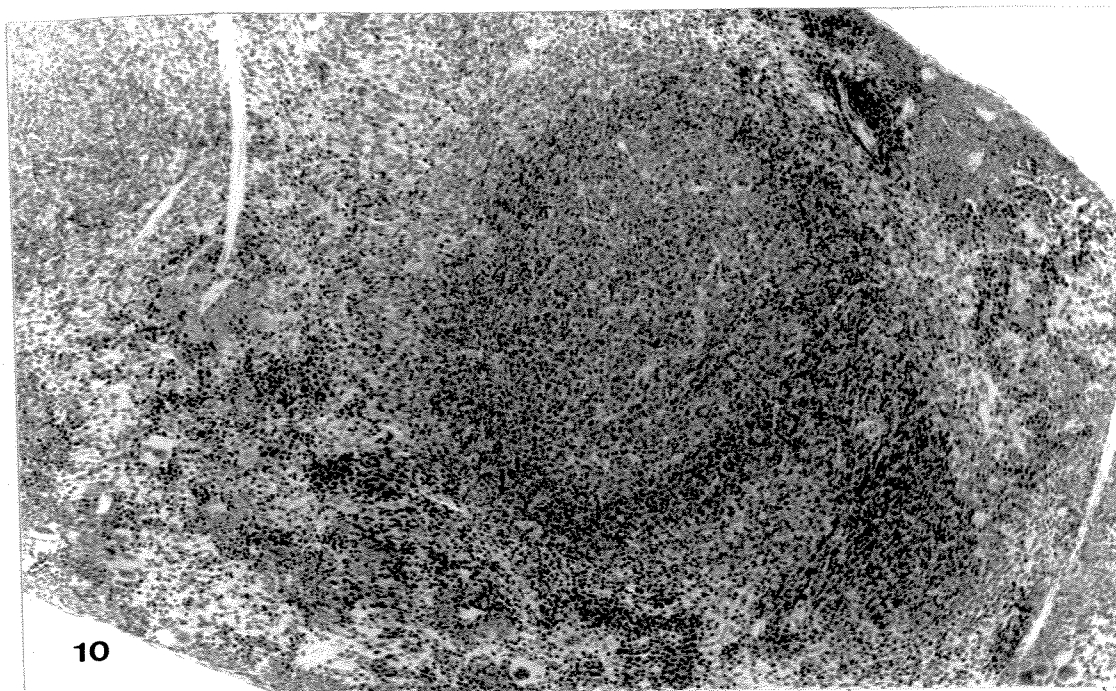


Fig. 10 - CBA controle. Folículos linfóides com centros germinais grandes (HE, 138 x).

Fig. 11 - CBA, 48 h de infecção. Atividade fagocitária centro-follicular intensa (HE, 277 x).

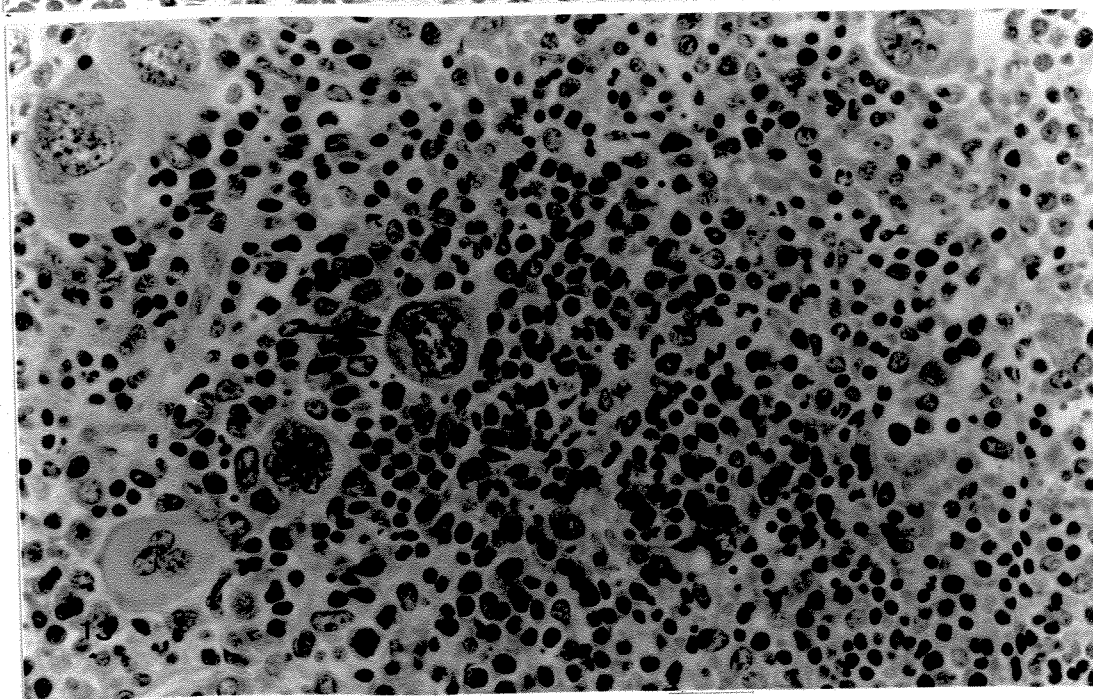
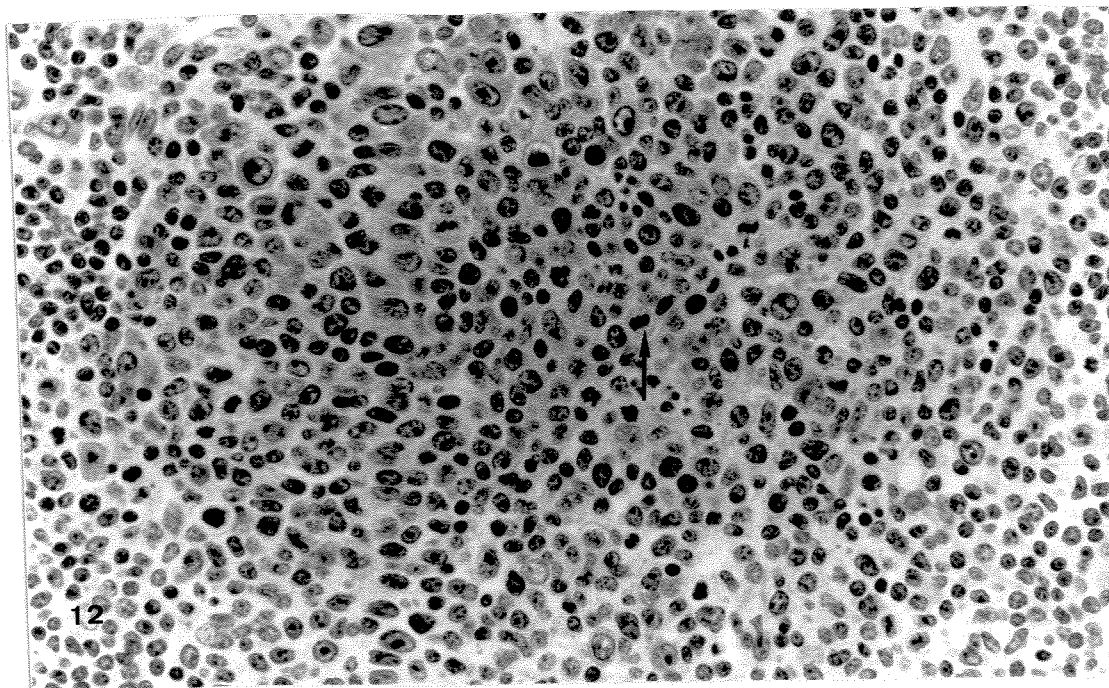


Fig. 12 - CBA, 10 dias de infecção. Atividade mitótica muito intensa em centros germinais foliculares (HE, 554 x).

Fig. 13 - CBA, 10 dias de infecção. Eritropoiese acentuada na polpa vermelha (HE, 554 x).

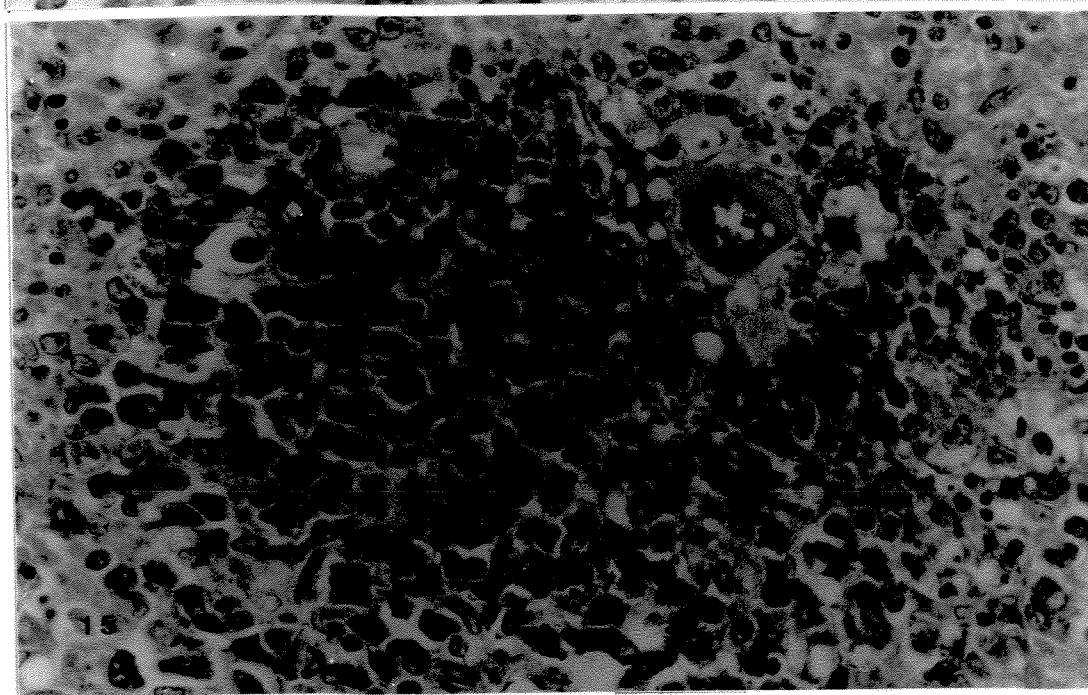
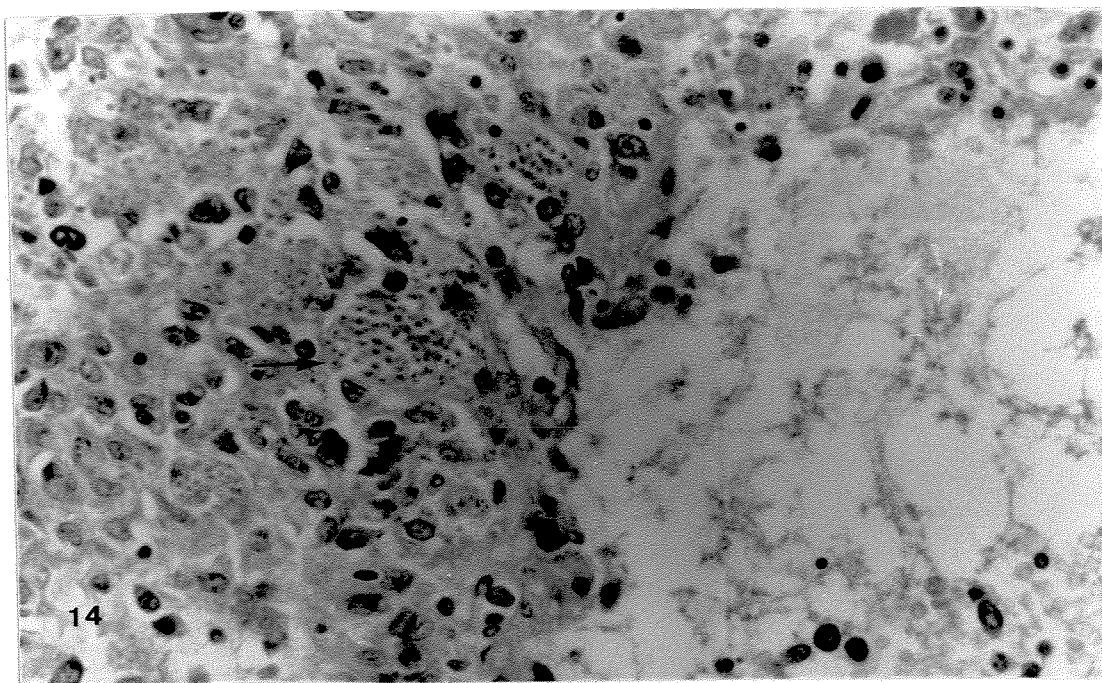


Fig. 14 - CBA, 10 dias de infecção. Parasitismo em macrófagos da polpa vermelha. Áreas de necrose (HE, 554 x).

Fig. 15 - CBA, 10 dias de infecção. Macrófagos parasitados próximo ao foco de eritropoiese (HE, 554 x).

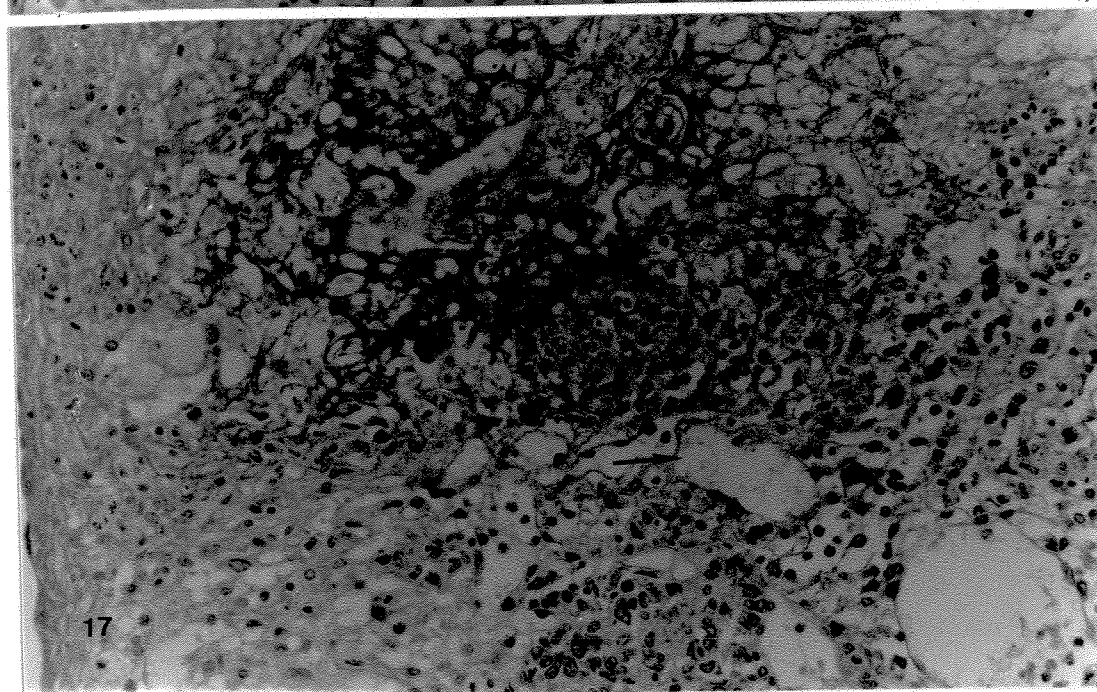
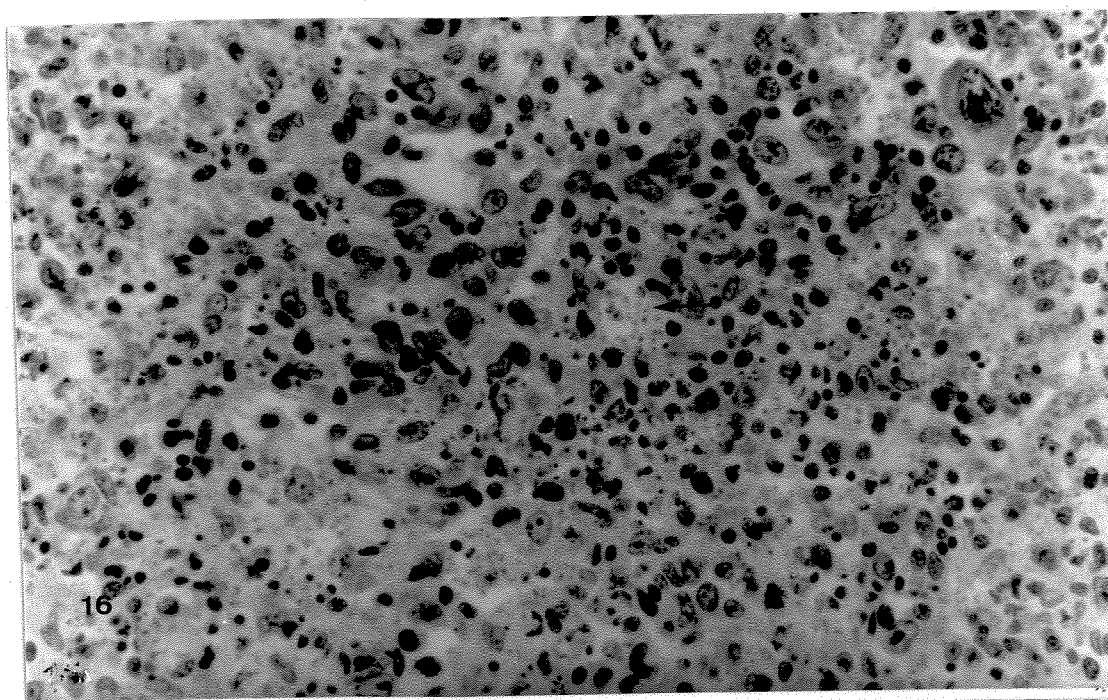


Fig. 16 - CBA, 15 dias de infecção. Intenso parasitismo na polpa vermelha com presença de amastigotas livres (HE, 554 x).

Fig. 17 - CBA, 15 dias de infecção. Áreas de extensa necrose (HE, 277 x).

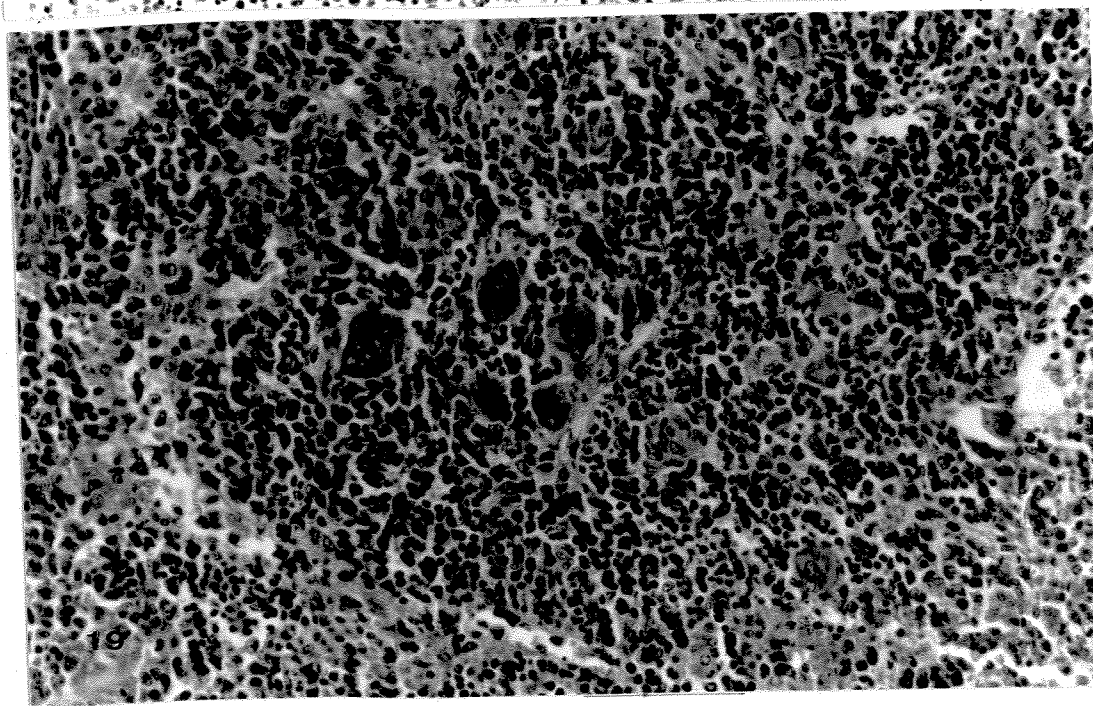
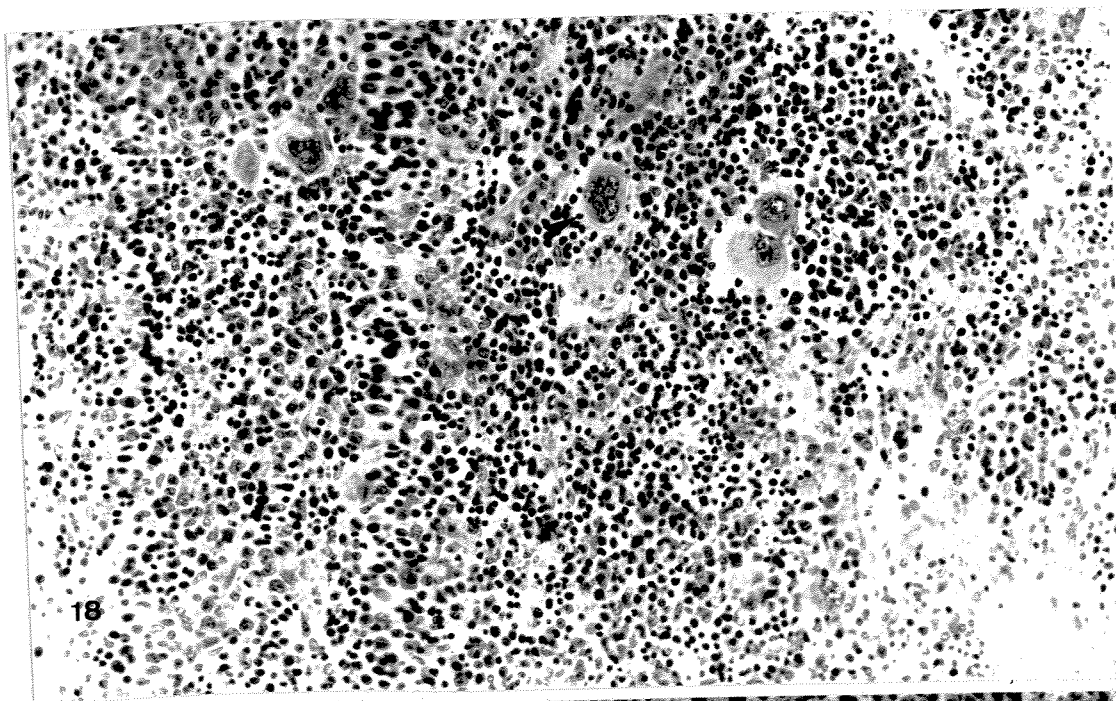


Fig. 18 - C57, 20 dias de infecção. Hiper celularidade da polpa ver melha por aumento da eritropoiese (HE, 277 x).

Fig. 19 - F1, 20 dias de infecção. Aspectos semelhantes a Fig. 18 (HE, 277 x).

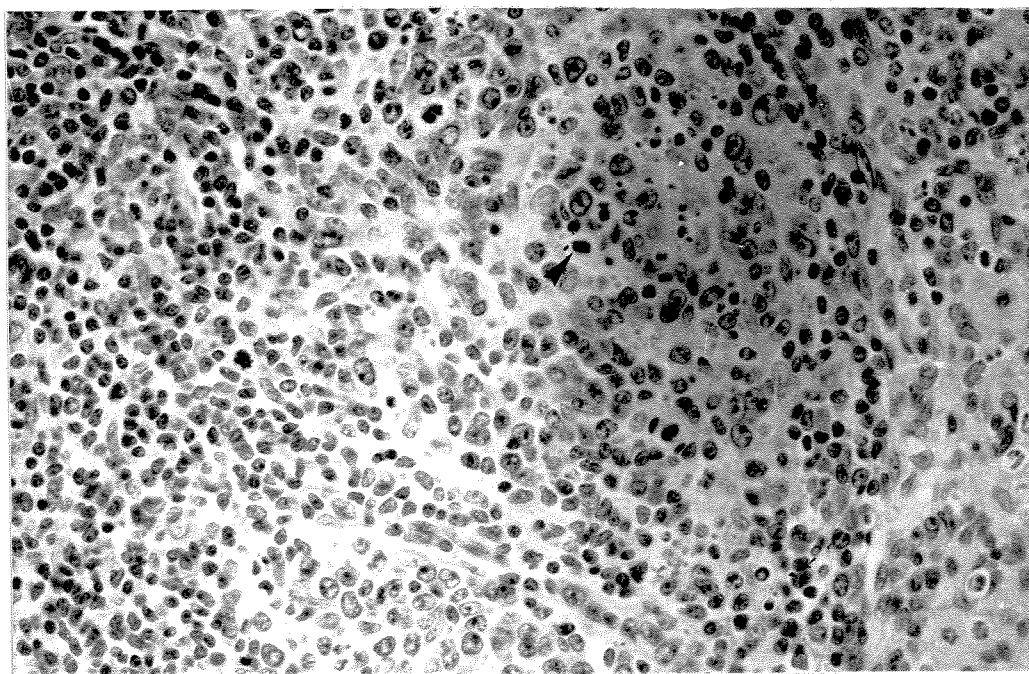


Fig. 20 - C57, 30 dias de infecção. Numerosas mitoses em centro germinativo folicular (HE, 554 x).

DISCUSSÃO

Os fenômenos que ocorrem na fase aguda da infecção pelo T. cruzi, são decisivos na evolução da fase crônica. Durante a fase aguda inicial, existem fatores controlando a proliferação dos parasitos, os quais seriam determinantes na resistência das diferentes raças à infecção e envolveriam respostas imunes do hospedeiro (TRISCHMANN, 1986).

O comprometimento precoce da resposta celular e humoral ao T. cruzi pode ser observado através da ativação de células T-helper específicas para antígenos de T. cruzi, detectada no baço de camundongos resistentes antes da ocorrência do pico de parasitemia (TARLETON e SCOTT, 1987). No entanto, não há evidências em favor da produção de anticorpos que efetivamente exerçam controle da parasitemia e/ou mortalidade nesta fase, embora seja bem conhecida a capacidade protetora opsonizante e tripanolítica dos anticorpos produzidos na fase crônica (KRETTLI e BRENER, 1982; HUDSON e GUHL, 1987 e UMEKITA et al., 1988).

Com o intuito de analisar o aparecimento da resposta imune específica inicial e seu possível papel na evolução da infecção, foi realizado estudo comparativo entre as respostas imunes das raças suscetível (CBA) e resistentes (C57) e o híbrido (F₁). Para isto, utilizou-se um inóculo de 100 formas tripomastigotas equivalentes a 2 LD₅₀ para a raça mais suscetível (SAKURADA, comunicação pessoal), a fim de provocar infecção moderada, porém suficiente para distinguir padrões definidos de resistência entre as raças em estudo (CORSINI et al., 1980).

Os camundongos híbridos F₁ apresentaram-se mais resistentes que seus parentais, não tendo-se observado mortalidade até o 20º dia de infecção,

enquanto que nos CBA e C₅₇, foi verificado 100% e 10% de mortalidade respectivamente. A parasitemia máxima dos camundongos CBA foi três vezes superior às encontradas nos C₅₇ e F₁, observando-se pico de parasitemia entre o 9º e 10º dia para os animais suscetíveis e entre o 10º e 11º dia para os resistentes (TABELA 1).

Foi possível observar que não há uma estreita correlação entre mortalidade dos animais suscetíveis e as parasitemias por estes apresentadas. É provável, que a mortalidade observada, seja consequência de danos tissulares irreversíveis provocados nas duas primeiras semanas de infecção, os quais não são reflexos da carga parasitária circulante e sim da carga parasitária tissular (TRISCHMANN et al., 1980). Nesse sentido, verificamos que quanto mais elevada a mortalidade, maior o dano tissular observado nos baços de camundongos CBA (Fig. 14).

A escolha do híbrido F₁, deveu-se ao fato de que vários trabalhos realizados no nosso laboratório utilizando estes animais, mostraram que quando infectados com 100 formas tripomastigotas, os camundongos F₁ superam a fase aguda, e após o 20º dia sofrem regressão das lesões histológicas do baço (OLIVEIRA, 1982; CORSINI et al., 1980). Na 6a. semana os camundongos F₁ produzem anticorpos que passivamente protegem os animais CBA de um desafio de 10⁵ formas tripomastigotas (GAVINO, 1985; LOUREIRO, 1985). Desta forma, o híbrido F₁ é um modelo experimental conveniente para estudar o aparecimento dos anticorpos capazes de exercer o efeito protetor detectado na 6a. semana de infecção.

Para obter tripomastigotas sanguíneas livres de células do hospedeiro, foi padronizada técnica de isolamento, a partir do sangue circulante, utilizando Hypaque a 10%, que apesar de produzir um rendimento médio de 63%, permitiu obter parasitos livres de plaquetas e com baixa contaminação de leu-

cócitos, além de manter infectividade e viabilidade igual às formas tripomastigotas sem tratamento prévio (Figura 1).

A pesquisa de imunoglobulinas adsorvidas à superfície de tripomastigotas isolados das raças CBA e F₁ forneceu dados interessantes, pois os parasitos provenientes de camundongos CBA no pico da parasitemia não apresentaram imunoglobulinas do hospedeiro na sua superfície. Por outro lado, nos F₁ a partir do 89 dia de infecção, foi possível isolar parasitos recobertos por imunoglobulinas facilmente detectáveis através de imunofluorescência direta (TABELA 2).

A presença de imunoglobulinas de camundongos na superfície de formas tripomastigotas da cepa CL, foi descrita inicialmente por KLOETZEL & DEANE (1977) e posteriormente, na cepa CL e Y por KRETTLI et al., (1979), atribuindo-se a estas moléculas qualidade lítica, pois elas seriam capazes de ativar complemento, provocando a lise do parasito. Apenas a cepa Y era suscetível à lise por estas imunoglobulinas, enquanto, a cepa CL possuiria mecanismo de fubulação através de proteases que quebraria a imunoglobulina em fragmentos não fixadores de complemento, permitindo a circulação destas no hospedeiro (KRETTLI et al., 1980).

Os resultados obtidos com os camundongos CBA, permitem levantar algumas hipóteses: os animais não produziriam anticorpos suficientemente ávidos para circular ligados ao parasito ou em quantidade suficientes para ser detectados durante o período de observação; alternativamente, o camundongo suscetível poderia selecionar clones que possuissem mecanismos de escape mais eficientes (proteases), impedindo que os anticorpos específicos para a superfície do parasito pudessem se fixar, evitando assim o controle da parasitemia exercido pelos anticorpos.

Não foi possível isolar I. cruzi a partir de camundongos C₅₇, o que proporcionaria maiores subsídios para o raciocínio, por se tratar de raça de

resistência conhecida.

Independentemente dos fatores que possam ter provocado o fenômeno descrito acima, foi possível trabalhar com tripomastigotas livres de células e de imunoglobulinas do hospedeiro, sem precisar imunossuprimir os animais fornecedores de parasitos.

Os níveis de anticorpos séricos contra as formas tripomastigotas e amastigotas produzidos pelas três raças de camundongos foram avaliados através de imunofluorescência indireta com antígenos formolizados e ELISA. Os resultados mostraram que as diferentes raças apresentaram níveis crescentes de anticorpos específicos a partir do 5º dia de infecção com predomínio de IgM. A partir do 15º dia observou-se produção semelhante dos isótipos IgG2a, IgG2b e IgM (Figs. 2 e 3).

A produção de IgG1 foi deficiente para ambas formas evolutivas do parasito em todos os animais estudados.

Em geral, não foram achadas diferenças entre raças com relação a cinética de produção de isótipos contra as formas sangüíneas e teciduais de T. cruzi nos primeiros vinte dias de infecção. Porém, em estudos realizados por BRITTO (1987), nas mesmas condições experimentais, em fase mais tardia da infecção, foi constatado que após o 28º dia, a produção de imunoglobulina nos camundongos CBA diminuiu significativamente, enquanto que os animais C57 e F1 permaneciam produzindo quantidades crescentes de anticorpos. Estes resultados confirmam as observações de SCOTT & GOSS-SAMPSON (1984), que analisaram a resposta das raças CBAT⁶ T⁶ e C57BL/J infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Y, através da reação de ELISA, utilizando epimastigotas como antígeno. Nesta análise, onde deve-se considerar a maior antigenicidade das formas epimastigotas (ZWEERINK et al., 1985; ARAÚJO et al., 1984), foi observada cinética similar com predomínio da produção de IgM até o 21º dia, com

níveis crescentes de IgG2a e níveis baixos de IgG1 e IgG3. A partir do 28º dia o isótipo mais abundante foi IgG2a.

A análise da especificidade dos anticorpos detectados por imunofluorescência e ELISA nos soros F.A.i., revelou que estes anticorpos reconhecem poucos determinantes antigênicos da superfície das formas tripomastigotas sanguíneas. Polipeptídeos na faixa de Mr 92 a 84 kDa foram reconhecidos por todos os soros a partir do 26º dia. Apenas os soros dos camundongos C57, reconheceram um polipeptídeo de Mr 60 kDa, e demonstraram uma concentração baixa de anticorpos contra os outros polipeptídeos, apesar de ter sido descrito este polipeptídeo de 60 kDa, por GRÖGL e KUHN (1985); os autores não verificaram sua possível função biológica.

O padrão de imunoprecipitação apresentado pelos soros dos camundongos CBA e C57, sugere a presença de concentrações maiores de anticorpos de baixa especificidade, produzidas provavelmente durante a intensa estimulação de células produtoras de anticorpos que ocorre nos primeiros 5 dias de infecção (TABELA VII) nestes camundongos. O mesmo padrão de precipitação foi observado por BRITTO (1987) em todas as raças estudadas. Apenas verificando-se maior intensidade nas bandas com o transcorrer da infecção, sendo mais intensas nos camundongos C57.

TAKEHARA et al. (1989), também observaram que um número reduzido de antígenos de tripomastigotas sanguíneas, foi reconhecido pelos soros de camundongos A/Sn com 20 dias de infecção e que as bandas só se intensificam com o transcorrer da infecção, denotando aumento da quantidade de anticorpos sem haver respostas a novos determinantes antigênicos.

Os antígenos 52 kDa e 85 kDa, segundo ZWEERINK et al. (1985), careceriam de significado como resposta imune, visto que foram reconhecidos por soros de camundongos C3H normais. YOSHIDA (1986), verificou que os soros de

baixa atividade lítica reconheciam componentes de Mr 52 kDa das formas tripomastigotas. Por outro lado, através de reações de ELISA, constatou-se que os camundongos suscetíveis CBA normais, possuem anticorpos contra as formas tripomastigotas e amastigotas.

O perfil autoradiográfico da superfície das formas tripomastigotas, não revelou os polipeptídeos de Mr 160 kDa presentes segundo MARTINS et al. (1985), exclusivamente nas formas tripomastigotas e contra os quais se formariam anticorpos líticos protetores. Esta diferença pode ser atribuída a utilização de procedimentos experimentais diferentes que segundo SCHECHTER e NOGUEIRA (1988) modificam o perfil antigênico obtido.

Foi possível observar desta série de experiências que os soros, obtidos na fase aguda inicial, possuem IgG específicos para antígenos de superfície de formas tripomastigotas, aos quais tem-se atribuído papel na proteção. Estes antígenos foram identificados como polipeptídeos de Mr 90 kDa (SNARY, 1983), 82, 80 e 72 kDa (YOSHIDA, 1986). No entanto, os camundongos suscetíveis também apresentam estes anticorpos em concentrações semelhantes àsquelas encontradas nos animais mais resistentes, o híbrido F₁.

Dados anteriores mostraram que existe relação entre o número de parasitos inoculados e o dia da parasitemia máxima (dia do pico de parasitemia) (LOUREIRO, 1985). Deste modo, é possível inferir-se o número de parasitos viáveis presentes num inóculo através de determinação do dia do pico. Nas experiências em que estudamos o efeito dos soros de fase aguda inicial sobre as formas tripomastigotas sanguíneas através da incubação destas, com os soros de diferentes dias de infecção, não observamos qualquer diferença no número de parasitos, nem na virulência dos tripomastigotas assim tratados, indicando que os anticorpos presentes nos soros dos camundongos, apesar de conter a partir do 15º dia níveis semelhantes de IgM e IgG2a e IgG2b, estes não estariam em quantidades suficientes, ou não teriam as propriedades dos soros protetores.

Os soros protetores de fase crônica têm apresentado duas propriedades biológicas distintas e importantes no controle dos parasitos: a) propriedades opsonizantes (SCOTT e MOYES, 1982; KIERSZEMBAUM et al., 1985) que dependem do fragmento Fc da IgG e de C3 (MOTA e UMEKITA, 1989 e UMEKITA et al., 1988); b) propriedades líticas: os anticorpos líticos descritos por KRETTLI et al. (1979), ativadores de complemento através da via alternativa (KIPNIS et al., 1985) aos quais atribuem-se participação decisiva na proteção (STEPHANI et al., 1983), ligando-se diretamente com a superfície de formas tripomastigotas vivas (KRETTLI e BRENER, 1982).

Tanto os anticorpos opsonizantes como os líticos têm sido observados por TAKEHARA et al. (1989) a partir do 15º dia após infecção, aumentando gradativamente a concentração com o tempo. O interessante, é que foram observados em camundongos A/Sn altamente suscetíveis, utilizando soro humano como fonte de complemento (MOTA & UMEKITA, 1989 e UMEKITA et al., 1988).

Nossos resultados não evidenciaram qualquer efeito lítico significativo nas formas tripomastigotas tratadas com soros F.A.i. do 15º dia que apresentavam anticorpos anti tripomastigotas vivos (TABELA IV), embora fossem tomadas todas as precauções no sentido de evitar consumo das frações do complemento ou o fenômeno de "capping" (SCHMUNIZ et al., 1978).

Os ensaios no sentido de realizar reações "in vitro" de lise de tripomastigotas seguindo a técnica descrita por KRETTLI et al. (1982), utilizando soro murino (F₁) como fonte de complemento, e soros F.A.i., não tiveram sucesso devido à ausência de lise e excessiva aglutinação dos parasitos. Esta dificuldade foi comentada por GONZALES-CAPPA et al. (1979), os autores utilizaram cepa Tulahuen de T. cruzi e soro imune de 60 dias de infecção e complemento de camundongo.

Experiências preliminares foram realizadas para escolher a fonte de Complemento murino utilizando soros do 20º dia e soro crônico (TABELA V). A

maior eficiência para provocar lise com os soros padrões, assim como a quantidade híbrida, nos indicou os soros de camundongos F₁. Como pode ser observado, o Complemento de camundongos não é tão eficiente para provocar lise como o Complemento humano. KRETTLI et al.(1979), obtiveram apenas 50% das lises que obtinham com Complemento humano ao utilizarem Complemento de camundongo.

Nosso interesse em verificar a capacidade lítica de anticorpos de fase aguda, utilizando Complemento murino se baseia nos trabalhos de SASSI et al. (1987), que descrevem a presença de inibidores do componente terminal C5-C7 no soro de camundongos e, os trabalhos de KLAUSS et al. (1979), que demonstraram que o Complemento de camundongos é ativado pelos isótipos IgG2 pela via clássica, enquanto que IgM não ativa o Sistema Complemento, porém pode competir pelos sítios de fixação com IgG2. Nossos resultados expressos na TABELA VI, sugerem que os anticorpos anti-tripomastigotas, na presença de complemento homólogo na fase inicial da infecção não exercem efeito significativo nos tripomastigotas sanguícolas, talvez, pelas concentrações de IgM presente nesta fase, competindo pelo sítio de fixação com as IgG2 também presentes nos soros F.A.i. de 15º e 20º dia.

A discrepância observada nos camundongos CBA os quais, apesar de apresentarem anticorpos anti-tripomastigotas viáveis no soro, não fixam anticorpos na superfície dos tripomastigotas circulantes; pode apenas ser entendida se assumirmos que se trata de anticorpos diferentes com a mesma especificidade, porém produzidos em tempos diferentes: a) anticorpos de produção mais precoce, presentes nos camundongos F₁ resistentes que se fixam na superfície dos tripomastigotas circulantes, facilitariam através de opsonização ou lise, o controle da parasitemia; b) anticorpos de produção mais tardia produzidos tanto por camundongos suscetíveis e resistentes, os quais na fase aguda não exerceriam nenhum efeito significativo sobre as formas tripomastigotas (TABELA IV e VI).

As primeiras observações sobre a presença de anticorpos contra hemácias de carneiro em soro de indivíduos chagásicos, foram feitos por LELCHUCK, et al. (1970). A incubação destes soros com formas evolutivas de T. cruzi, absorveram parcialmente estes anticorpos, indicando a presença de anticorpos heterófilos durante a infecção, possivelmente, como resultado de estimulação policlonal produzida pela infecção pelo T. cruzi.

CORSINI & COSTA (1981a e b) demonstraram que era possível reproduzir a ativação policlonal em camundongos suscetíveis Balb/c, mediante a inoculação de extratos solúveis de formas tripomastigotas da cepa Y, sugerindo que o parasito teria um efeito mitogênico sobre as células formadoras de anticorpos.

CUNNINGHAM, et al. (1981), obtiveram resultados semelhantes, utilizando outros extratos antigênicos de T. cruzi. Estes autores, sugeriram que a ativação policlonal poderia estar relacionada com a maior suscetibilidade ao parasito em algumas raças.

Em nossos experimentos, houve a preocupação de estudar nos camundongos CBA, C57 e F1 infectados, livres de imunizações prévias, a produção espontânea de células produtoras de anticorpos IgM para hemácias de carneiro, através de PFC diretas (TABELA VII).

Foi observado um aumento significativo das PFC nos baços de camundongos CBA e F1, a partir do 5º dia de infecção, enquanto que, os camundongos considerados resistentes (raça C57), sofreram um aumento mais gradativo para atingir o máximo no 20º dia após infecção. Nos camundongos CBA, esta ativação diminuiu a partir do 10º dia e, os poucos animais sobreviventes até o 20º dia após infecção, demonstraram um baixo número de PFC. As células dos baços dos camundongos F1, também sofreram uma diminuição no número de unidades celulares formadoras de anticorpos, porém, a partir do 20º dia pós infecção, são estimulados violentamente e, o número de PFC aumenta a níveis próximos aos

atingidos pelos camundongos C57, parecendo sofrer dois tipos de ativação policlonal: uma inicial "tipo CBA" e outra mais lenta "tipo C57".

Nossos resultados diferem daqueles encontrados por CUNNINGHAM et.al. (1981). Estes autores observaram nos camundongos C57 ativação crescente de PFC a partir do 10º dia até o 21º dia após infecção e, depois do 21º dia até o 120º dia de infecção os níveis de PFC mantêm-se elevados. Estes valores, são 20 vezes maiores que os atingidos pelos camundongos normais controles, enquanto que os camundongos suscetíveis C3H(He) demonstraram uma atividade anticórpica muito deficiente até o 15º dia após infecção, ocasião em que se observou um rápido aumento. Variáveis como: raça dos camundongos, inóculo e cêpa do parasito, deverão ser considerados para compreender esta divergência.

Nossos resultados sugerem que os animais suscetíveis possuem populações de células mais facilmente estimuláveis que as populações resistentes, embora estes últimos estejam visivelmente estimulados em torno do 10º dia de infecção (Fig. 5, TABELA VII).

Experiências anteriores, realizadas em animais CBA infectados com o mesmo inóculo no coxim plantar, demonstraram aumento significativo da celularidade dos linfonodos (BALESTIERI, 1985). Por outro lado, trabalhos mais recentes de MINOPRIO, et. al. (1986 a) demonstraram ativação policlonal nas células provenientes de linfonodos de camundongos C3H e C57 infectados com cêpa CL, equivalentes às observadas nos baços dos mesmos animais.

Estudos realizados pelo grupo do Instituto Pasteur (D'IMPÉRIO E LIMA, et. al. 1986; MINOPRIO, et. al. 1986a; MINOPRIO, et.al. 1986b) sobre ativação policlonal em camundongos C3H/HeJ infectados com cêpa CL de T. cruzi, demonstraram que, estes desenvolveram PFC aumentadas a partir do 2º dia de infecção. A análise dos isótipos de Imunoglobulinas mostrou que houve aumento de 100 vezes no número de células produtoras de IgG1, IgG2a e IgG2b. Também foi pos-

sível, observar aumento das populações celulares LB, L3T4-helper e LyT2+supressora e citotóxica neste período inicial. No 109 dia de infecção, o aumento de PFC era maior nos baços dos animais suscetíveis (C3H) que sofriam diminuição, na medida em que a parasitemia era controlada por estes animais, enquanto que os camundongos resistentes C57BL/10, demonstraram menor estimulação neste dia e a ativação persistiu além do desaparecimento da parasitemia (de 2 até 6 meses).

Estes resultados são similares aos observados por nós em termos de células formadoras de anticorpos. As células dos camundongos resistentes parecem requerer um tempo maior para serem ativadas.

Pareceria que os mecanismos de ativação de clones celulares, estariam relacionados com a suscetibilidade dos animais. As células dos camundongos suscetíveis seriam mais facilmente estimuladas pelo parasito (receptores), de modo que, sofrem uma ativação violenta e fugaz, enquanto que, nos animais resistentes, a ativação policlonal persiste por mais tempo (LALONDE, et. al. 1985) descreve este fenômeno nos camundongos C57 desde o 109 dia até o início da fase crônica (320 dias).

A despeito do baço não possuir função importante no controle da parasitemia, analisou-se estes órgãos dos animais experimentais, visto que, ao longo deste trabalho, tinha-se observado nestes e mais prematuramente nos camundongos suscetíveis, esplenomegalia, aumento da celularidade (Fig. 6), alterações na consistência tornando-se friáveis e hemorrágicos, indicando um órgão profundamente comprometido pela infecção pelo T. cruzi.

Desde 1955, TALIAFERRO e PIZZI haviam descrito as alterações produzidas no baço de camundongos C3H infectados com T. cruzi (cêpa Tulahuê). Estas alterações eram: esplenomegalia progressiva, hiperplasia e fenômenos degenerativos poucos dias depois da infecção com inóculos grandes (10^5) de T. cruzi, pa

rasitismo de macrófagos, células reticulares, depleção de linfócitos nos centros dos folículos e, acompanhando a evolução da infecção, presença de áreas depletadas de linfócitos na polpa vermelha e branca.

LIMA PEREIRA (1978) também descreve achados histopatológicos similares, ressaltando que em alguns casos foram achados focos de necrose.

Realizamos análise histopatológica dos baços de camundongos CBA, C57 e F1 ao longo da infecção, durante 20 dias, a fim de confrontar as respostas imunes encontradas nestes órgãos e o aspecto morfológico das células esplênicas. O estudo de cortes de baços normais, mostrou que os camundongos suscetíveis apresentaram folículos linfóides ligeiramente maiores que as outras raças consideradas resistentes.

Quarenta e oito horas depois da infecção com 100 tripomastigotas da cepa Y, foi observada atividade fagocitária intensa, especialmente nos camundongos CBA. Dez dias depois, coincidindo com estimulação policlonal observada em PFC diretas, os centros germinativos apresentaram intensa atividade mitótica e a eritropoiese na polpa vermelha tornou-se mais acentuada. A atividade mitótica nas células esplênicas das outras raças parece ser mais discreta nos primeiros dias.

No 10º dia, coincidindo com o pico de parasitemia e somente no camundongo suscetível, se observa a presença de amastigotas que aumentam significativamente em número no 15º dia de infecção. Nesta fase, no camundongo CBA, aparece extensas áreas de destruição celular, sendo concebível que as células mononucleares tenham sofrido diminuição.

Apesar de não termos observado parasitos no material proveniente dos camundongos F1 e C57, pode-se observar fenômenos similares com aumento da eritropoiese, proliferação celular na polpa vermelha e aumento dos folículos linfóides. Porém, não foi observado focos de necrose tão evidentes como nos

camundongos CBA.

No 20º dia da infecção, houve regressão das alterações, não foram encontrados parasitos nos animais CBA e havia indícios de recuperação através das áreas de hematopoiese do órgão (em todas as raças) (Figs. 18 e 19). Amostras de baço colhidas no 30º dia de infecção, apresentam ainda numerosas mitoses nos centros germinativos foliculares e na polpa vermelha, indicando assim, uma estimulação de células linfóides mais tardia, e provável recuperação da resposta imune a nível esplênico.

A presença de folículos linfóides maiores observados nos camundongos CBA normais, deve ser considerada com atenção, pois poderia estar relacionada com os níveis de IgM presente nos soros desta raça.

Nossos resultados ainda incompletos, por não terem marcado seletivamente as populações de células linfóides, a fim de fornecerem maiores informações sobre a capacidade funcional dessas células durante os primeiros dias de infecção, sugerem que as células esplênicas dos camundongos F₁ e C57, sofrem efeitos menos drásticos devido à parasitose.

A descrição das alterações funcionais e morfológicas de baços de camundongos F₁ infectados com a mesma cepa e em condições semelhantes às nossas, coincidem no sentido de demonstrar alterações moderadas nestes animais (OLIVEIRA, 1982). As análises histopatológicas realizadas por MELO, et. al. (1978) e ANDRADE, et. al. (1963), foram feitas em animais infectados com inóculos grandes, de modo que as alterações observadas ocorriam num tempo mais curto e com maior intensidade, provavelmente pela carga parasitária que os animais suportaram.

Nossa visão sobre a resposta imune dos camundongos infectados pelo I. cruzi, adquire outro enfoque quando confrontamos a resposta humoral observada com estes resultados que, sugerem uma estimulação celular exagerada e inútil

por parte dos animais suscetíveis. MINOPRIO et al. (1988), complementa este ponto de vista, com resultados que demonstram que a maior parte das células produtoras de anticorpos nesta fase, estão produzindo isótipos IgG2a, IgG2b e IgM de variadas especificidades. Estando comprometidas com a resposta específica somente pequena população de células.

A limitada gama de determinantes antigênicos reconhecida pelos soros F.A.i., assim como, os baixos títulos de anticorpos específicos atingidos até o 20º dia pelos animais infectados (Figs. 2,3,4 e 7), estariam de certo modo, justificados com estas informações.

Por outro lado, a análise histopatológica dos baços, mostrou um órgão linfóide intensamente comprometido em divisões celulares nos primeiros dias de infecção, o qual sofre parasitismo intenso e destruição celular (Figs. 14 e 17). Estes mesmos fenômenos, de maneira mais discreta ou mais tardia, pareceriam ocorrer também nas raças mais resistentes (Figs. 18, 19 e 20).

As intensas áreas de necrose observadas nos baços dos animais infectados, já seria um fator importantíssimo no estabelecimento de uma resposta celular deficiente, como tem sido sugerido por TARLETON (1988). Tendo visto que a maioria dos trabalhos que concluem haver uma imunossupressão inicial, foram realizados utilizando células esplênicas de camundongos de diferentes padrões genéticos e condições experimentais (RAMOS et al. 1979; REED et al. 1984; TARLETON e KUHN, 1985).

Outros parâmetros, agora voltados para respostas precoces mais imediatas, como as respostas não específicas fagocitárias (CAMARGO et al., 1989) e fatores séricos, deverão ser revistos, a fim de analisar os fatores que poderão efetivamente influir no primeiro contato entre o parasito e hospedeiro e determinar a evolução da infecção para uma associação harmônica como observada nos hospedeiros naturais de I. cruzi, ou descompensada como a analisada por nós em hospedeiro não natural como o camundongo.

CONCLUSÕES:

No estudo comparativo entre as raças CBA/J (suscetível), C57BL/10 (resistente) e C57BL/10 x CBA/J) F₁, infectados com 100 formas de T. cruzi pode-se concluir que nos primeiros dias de infecção:

- a) Todas as raças produziram níveis crescentes de imunoglobulinas específicas para formas tripomastigotas e amastigotas com predomínio de IgM. A cinética de produção, assim como os níveis séricos de IgG2a e IgG2b foram iguais nas raças estudadas.
- b) Os camundongos CBA apresentaram níveis maiores de anticorpos naturais para T. cruzi.
- c) Os anticorpos produzidos a partir do 15º dia, reagem com formas tripomastigotas vivas porém, não alteram a capacidade infectante, nem o curso da infecção quando incubados previamente com o parasito e complemento murino.
- d) Apesar dos camundongos CBA, produzirem anticorpos contra a superfície de tripomastigotas viáveis, estes anticorpos não estão presentes nos parasitos circulantes.
- e) Dois padrões de ativação policlonal foram observados nesta fase. Ativação policlonal precoce nos camundongos suscetíveis CBA que regride a partir do 10º dia; e ativação policlonal lenta, porém

demorada apresentada pelos camundongos resistentes C57. O híbrido F₁, apresentou padrão misto.

- f) A análise histopatológica dos baços demonstrou maior comprometimento do órgão nos camundongos CBA os quais apresentaram tripassinomas nos macrófagos da polpa vermelha a partir do 10º dia, associado com focos de necrose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, S.G.; ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; MAGALHÃES, J.B. e BARRAL-NETO, M. Immunological response of swiss mice to infection with three strains of Trypanosoma cruzi. Ann. of Trop. Med. and Parasit. 79(4):397-407, 1985.
- ANDRADE, Z.A. e LOPES, E.A. A histochemical study of experimental Chagas' Disease. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 5, 223-242, 1963.
- ARAÚJO, F.G. HEILMAN, B. e TIGHE, L. Antigens of Trypanosoma cruzi detected by different classes and subclasses of antibodies. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 78, 672-677, 1984.
- BALESTIERI, F.M.P. Estudo das populações celulares em gânglios poplíteos em camundongos infectados com Trypanosoma cruzi. Tese Mestrado. UNICAMP. Campinas, SP, 1985.
- BRITO, M.H. Evolução da resposta imune humoral e caracterização dos antígenos envolvidos na infecção experimental pelo T. cruzi. Tese UNICAMP. Campinas, 1987.
- CAMARGO J.B.; SAKURADA J.K.; ZUCATO M.R.L., ARAÚJO P.F. e RANGEL H.A. - The early phase of the imune response of CBA mice infected with Trypanosoma cruzi. Immunology Letters 20:213-216, 1989.

CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of T. cruzi in a slide test. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo 8(5) : 227-234, 1966.

CHAGAS, C. Sobre a verificação do Trypanosoma cruzi em macacos do Pará (Chryzothrix sciurens) Sci. Med., 2:75-78, 1924.

CHAGAS, C. Papel do tatú (Tatusia novemcincta) na transmissão do Trypanosoma cruzi. Rev. Med. Cir. Brasil, 26:220-223, 1918.

CORSINI, A.C. e COSTA, M.G., Immunossuppression in mice infected with Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909). I Evidences of polyclonal B cell activation in experimental infection mimicked by and extract prepared by circulating tripomastigotes. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 23:114-121, 1981 a.

CORSINI, A.C. e COSTA, M.G. Immunossuppression in mice infected with Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909). II Tripomastigote Crude Extract (TCE) suppress the humoral immune response in mice. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 23 : 122-126, 1981 b.

CORSINI, A.C.; COSTA, M.G.; OLIVEIRA, L.P.O.; CAMARGO, J.J.B. and STELINI, Jr. A. Susceptibility of inbred mice to Trypanosoma cruzi strain Y. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 22:(4):192-196, 1980.

COUTINHO, A. Immunity versus immunobiology of infections: an outsider's view on lymphocyte repertoires, activities and organization in normal and infected mice. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 83(Suppl 1):236 - 239, 1988.

- CULBERTSON, J.T. and KESSLER, W.R. Age resistance of mice to Trypanosoma cruzi. Journal of Parasitology. 28:155-158, 1942.
- CUNNINGHAM, D.S., KUHN, R.E., TARLETON, R.L. e DUNN, R. Trypanosoma cruzi: effect on B-cell-responsive and responding clones. Exp Parasitol. 51, 257-268, 1981.
- DEANE, L.M. Inquérito de toxoplasmose e de tripanossomiase realizado em Cachoeira do Arari, Ilha de Marajó, Pará, pela V. Bandeira Científica do Centro Acadêmico Oswaldo Cruz da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Rev. Paul. Med., 66, 296, 1965.
- DEANE, L.M.; DEYAMA, A.Y. e CÉSAR, A.P. Inquérito de toxoplasmose e de tripanossomiase realizado no território do Amapá pela III Bandeira Científica do Centro Acadêmico Oswaldo Cruz da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Rev. Med. São Paulo, 47, 1, 1963.
- D'IMPÉRIO e LIMA, M.R.; JOSKOWICZ, M; COUTINHO, A; KIPNIS, T. e EISEN, H. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cells responses in mice infected with T. cruzi Eur.J. Immunol. 15:201-203, 1985.
- DRESSER, D.W. and GREAVES, M.F. Assay for antibody-producing cell in : Handbook of experimental immunology - D.W. Weir Ed. Blackwell Scientific Publications Ltd Oxford pg 271, 1973.
- FRAKER, F.J. e SPECK, J.C. Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloroamide 1,3,4,6 -tetrachloro - 3,6 - diphenyl-glycoluril. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849-857, 1978.

GAVINO, V.A. Doença de Chagas: atividade protetora dos soros de camundongos infectados com formas tripomastigotas sanguíneas ou de cultura de tecido. Tese. UNICAMP, Campinas, São Paulo, 1985.

GONZALES CAPPA, S.M.; KATZIN, A.M.; LAJMANOVICH, S. Trypanosoma cruzi: actividad de Immunosueros de ratón sobre el estadio tripomastigote. Medicina (Buenos Aires) 39:187-192, 1979.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the lowry method that gives a linear photometric response. Analyt Biochem., 48, 422-427, 1972.

HAUSCHKA, T.S. Sex of host as factor in Chagas' Disease. J. Parasitol., 33: 399-404, 1947.

HUDSON, L. e GUHL, F. Definition of Trypanosoma cruzi antigens by antibodies and T cells. in: Host parasite cellular and molecular Interactions in protozoal infections. CHANG, K.P. e SNARY, D. eds. NATO ASI Series Vol. H 11, SPRINGER VERLAG, 1987.

JANSEN, A.M. Aspects of succesful host-parasite association: opossum and Trypanosoma cruzi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 83 (Supl 1): 491-496, 1988.

KESSLER, S.W. Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A - antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with Protein A. J. Immunol., 115, 1617-1624, 1975.

KIERSZEMBAUM, F. Autoimmunity in Chagas' Disease. J. Parasit., 72 (2) : 201-211, 1986.

KIERSZEMBAUM, F.; LIMA, M.F. e WIRTH, J.J. Effects of antiserum to Trypanosoma cruzi on the uptake and rate of killing of vector-borne metacyclic forms of the parasites by macrophages. Int. J. Parasitol., 15, 409-413, 1985.

KIERSZEMBAUM, F. e HOWARD, J.G. Mechanisms of resistance against experimental Trypanosoma cruzi infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. J. Immunol., 116, 1208-1211, 1976.

KIPNIS, T.L.; SUCUPIRA, M. e DIAS DA SILVA, W. Transformation of Trypanosoma cruzi trypomastigotes bloodstream forms by immune IgM and its Fab u fragment into activators of the alternative complement pathway. Braz. J. Med. Biol. Res. 20(1):105-114, 1987.

KIPNIS, T.L.; KRETTLI, A.U.; DIAS DA SILVA, W. Transformation of trypomastigote forms of Trypanosoma cruzi into activators of alternative complement pathway by immune IgG fragments. Scand. J. Immunol., 22, 217-226, 1985.

KLAUSS, G.G.B.; PEPYS, M.B.; KITAYIMA, K; ASKONAS, B.A. Activation of mouse complement by different classes of mouse antibodies. Immunology, 38, 687-695, 1979.

KLOETZEL, J. e DEANE, M.P. Prescence of Immunoglobulins on the surface of bloodstream Trypanosoma cruzi. Capping during differentiation in culture. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 19:397 - 402, 1977.

- KOBERLE, F. Chagas'Disease and Chagas'Syndromes: the pathology of American Trypanosomiasis. Adv. Parasit., 6, 63, 1968.
- KRETTLI, A.U. e BRENER, Z. Resistance against Trypanosoma cruzi associated to anti-living trypomastigote antibodies. J. Immunol., 128:2009-2012, 1982.
- KRETTLI, A.U. e BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections. J. Immunol., 116, 755-760, 1976.
- KRETTLI, A.U., THOMAS N e EISEN H. Escape mechanisms of Trypanosoma cruzi from the host immune system. INSERM, 97, 553-558, 1980.
- KRETTLI, A.U., WEISZ-CARRINGTON, P. e NUSSENZWEIG, R. Membrane-bound antibodies to bloodstream Trypanosoma cruzi in mice. Strain differences in susceptibility to complement mediated lysis. Clin. Exp. Immunol., 37, 416-423, 1978.
- LAEMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685, 1970.
- LALONDE, R.G.; ALI-KHAN, Z.; TANOWITZ, H.B. Trypanosoma cruzi regulation of mitogenic responses during infection in genetically resistant and susceptible inbred mouse strains. Expl. Parasitol, 59, 33-43, 1985.
- LELCHUCK, R.; DALMASSO, A.P.; INGLESINI, C.L.; ALVAREZ, M. e CERISOLA, J.A. Immunoglobulins in serum of patients with American Trypanosomiasis (Chagas'Disease). Clin. Exp. Immunol., 6, 574, 1970.

- LIMA PEREIRA, F.E. Observações sobre a Imunodepressão durante a fase aguda da infecção do camundongo albino pelo Trypanosoma cruzi. Tese. UFMG. Belo Horizonte, MG, 1978.
- LOUREIRO I. V. de M. Evolução da infecção experimental por Trypanosoma cruzi em camundongos passivamente imunizados. Tese UNICAMP. Campinas, S.P., 1985.
- MARTINS, M.S.; HUDSON, L.; KRETTLI, A.U.; CANÇADO, J.R. e BRENER, Z. Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to Trypanosoma cruzi infection. Clin. Exp. Immunol., 61(2): 343-350, 1985.
- Mc HARDY'N Passive protection of mice against infection with Trypanosoma cruzi with plasma: the use of blood and vector bug - derived trypomastigote challenge. Parasitology 80:471-478, 1980.
- MELO, R.C. e BRENER, Z. Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains. J. Parasitol., 64, 475-482, 1978.
- MINOPRIO, P.M.; BURLIN, O.; PEREIRA, P.; GUILBERTO, B.; ANDRADE, L.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ & COUTINHO A. Most cells in acute Trypanosoma cruzi infection lack parasite specificity. Scand J. Immunol. 28, 553-561, 1988.
- MINOPRIO, P.M.; EISEN, H.; FORNI, L.; D'IMPERIO LIMA, R.; JOSKOWICZ, M.; COUTINHO, A. Polyclonal lymphocyte response to murine Trypanosoma cruzi infection. - I. Quantitation of both T and B cell response. Scand. J. Immunol. 24, 661-668, 1986 a.

- MINOPRIO, P.M.; COUTINHO, A.; JOSKOWICZ, M; D'IMPÉRIO LIMA, M.R. e EISEN, H. Polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. Scand. J. Immunol., 24, 669-679, 1986 b.
- MOTA I; UMEKITA L.F. The effect of C₃ depletion on the clearance of Trypanosoma cruzi induced by IgG antibodies. Immunology Letters 21: 223-226, 1989.
- MURFIN, D.J.; CHOROMANSKY, L e KUHN, R.E. Relationship of infection to susceptibility and Immune response of inbred mice to y strain Trypanosoma cruzi. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41(1):41-46, 1989.
- OLIVEIRA, P.L.O. de. Immunossupressão na infecção pelo Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi (CHAGAS, 1909). II Alterações em órgãos linfóides e não linfóides de camundongos (CBA/H x C57 B1/10) F1. Tese. UNICAMP. Campinas, São Paulo, 1982.
- PEREIRA BARRETO, M. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A. eds. Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Guanabara Koogan, 1979.
- PEREIRA DA SILVA, L.H. & NUSSENSWEIG, V. Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin. e Biol., São Paulo, 20, 191-208, 1953.
- PIZZI, T.; AGOSIN, M.; CHRISTEN, R.; HOEKEHER, G. and NEGhme, A. Estudios sobre la inmunobiología de las enfermedades parasitárias: I Influencia de la constitución genética en la resistencia de las lauchas a la infección experimental por Trypanosoma cruzi, Biol. Inf. Parasit. Chilenas, 4, 48, 1949.

- POSTAN M.; DVORAK J.A.; Mc DANIEL J.P. Studies of Trypanosoma cruzi clones in inbred mice. I.A Comparision of the course of infection of C3H/HEN mice with two clones isolated from a common source. Am. J. Trop. Med.Hyg. 32:497-506, 1983.
- RAMOS, C.; SCHADLER-SIWON, I., ORTIZ-ORTIZ, L. Suppressor cells present in the spleens of Trypanosoma cruzi infected mice. J. Immunology, 122 (4):1243-1249, 1979.
- REED, S.G.; INVERSO, J.A. e ROTERS, S.B. Suppressive antibody responses to sheep erythrocytes in mice with chronic Trypanosoma cruzi infections are restored with Interleukin-2. J. Immunol., 133, 3333-3338, 1984.
- ROMEIRO, S.A.; TAKEHARA, H.A. e MOTA, I. Isotype of lytic antibodies in serum of Chagas'disease patients. Clin. Exp. Immunol., 55, 413, 1984.
- ROTHHAMER, F. Chagas disease in chilean mummies. Parasitology Today 1 (1) 3-9, 1985.
- SANTOS-BUCH, C.A. e TEIXEIRA, A.R.L. The immunology of experimental Chagas' Disease. III Rejection of allogeneic heart cells in vitro. J. Exp. Med., 140, 38-53, 1974.
- SASSI F; HUGO F; MUHLY M; KHALED, A e BNAKDI. A reason for the cytolytic inefficiency of murine serum J. Immunol. 62, 145-147, 1987.
- SCHECHTER, M e NOGUEIRA, N. Variations induced by different methodologies in Trypanosoma cruzi surface antigen profile. Molecular & Biochem. Parasitol. 29, 37-46, 1988.

- SCHMUNIZ, G.A.; SZARFMAN, A.; LANGEMBACH, T e SOUZA, W. Induction of capping in blood-stage trypomastigotas of Trypanosoma cruzi by human anti-Trypanosoma cruzi antibodies. Infect. Immunity, 20, 267-272, 1978.
- SCOTT, M.T. e GOSS-SAMPSON, M. Restricted IgG isotype profiles in T. cruzi infected mice and Chagas'disease patients. Clin. Exp. Immunol., 58, 372-379, 1984.
- SCOTT, M.T. e MOYES, L. Se methionine labeled Trypanosoma cruzi blood trypomastigotes: opsonization by chronic infection serum facilitates killing in spleen and liver. Clin. Exp. Immunol., 48:754-757, 1982.
- SCOTT, M.T. The nature of immunity against Trypanosoma cruzi in mice recovered from acute infection. Parasit. Immunol., 3, 209 -218, 1981.
- SIEGEL, S. Estatística não paramétrica (para as ciências do comportamento). Edit. Mc Grāw-Hill do Brasil Ltda., 1975.
- SNARY, D. Cell surface glycoproteins of Trypanosoma cruzi: protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera . Trans. Roy Soc. Trop. Med. and Hyg., 77 (1):126-129, 1983.
- STEPHANI, M.M.A.; TAKEHARA, H.; MOTA; I. Isotype of antibodies responsible for immune lysis in T. cruzi infected mice. Immunology Letters, 7:91-97 , 1983.
- TAFURI, W.L. Patogenia da Doença de Chagas. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 29(4):194-199, 1987.

- TAKÁCS, B. Electrophoresis of proteins in polyacrilamide slab gels. In: Immunological Methods. Academic Press Inc. pp. 81-105, 1979.
- TAKEHARA, H.A.; DA SILVA, A.M.M.; BRODSKYN C. I e MOTA I. A comparative study of anti - Trypanosoma cruzi serum obtained in acute and chronic phase of infection in mice. Immunology Letters, 23: 81-86, 1989.
- TAKEHARA, H.A.; CARDOSO, D.F.; SILVA, A.M.M. da e MOTA, I. Lytic antibodies elicited by Trypanosoma cruzi infections recognize epitopes present on both bloodstream trypomastigote and epimastigote forms of parasite. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 30(5):351-356, 1988.
- TAKEHARA, H.A.; PERINI, A.; DA SILVA, M.H. e MOTA, I. Trypanosoma cruzi: role of different antibody classes in protection against infestation in the mouse. Exp. Parasitol., 52, 137-146, 1981.
- TALIAFERRO, W.H. e PIZZI, T. Connective tissue reaction in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of Trypanosoma cruzi. J. Inf. Dis., 96, 199-226, 1955.
- TARLETON, R.L. Regulation of lymphokine production in experimental and human Chagas' Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 83(Suppl1): 268, 1988.
- TARLETON, R.L. e SCOTT, D.W. Initial induction of immunity, followed by suppression of responses to parasite antigens during Trypanosoma cruzi infection of mice. Parasit Immunology, 9, 579-589, 1987.

TARLETON, R.L. and KUHN, R.E. Measurement - specific immune responses in vitro: evidence for suppression of the antibody response to Trypanosoma cruzi. Eur. J. Immunol. 15, 845-50, 1985.

TARLETON, R.L. e KUHN, R.E. Changes in cell populations and Immunoglobulin-producing cells in the spleens of mice infected with Trypanosoma cruzi: correlations with parasite-specific antibody response. Cell Immunol. 80 (2):392-404, 1983.

TEIXEIRA, A. Doença de Chagas e outras doenças por Tripanossomos. Editora Universidade de Brasília, 1987.

TEIXEIRA, A.R.L.; TEIXEIRA, L. e SANTOS-BUCH, C.A. The immunology of experimental Chagas'disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas'disease in man. Amer. J. Path. 80, 163-180, 1975.

TRISCHMANN, T.M. Trypanosoma cruzi: Early parasite proliferation and host resistance in inbred strains of mice. Exp. Parasitol. 62, 194-201, 1986.

TRISCHMANN, T.M. and BLOOM, B. Genetic of murine resistance to Trypanosoma cruzi. Infection and Immunity, 35(2):546-551, 1982.

TRISCHMANN, T.M. & BLOOM, B.R. Trypanosoma cruzi: ability of T cell enriched and depleted lymphocyte populations to passively protect mice. Experimental Parasitology, 49:225-232, 1980.

TRISCHMANN, T.M.; TANOWITZ, H.; WITTNER, M.; BLOOM, B.R. Trypanosoma cruzi: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. Experimental Parasitology, 45: 160-168, 1978.

UMEKITA, L.F.; TAKEHARA, H.A. e MOTA, I. Role of the antibody Fc in the immune clearance of Trypanosoma cruzi. Immunology letters. 17, 85-89 , 1988.

VOLLER, A.; BARTLETT, A. e BIDWELL, D.E. Enzyme immunoassay for parasitic diseases. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg. 70(2):98-106, 1976.

(WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION. Memoranda. Immunology of Chagas' Disease. Bull. World. Org., 50:459-472, 1974.

WIRTH J.J. & KIERSZEMBAUM F. Inhibition of mammalian host cell infection by insect-derived, metacyclic forms of Trypanosoma cruzi in the presence of human on rabbit anti-T. cruzi antibodies. Int. J. Parasit 17(3):841-485 , 1987.

YOSHIDA, N. Trypanosoma cruzi: recognition of trypomastigote surface antigens by lytic antisera from mice resistant to acute infection. Experimental Parasitology 61:184-194, 1986.

ZWEERINK, H.J.; ANDERSON, F.O.; GREENBLATT, H.C.; MURRAY, K.P. Parasite specific antibodies in the three strains of mice after infection with Trypanosoma cruzi. J. Parasit 71(1):45-49, 1985.

ZINGALES, B.; ANDREWS, N.W.; KUWAJIMA, V.Y. e COLLI, W. Cell surface antigens of Trypanosoma cruzi: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. Mol. Biochem. Parasitol., 6, 111, 1982.