

Este trabalho corresponde à redação final
da tese defendida pelo candidato Sra Maria
Helena Seabra Soares de Brito e aprovada
pela comissão julgadora.

13/7/88

Julia S.



MARIA HELENA SEABRA SOARES DE BRITTO

Evolução da Resposta Imune
Humoral e Caracterização de
Antígenos Envolvidos na
Infecção Experimental pelo T.
cruzi.

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

Orientadora:

Prof^a. Dra. Julia Keiko Sakurada

Campinas
1988

Ao meu pai e à minha mãe.
Aos meus avós (in Memoriam).
Aos meus irmãos.

"Navegar é preciso,
Viver não é preciso ...
... Viver não é necessário,
O que é necessário é criar."
(Fernando Pessoa)

Este trabalho foi realizado no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, e contou com o apoio financeiro das seguintes Instituições, abaixo relacionadas:

- Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Durante o desenvolvimento deste trabalho a autora recebeu bolsa de estudo da CAPES e do CNPq.

A autora e sua orientadora externam seus agradecimentos a estas Instituições.

AGRADECIMENTOS:

A Professora Dra. Julia Keiko Sakurada, pela orientação científica.

Aos Professores, Dr. Marcos Garcia Costa, Dra. Maria Cristina Roque Barreira, Dr. Othon de Carvalho Bastos e Dra. Tereza L. Kipnis, pela discussão do trabalho e valiosas sugestões.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Imunologia, em especial à D. Ana Gagliardi, Dr. Humberto de Araujo Rangel e Dr. Paulo Maria Ferreira de Araujo, pelos ensinamentos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Imunologia, em especial à Rosimary de Jesus Gomes Turri, Irandaia Ubirajara Garcia e Domingos da Silva Leite, pelo companheirismo. A este último também pela confecção dos gráficos.

Aos amigos José Augusto de Raeffray Barbosa e Luiz Augusto Correa Passos, funcionários do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas, pela presteza no fornecimento dos animais.

Aos amigos Dirce Lima Gabriel, Dorival Vitório da Cunha Junior, Ismália Menegon Doné e Manoel Bernardes da Silva, técnicos do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas, pelo auxílio recebido na execução deste trabalho.

A Dra. Luiza S. Gouvea, pela atenção e interesse.

Ao amigo Gilson Paulo Manfio, pela ajuda na correção e montagem final da tese.

Aos Professores Antonio Benedito de Oliveira e Moysés Sadigursky, pelo estímulo.

Aos amigos Edgard Zanolli e Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, pelos palpites para o enriquecimento deste trabalho.

As amigas Maria Silvia Viccari Gatti e Celli Aparecida de Almeida Sais, pelo apoio.

As famílias Capovvilla-Mucci, Guaraldo, Malagueño de Santana e Yano, pela amizade.

A Deus.

Meus agradecimentos.

ÍNDICE:

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	14
Animais	14
Parasitas	14
Infecção experimental e obtenção de plasmas anti- <u>T. cruzi</u>	15
Quantificação dos diferentes isotipos de imunoglobulinas nos plasmas dos camundongos normais e infectados com o <u>T. cruzi</u>	16
Isolamento de imunoglobulinas de camundongo	18
Imunoglobulina M	18
Imunoglobulinas G	18
Imunoglobulina IgG2b monoclonal	19
Detecção de anticorpos anti- <u>T. cruzi</u>	20
Identificação dos antígenos de <u>T. cruzi</u> envolvidos na resposta imune humoral de camundongos, CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10)	21
Obtenção do antígeno	22
Iodinação das proteínas de superfície	22
Imunoprecipitação	23
Análise dos imunoprecipitados	24
Imunoproteção passiva	25
RESULTADOS	26
Parasitemia e mortalidade	26
Quantificação dos diferentes isotipos de imunoglobulinas nos plasmas dos camundongos, CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10) normais e infectados pelo <u>T. cruzi</u> , durante a infecção experimental	27
Isotipo IgM	28
Isotipo IgG1	29
Isotipo IgG2a	29
Isotipo IgG2b	30

Perfil de alteração dos isotipos de imunoglobulinas, IgM, IgG1, IgG2a e IgG2b, nas linhagens de camundongo CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10) durante a infecção experimental pelo <u>T. cruzi</u>	39
Deteção de anticorpos anti- <u>T. cruzi</u> nos plasmas dos camundongos, CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10) durante a infecção experimental	44
Identificação de antígenos de <u>T. cruzi</u> envolvidos na resposta imune humoral de camundongos CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10) durante a infecção experimental	47
Atividade protetora dos plasmas de camundongos CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10) obtidos durante a infecção experimental pelo <u>T. cruzi</u>	52

DISCUSSÃO	54
-----------------	----

RESUMO E CONCLUSÕES	68
---------------------------	----

BIBLIOGRAFIA	70
--------------------	----

INTRODUÇÃO:

O Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi é o agente etiológico da Tripanosomíase Americana, ou Doença de Chagas em humanos (CHAGAS, 1909). É transmitida por insetos da família Reduviidae, nos quais cresce extracelularmente em duas formas distintas, primeiramente como formas epimastigotas, as quais se multiplicam no intestino dos insetos e, que ao saírem do trato digestivo diferenciam-se nas formas tripomastigotas metacíclicas, que são eliminadas nas fezes dos vetores hematófagos, enquanto estes se alimentam, que constituem a forma naturalmente infectante para os mamíferos. Uma vez no hospedeiro vertebrado, os parasitas penetram nas células, onde se replicam como formas amastigotas, que se diferenciam em formas tripomastigotas, as quais sendo liberadas na circulação são denominadas tripomastigotas sanguíneas, que voltam a se multiplicar quando penetram em outras células, ou então quando são removidas pelo vetor e vão sofrer mais um ciclo biológico. A infecção chagásica pode também ser transmitida por via congênita, transfusão sanguínea ou acidente de laboratório (KRETTLI, 1982).

Essa infecção é uma importante causa de morbidade e mortalidade nas Américas do Sul e Central. O curso dessa doença, entretanto, varia amplamente; em alguns casos a mortalidade ocorre após uma curta fase inicial; em outros casos a fase inicial é relativamente assintomática e seguida, anos mais tarde, por sintomas relacionados a danos no coração ou trato digestivo. Na primeira fase da infecção, dita aguda, sucede um período pré-patente de duração variável, quando a parasitemia e parasitismo dos órgãos se elevam gradualmente, com facilidade na detecção de tripomastigotas sanguícolas, entretanto, a intensidade e a duração do parasitismo é variável; com o decréscimo do número de parasitas, torna-se difícil a sua detecção por exames diretos e, quando estes parasitas atingem níveis indetectáveis caracteriza-se a fase crônica da infecção.

O curso da infecção chagásica é influenciado, entre outros, por fatores próprios do parasita. As variações genéticas sofridas pelas diversas cepas são verificadas aos níveis da morfologia, composição bioquímica, virulência, tropismo tissular e patogenicidade (BRENER & ANDRADE, 1979 e BRENER, 1980), bem como na composição antigênica (PERALTA et al., 1980 - ANDRADE et al., 1981 - ARAUJO & REMINGTON, 1981 - PLATA et al., 1984 - MORGADO et al., 1985 e ZWEERINK et al., 1985), na análise de zimodemas (FLINT et al., 1984 e MILES & CIBULSKIS, 1986) e esquizodemas (MOREL et al., 1980 e 1986); são vistas, inclusive, variações dentro de uma mesma cepa (POSTAN et al., 1983 e 1984). Além da diversidade de comportamento dos diversos estoques do *T. cruzi*, a infecção é ainda determinada por fatores ambientais e por fatores do hospedeiro mamífero, como: idade, sexo, temperatura corporal (GOBLE, 1970 e BRENER, 1980), estado nutricional (PEREIRA et al., 1983) e endócrino (CHAPMAN et al., 1975).

Para o estudo da infecção experimental muita ênfase tem sido dada na escolha de espécies de vertebrados ideais, como substituto para os humanos: cachorros (GOBLE, 1952), coelhos (TEIXEIRA et al., 1975), macacos (MILES et al., 1979), gambás e galinhas (BRENER & ANDRADE, 1979 e RUBIOLO, 1981) têm sido utilizados. Também camundongos, que vêm sendo amplamente usados em estudos com sentido de avaliar os parâmetros da resposta imune à infecção contra os antígenos expostos pelo T. cruzi e, têm ajudado a formar uma variedade de informações na tentativa da elucidação dos diversos enigmas da resposta do hospedeiro, como p. ex., a variação do seu padrão genético. Por isso, as linhagens isogênicas de camundongos surgiram como ferramentas excelentes para o estudo do controle genético na determinação da resposta imune, tanto celular, quanto humoral, contra o parasita. Na infecção chagásica experimental essas linhagens podem ser divididas em dois grupos, tomando-se por base a letalidade e o nível de parasitemia: uma linhagem suscetível apresenta níveis parasitêmicos elevados e não sobrevive à fase aguda; em contraste, uma linhagem resistente apresenta baixos níveis de parasitas circulantes no sangue periférico e a infecção progride de um estágio agudo para uma fase crônica de longa duração (CORSINI et al., 1980a).

As suscetibilidade de diferentes linhagens de camundongos podem ser significativamente influenciadas por genes tanto do H-2 quanto de qualquer outro locus (TRISCHMANN & BLOOM, 1982 - WRIGHTSMAN et al., 1982 e TRISCHMANN, 1983). Entretanto, os mecanismos específicos pelos quais um gene H-2, ou outros genes, controlam a resposta imune humoral, ou celular, afetando a replicação do parasita no hospedeiro, não estão elucidados. As diferentes suscetibilidades das linhagens isogênicas de camundongos não parecem depender de uma

resistência natural e, sim da capacidade de algumas dessas linhagens de induzirem uma resposta imune contra o parasita e seus antígenos.

Nesse intuito muitos mecanismos têm sido postulados e, entre eles o papel das células T na modulação da suscetibilidade: animais neonatos, timectomizados e posteriormente infectados apresentam parasitemia e mortalidade superiores aos controles não timectomizados (SCHMUNIS et al., 1981); o tratamento de animais infectados com soro anti-timócito faz aumentar o número de formas sanguíneas e tissulares do parasita, embora este fato não seja suficiente para a indução de novos episódios de fase aguda em camundongos convalescentes da infecção (ROBERSON et al., 1973); camundongos "nude" que receberam enxertos de timo de doadores singênicos foram resistentes à infecção, ao contrário dos seus controles que não receberam enxertos (KIERSZENBAUM & PIENKOWSKI, 1979); do mesmo modo, células T de camundongos imunes quando transferidas para camundongos singênicos B (animais timectomizados, irradiados e reconstituídos com células B) foram capazes de restaurar completamente a atividade de controle da infecção chagásica (CORSINI & STELINI Jr., 1981) e, pela habilidade de produção de linfocinas, que aumentam a destruição do parasita pelo macrófago (NOGUEIRA et al., 1980 e 1982); contudo, ainda não está esclarecido se essa proteção mediada pelos linfócitos T é devida à destruição direta dos parasitas por essas células, ou se a proteção é devida a uma resposta de anticorpo aumentada pelo papel da resposta imune celular T "helper" (KIERSZENBAUM, 1980 e SCOTT, 1981). Um estudo comparativo entre os níveis de anticorpos em camundongos infectados, que receberam células T imunes e camundongos controles, demonstrou que a resposta IgG específica no 10º dia após a infecção foi significativamente maior nos camundongos que receberam as células T imunes (TRISCHMANN, 1984);

neste estudo o autor sugere que os linfócitos T não teriam apenas função "helper", pois a imunização de camundongos suprimidos de células B, apesar de não resultar na produção de anticorpos contra o parasita, resultou num tempo de sobrevivência maior e num retardo no aparecimento da parasitemia. BURGESS et al., (1981) relata a presença de linfócitos T "helper" no camundongo resistente, C57BL/6, durante a infecção chagásica. Recentemente, NICKELL et al., (1987) obtiveram a partir do C57BL/6 um clone de células T, caracterizados como T"helper/inducer", especificamente ativado por antígenos do T. cruzi, com restrição Ia, funcionalmente ativo, tanto "in vitro", quanto "in vivo", com capacidade para proteger camundongos singênicos de um desafio letal com o parasita. A existência de uma reação da pele de Hipersensibilidade do tipo Tardio na Doença de Chagas é muito controversa e, a análise dessas discrepâncias torna-se muito difícil, em face da diversidade dos antígenos usados, tanto nas infecções humanas, quanto nas experimentais (BRENER, 1980), embora CORSINI et al., (1980b) relatem uma reação de hipersensibilidade desse tipo, contra DNFB, aumentada em camundongos C3H/HeJ infectados e altamente suscetíveis ao T. cruzi. Com relação à participação das células NK, JAMES et al., (1982) verificam que camundongos geneticamente deficientes destas células não foram protegidas contra a infecção pelo T. cruzi.

O papel dos macrófagos na infecção chagásica ainda está sob investigação, pois apesar de ser esta célula responsável por um dos braços efetores mais ativos do sistema imune, o parasita a elege como célula hospedeira. Sabe-se, porém, que os macrófagos quando ativados são capazes de destruir o parasita (BRENER, 1980) e que a sua ativação deve envolver a presença de fatores, como: linfocinas (NOGUEIRA et al.

, 1982), produtos bacterianos, como endotoxinas, em sinergismo com linfocinas (ALCINA & FRESNO, 1987) e Interferon Gama (PLATA, 1985). Ainda corroborando com a idéia da ativação dessas células por linfocinas estão os achados de NICKELL et al., (1987) de que clones de células T, isolados de camundongos resistentes à infecção pelo T. cruzi, são capazes de induzirem a morte intracelular do parasita pela ativação de células macrofágicas.

A presença de anticorpos no hospedeiro vertebrado foi assinalada quase simultaneamente à descoberta da doença, quando GUERREIRO & MACHADO (1913) utilizaram a Reação de Fixação de Complemento para o seu diagnóstico. Entretanto, as primeiras evidências da participação direta dos anticorpos circulantes na resistência adquirida contra o parasita foram originadas de ensaios de transferência passiva de soros de ratos normais, que sobreviveram à infecção aguda, para ratos normais, os quais quando desafiados com parasitas virulentos tiveram uma infecção atenuada (CULBERTSON & KOLODNY, 1938). Essa resistência, mediada por transfêrencia passiva de soro imune, permaneceu controversa por muito tempo, sendo confirmada por uns (KAGAN & NORMAN, 1961, 1962 e RYCKMAN, 1965) e negada por outros (HAUSCHKA et al., 1950 e VOLLER & SHAW, 1965). Mais tarde, KIERSZENBAUM & HOWARD (1976) observaram que os camundongos maus respondedores foram suscetíveis à infecção, enquanto que os bons respondedores não o foram. No entanto, a confirmação do papel do anticorpo na resistência do hospedeiro contra o T. cruzi foi obtida por KRETTLI & BRENER (1976) e HANSON (1977) com a utilização de soros de camundongos infectados, obtidos durante as fases aguda e crônica, quando apenas os soros da fase crônica foram capazes de conferir proteção contra a infecção com parasitas virulentos. Neste fenômeno

foi demonstrada a participação do isotipo IgG2 por TAKEHARA et al., (1981) e SCOTT & GOSS-SAMPSON (1984). Além do fenômeno da proteção passiva, tem sido demonstrado o efeito citotóxico, dependente de anticorpo e sem complemento, fenômeno conhecido por "ADCC" (OKABE et al., 1980 e LIMA MARTINS et al., 1985), via eosinófilos (KIERSZENBAUM et al., 1981), neutrófilos (MADEIRA et al., 1979), ou ambos (KIPNIS et al., 1981b); além da facilitação da fagocitose por anticorpos opsonizantes (KIPNIS et al., 1981a - SCOTT & SNARY, 1982 - LAGES-SILVA et al., 1983 e KIERSZENBAUM et al., 1985).

A lise das formas tripomastigotas do parasita pelo Complemento parece ocorrer apenas em presença de anticorpo ligado à sua superfície, tanto "in vitro", quanto "in vivo" (KRETTLI et al., 1979 e MARTINS et al., 1985). Essa lise mediada pelo Complemento, dependente de anticorpo (CoML) é feita através da via alternativa, já que os fragmentos imunes Fc de IgG foram inativos, enquanto que os fragmentos F(ab)' e F(ab)'₂, também imunes, foram ativos na promoção da lise (KIPNIS et al., 1985), sugerindo que os anticorpos modulam alguma atividade bioquímica de componentes da membrana do parasita, possivelmente envolvidos na ativação da cascata do Complemento (KIPNIS et al., 1987), do mesmo modo que o tratamento de formas tripomastigotas com Tripsina ativa pela mesma via o referido sistema (KIPNIS et al., 1981a).

Na elucidação da função dos anticorpos induzidos na Doença de Chagas, KRETTLI & BRENER (1982) estudando os soros obtidos de camundongos tratados com Nifurtimox, mediante a utilização de diferentes preparações antigênicas, tais como: formas tripomastigotas sanguíneas ou de cultura, preparações congeladas ou descongeladas, formas do parasita fixadas pelo Glutaraldeído, antígenos metabólicos,

ou ainda, glicoproteínas purificadas, demonstraram a presença de anticorpos com atividades funcionais distintas: os anticorpos dirigidos contra epítomos presentes apenas nas formas tripomastigotas vivas, induzidos por infecção ativa, chamados anticorpos protetores ou líticos (LA) e os anticorpos dirigidos contra epítomos dos parasitas não viáveis, induzidos por preparações antigênicas, ditos anticorpos da sorologia convencional (CSA). Este método de caracterização funcional do anticorpo, que relaciona a presença de anticorpos protetores à resistência ao T. cruzi, tem encontrado respaldo nas observações de que em soros tanto de humanos, quanto de camundongos, ambos de fase crônica, foi demonstrada a presença de anticorpos líticos, com a participação de IgG1 e IgG2 nos humanos e de IgG2 nos camundongos (ROMEIRO et al., 1984); nos camundongos, os outros isotipos reagiram com formas epimastigotas fixadas previamente pelo Formol em testes de Imunofluorescência Indireta, indicando que as diferenças entre o soro lítico e o não-lítico pode estar relacionado à especificidade pelo antígeno mais do que ao isotipo da imunoglobulina (SANCHEZ et al., 1982). Embora KRETTLI & BRENER (1982) afirmem que o anticorpo lítico pode ser induzido por componentes de superfície ou antígenos liberados apenas por formas tripomastigotas sanguíneas viáveis, YOSHIDA (1986) indica que antígenos de superfície tanto das formas sanguíneas, quanto das de cultura, podem induzir a produção de anticorpos líticos, que reagem apenas com proteínas de formas tripomastigotas viáveis. Por sua vez, SEGURA et al., (1986) relatam a presença de anticorpos líticos, capazes de promoverem proteção, que foram induzidos por uma fração antigênica isolada de formas epimastigotas do parasita. MARTINS et al., (1985) destacam a reação de anticorpos líticos com peptídeos com pesos moleculares aparentes de

70 e 160 kDa, acrescentando que os soros de camundongos deficientes de anticorpos líticos não reagem com o determinante de 160 kDa, sugerindo por isso que esse polipeptídeo está relacionado ao mecanismo de resistência ao parasita. A indução do anticorpo lítico parece estar na dependência do estoque do parasita utilizado, pois certos estoques apesar de induzirem infecções ativas no hospedeiro, não induzem a produção de anticorpos líticos (MULLER et al., 1986). Os anticorpos líticos também são responsabilizados por mecanismos que contribuem para a defesa do organismo, tais como: ADCC, CoML e Opsonização (LIMA-MARTINS et al., 1985 e BRENER, 1987). Entretanto, UMEKITA et al., (1988) relatam que a lise imune mediada pelo Complemento não é pré-requisito para a eliminação do parasita da circulação "in vivo", pois fragmentos F(ab)'₂ de imunoglobulinas, isolados a partir de soro imune, embora aptos para promoverem a lise de formas tripomastigotas, não foram capazes de induzir o "clearance" dos parasitas e sugerem que esse "clearance" imune seja mediado pela aderência dos parasitas opsonizados às células macrofágicas através da porção Fc dos anticorpos.

As formas epimastigotas de T. cruzi, não infectantes, não precisam da presença do anticorpo ligado à sua superfície para ativarem a via alternativa do Complemento (KRETTLI, 1983). O sítio acceptor para o terceiro componente desse sistema, C3, nas formas epimastigotas foi caracterizado por JOINER et al., (1985) e denominado de GP-72.

A importância dos anticorpos tem sido ainda mencionada na caracterização de receptores envolvidos nas interações com células do hospedeiro, como os receptores para a Fibronectina (OUAÏSSI et al., 1986) e para a Laminina (BRETANA et al., 1986). Nesse contexto estão

os relatos de ZINGALES et al., (1982a) e WIRTH & KIERSZENBAUM (1987), que falam da inibição da penetração das formas infectantes do parasita nas células do hospedeiro por anticorpos específicos, impedindo dessa maneira a realização do ciclo biológico do parasita e, conseqüentemente, a infecção. Estão também descritos receptores para lectinas (KATZIN & COLLI, 1983) e alguns marcadores de sub-gêneros, importantes para os estudos taxonômicos (PETRY et al., 1987).

Embora a função do anticorpo no mecanismo da resistência contra o parasita tenha sido reconhecida, a elucidação desse mecanismo encontra uma grande dificuldade, principalmente no fato de que as estruturas antigênicas, responsáveis pela indução dessas atividades, ainda não foram bem caracterizadas.

Os estudos de caracterização de antígenos do T. cruzi têm sido numerosos, embora diversificados, o que torna suas análises difíceis em fase de alguns resultados controversos. Já foi detectada a presença de antígenos do parasita que apresentam reações cruzadas com microorganismos de vida livre, como é o caso do fungo Dactylium dendroides (SCHNAIDMAN et al., 1986) e também com espécies sorologicamente relacionadas, tais como a L. brasiliensis (TANOWITZ et al., 1986). No estudo de antígenos capazes de induzirem proteção contra desafios com formas virulentas do parasita está a maior variedade de resultados; entretanto, a correlação entre esses peptídeos e a resistência à infecção é dificultada pela ausência de padrões empregados nos diferentes protocolos experimentais (Mc DANIEL et al., 1986); p. ex., são distintas as metodologias de preparo das frações antigênicas, como inativação pelo aquecimento ou mertiolato (YOSHIDA et al., 1984) ou por composto tipo 8 - methoxypsoralen (ANDREWS et al., 1985); a revelação destes peptídeos, que pode ser

feita tanto por anticorpos monoclonais (TEIXEIRA & YOSHIDA, 1986) quanto por anticorpos obtidos de soros policlonais (ARAUJO et al., 1984 - YOSHIDA, 1984 e GROGL & KUHN, 1985); a localização desses peptídeos, tratando-se antígenos de superfície ou de antígenos endógenos, provavelmente envolvidos no metabolismo do parasita (ZINGALES et al., 1982b); a ampla variedade de hospedeiros testados, os diferentes estoques do parasita e suas várias formas adquiridas durante o desenvolvimento de seu ciclo biológico (BRENER, 1980); a via de inoculação, número de inóculos, concentração das doses e intervalo entre essas (RITTER & ROWLAND, 1984); bem como a complexa composição antigênica do parasita (BRENER, 1987).

A análise de dados experimentais mostram a obtenção de soros anti-T. cruzi, induzidos por infecção ativa e por antígenos isolados do parasita, através de esquemas de hiperimunização; entretanto, alguns autores têm mostrado que é factível o estudo da resposta imune por meio de uma infecção ativa com uma dose não letal de parasitas, cujo resultado é compatível com os de experimentos de hiperimunização. Neste sentido, GAVINO (1985), estudando a cinética de produção de anticorpos anti-T. cruzi em animais resistentes da linhagem híbrida F1 (CBA/J x C57BL/10), observou a presença de anticorpos protetores a partir da quarta semana após a infecção e, CIAMPI (1985), com o mesmo modelo experimental, caracterizou anticorpos líticos a partir do 5º dia após a infecção, com pico máximo no 30º dia, quando ocorre um declínio, com manutenção do título até o 90º dia após a infecção; outro fato observado por este autor é que o título de anticorpos líticos permanece o mesmo desde a primeira dose do parasita, independente do período da reinfecção (42º ou 100º dias), ou seja, que a determinação do título de anticorpos é dada pela

primeira dose do antígeno. Este fato sugere que a hiperimunização pode levar a uma ampliação no reconhecimento dos antígenos do parasita na resposta imune, porém, a qualidade do anticorpo é definida logo na primeira dose, havendo uma limitação na especificidade com seleção de antígenos envolvidos no mecanismo de resistência do hospedeiro.

SCOTT & GOSS-SAMPSON (1984) estudando a cinética de evolução dos anticorpos anti-parasita em uma linhagem suscetível, nas fases aguda e crônica da infecção, mostram que na segunda fase da infecção ocorre um predomínio de IgG2. ARAUJO et al., (1984) utilizando esquema de imunização similar, acompanha a evolução de anticorpos anti-T. cruzi na linhagem resistente, C57BL/6 e detecta a presença dos isotipo IgM e IgG2, tanto na fase aguda, quanto na fase crônica da infecção. GROGL & KUHN (1985) utilizando camundongos resistentes e suscetíveis, infectados com a cepa Brasil, observaram que linhagem suscetível, C3H, em relação ao resistente, C57BL/6, produzia na fase aguda os níveis de anticorpos mais elevados; entretanto, na fase crônica o resultado era o oposto, além de haver o envolvimento de maior número de antígenos. Análises de anticorpos específicos anti-T. cruzi, realizadas com soros obtidos de 3 linhagens de camundongos com um estoque da cepa Y, revelaram que o padrão de Imunoprecipitação com o soro das tres linhagens frente às formas tripomastigotas não sofreu variação, enquanto que o padrão frente às formas epimastigotas foi distinto (ZWEERINK et al., 1985).

O presente trabalho tem por objetivo estudar através da utilização de um modelo de infecção com baixa dose de parasitas, a cinética de evolução de diferentes isotipos de imunoglobulinas em tres linhagens de camundongos, que diferem na suscetibilidade e resistência ao T. cruzi, determinando a especificidade desses anticorpos contra

antígenos de superfície de formas infectantes do parasita, bem como a atividade funcional desses anticorpos.

MATERIAL E MÉTODOS:

ANIMAIS:

Foram usados camundongos das linhagens: CBA/J, C57BL/10, F1(CBA/J x C57BL/10) e Swiss/55, machos e fêmeas, com 10 a 12 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP - São Paulo, Brasil).

PARASITAS:

O *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909) da capa Y (PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG, 1953), cedido gentilmente pelo Dr. Z. Brener da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG - Belo Horizonte, Brasil), foi mantido através de repiques semanais em camundongos CBA/J inoculados pela via intraperitoneal com 10^5 formas tripomastigotas, padronizadas segundo técnica descrita por BRENER (1962), ou em cultura de células VERO ou HeLa (TUCHYA et al, 1980) em meio RPMI - 1640 (Flow Laboratories, England), contendo 10% de Soro Fetal Bovino (Microbiológicas - Rio de Janeiro, Brasil), a 37 °C, em atmosfera

úmida com 5% de CO₂.

INFECÇÃO EXPERIMENTAL E OBTENÇÃO DE PLASMAS ANTI- T.cruzi :

Vários grupos de camundongos CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10) foram inoculados pela via intraperitoneal com 10² formas tripomastigotas, obtidas do repique semanal de camundongos CBA/J. A constatação da infecção foi feita 12 dias após a mesma, dia médio correspondente ao pico da parasitemia na infecção dessas linhagens com esse número de formas (CORSINI et al, 1980a). Em alguns experimentos tomou-se ao acaso 10 animais, sendo 5 machos e 5 fêmeas e determinou-se suas parasitemias individualmente do 8º ao 15º dia após a infecção. A mortalidade dos animais foi acompanhada no decorrer de cada experimento.

Na linhagem suscetível, CBA/J, a infecção foi realizada utilizando-se grandes lotes de animais para a obtenção de plasmas a partir do 21º dia após a infecção, devido à alta mortalidade desses animais quando infetados com essa cepa de parasita, conforme descrito por CORSINI et al (1980a).

Lotes de 10 animais imunes e 10 normais de cada uma das tres linhagens foram sangrados pelo plexo braquial nos dias 0,3,5,7,14,21,28,35 e 42 após a infecção. Os sangues, recolhidos individualmente em tubos contendo solução estéril de Citrato de Sódio a 3,8%, foram mantidos em banho de gelo e centrifugados a 433g por 15 minutos a 4 °C. Os plasmas obtidos foram reunidos em "pool", distribuídos em alíquotas de 1ml, liofilizados e armazenados a - 70 °C até o momento do uso.

QUANTIFICAÇÃO DOS DIFERENTES ISOTIPOS DE IMUNEGLOBULINAS NOS PLASMAS DOS CAMUNDONGOS NORMAIS E INFECTADOS COM O T.cruzi:

A determinação dos níveis séricos dos diferentes isotipos de imunoglobulinas nos plasmas nos animais infectados e normais foi realizada pelo método de Imunedifusão Radial, segundo MANCINI et al (1965).

As concentrações de IgM, IgG1, IgG2a e IgG2b foram determinadas com o auxílio de curvas-padrões, que foram construídas representando-se as concentrações dos antígenos na abcissa e os diâmetros dos halos na ordenada. Para a confecção dessas curvas foram usadas imunoglobulinas de camundongos, cujos métodos para isolamento estão descritos no próximo item, nas concentrações de 25 a 100ug/ml; bem como anti-soros monoespecíficos obtidos sob a responsabilidade da Dra. J. K. Sakurada e caracterizados com padrões de soros de coelhos anti-cadeias u ou y específicos (Litton Bionetics Inc. - Maryland, USA), nas diluições de 1:60, 1:30, 1:50 e 1:15, respectivamente: Co. anti-u ca. (Soro de coelho anti-cadeia u de IgM de camundongo), Co.

anti-y1 ca. (Soro de coelho anti-cadeia y1 de IgG1 de camundongo), Car. anti-y2a ca. (Soro de carneiro anti-cadeia y2a de IgG2a de camundongo) e Co. anti-y2b ca. (Soro de coelho anti-cadeia y2b de IgG2b de camundongo). Quantidades determinadas de soro normal de camundongo foram utilizadas como controles nos diferentes sistemas.

A técnica consistiu na incorporação das quantidades apropriadas dos anti-soros monoespecíficos em gel de Ágar a 1% em Salina Fosfatada 0,15M pH 8.0, contendo 0,08% de Azida Sódica, em placas de vidro medindo 9 x 11 ou 6 x 11cm em uma camada de 1,5mm de altura. Nessas placas foram feitos orifícios com capacidade para conterem 5ul das amostras de diferentes diluições dos plasmas imunes e normais. As placas foram incubadas por 48 a 72 horas, após o que foram lavadas, coradas por solução de Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad Laboratories - Califórnia, USA) a 0,5% e os diâmetros dos halos medidos.

Após a determinação da concentração das imunoglobulinas presentes nos plasmas imunes e normais, calculou-se a média com seus respectivos desvios-padrões das concentrações dessas imunoglobulinas, nos diferentes lotes de infecção dos animais e nas várias análises. A alteração da concentração dos diferentes isotipos de imunoglobulinas foi determinada através da relação:

$$\frac{Ig_{PI}}{Ig_{PN}}$$

(Concentração de imunoglobulinas presentes nos plasmas imunes/concentração de imunoglobulinas presentes nos plasmas normais).

ISOLAMENTO DE IMUNEGLOBULINAS DE CAMUNDONGO:

Imunoglobulina M:

A IgM foi obtida a partir de soro de mieloma, MOPC 104-E, induzido em camundongos Balb/c fêmeas de 8 semanas de idade. Alíquotas de 10ml de soro foram cromatografadas em coluna de Sephacryl S-300 (Sigma Chemical Co. - St. Louis, USA), medindo 2 x 10cm, em Salina Fosfatada 0,15M pH 8.0, com o fluxo de 5ml/hora. Após a eluição do material não fixado à resina, a IgM foi eluída com Salina Fosfatada contendo 0,25M de α -metil-D-glicose (Sigma Chemical Co.- St. Louis, USA).

Imunoglobulinas G:

As IgG1, IgG2a e IgG2b foram isoladas segundo as indicações fornecidas por EY et al (1978), através de cromatografias em Sepharose-Proteína A (Pharmacia Uppsala, Sweden). Alíquotas de 10ml de soro normal de camundongo, previamente ajustadas a pH 8.0 com Tampão Fosfato 0,1M no mesmo pH, contendo 0,08% de Azida Sódica, foram aplicadas à coluna de Sepharose-Proteína A (1 x 6cm), equilibrada previamente com o mesmo Tampão Fosfato com um fluxo de 3ml/hora. A eluição das proteínas fixadas foi realizada com Tampão Citrato de Sódio 0,1M pH 3.0 e os eluatos foram recolhidos em tubos contendo 0,75ml de tampão TRIS-HCl 1M pH 8.5.

Os eluatos, obtidos de várias cromatografias, foram reciclados nas mesmas condições inicialmente citadas, no entanto, as eluições das imunoglobulinas fixadas à coluna foram realizadas com

Tampões de Citrato 0,1M com pH 6.0, correspondente à eluição da IgG1; pH 5.0, 4.5 e 4.0, referentes à IgG2a e pH 3.5 e 3.0 à IgG2b. os eluatos foram recolhidos em tubos contendo Tampão TRIS-HCl 1M pH 8.5 em volumes suficientes para a neutralização dos respectivos eluatos.

Imunoglobulina IgG2b monoclonal:

Essa imunoglobulina foi obtida a partir dos sobrenadantes de culturas dos hibridomas 5C4B11 e 5C4B7, previamente caracterizados como IgG2b e cedidos pela Professora W.M.S.C. Tamashiro do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP. Alíquotas de 100ml dos sobrenadantes de cada uma das culturas foram submetidas à cromatografia em Sepharose-Proteína A, nas mesmas condições citadas acima, com exceção da eluição das proteínas fixadas que foi realizada com Tampão Glicina-HCl 0,2M pH 2.8.

Todas as frações provenientes das diferentes cromatografias foram dialisadas contra Salina Fosfatada 0,15M pH 7.2 e concentradas sob pressão de Nitrogênio pelo método da Ultrafiltração em membrana Diaflo PM/10 (AMICON). As concentrações proteicas foram determinadas no decorrer dos vários passos do isolamento dessas frações de imunoglobulinas, utilizando-se os métodos colorimétricos do Biureto (DITTEBRANDT, 1948), ou Lowry modificado por HARTREE (1972) e/ou, através da absorção espectrofotométrica a 280nm (WHITAKER & GRANUM, 1980); a escolha do método ficou na dependência das condições experimentais, utilizando-se a Soro Albumina Bovina (Fração V, Sigma Chemical Co. - St. Louis, USA) como padrão. As frações isoladas continham em proteínas: IgM, 1,0mg/ml; IgG1, 800ug/ml; IgG2a, 500ug/ml e IgG2b monoclonal, 500ug/ml.

A caracterização das frações isoladas foi feita tanto pelo método da Imunedifusão Dupla, segundo OUCHTERLONY (1958), onde utilizou-se placas de vidro medindo 2,5 x 7,0 cm, recobertas por 3ml de Ágar a 1% em Salina Fosfatada 0,15M pH 8.0, contendo 0,08% de Azida Sódica; quanto pelo método da Imunoeletroforese Simples, segundo GRABAR & BURTIN (1964), usando-se placas de vidro de 9 x 11cm, cobertas por 15ml de Ágar a 1% em Tampão Veronal-HCl 0,05M pH 8.6, aplicando-se um gradiente de potencial de 6 volts/cm por um período de 70 minutos. As imunoglobulinas isoladas foram consideradas preparações homogêneas apenas quando apresentavam um único sistema precipitante frente aos anti-soros pluriespecíficos: Car. anti-SNC (Soro de carneiro anti-soro normal de camundongo) e Car. anti-Ig ca. (Soro de carneiro anti-imunoglobulinas de camundongo). Posteriormente as frações isoladas foram caracterizadas com os anti-soros monoespecíficos.

DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-T. cruzi:

A determinação da especificidade dos anticorpos nos plasmas dos camundongos infectados com T. cruzi foi realizada pela técnica de Imunofluorescência Indireta, segundo o método descrito por CAMARGO (1966), contra as formas tripomastigotas e amastigotas, provenientes da cultura da células no 7º dia após a infecção.

Os parasitas, presentes nos sobrenadantes dessas culturas, foram lavados duas vezes em solução de Hanks por centrifugação a 1.732g por 20 minutos a 4 °C. O sedimento, contendo os parasitas, foi resuspenso em Salina Fosfatada 0,15M pH 7.2 contendo 2% de

Formaldeído, mantido à temperatura ambiente por 10 minutos e lavado duas vezes em Salina Fosfatada, conforme descrito acima. A suspensão final, contendo 3×10^6 parasitas/ml, foi utilizada para o preparo das lâminas.

Os plasmas dos camundongos, obtidos nos diferentes períodos após a infecção, foram analisados em diluições seriadas a partir de 1:5 na razão 2. Os plasmas dos animais normais foram analisados como controles. O conjugado, IgG car. FITC anti-Ig ca. (Fração IgG de soro de carneiro anti-imunoglobulinas de camundongo, marcada com Isotiocianato de Fluoresceína, obtido sob a responsabilidade da Dra. J.K. Sakurada), foi utilizado diluído a 1:10.

IDENTIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE T. cruzi ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE CAMUNDONGOS, CBA/J, C57BL/10 E F1 (CBA/J x C57BL/10):

A detecção dos antígenos de T. cruzi, reconhecidos pelos anticorpos das diferentes linhagens de camundongos em diversas etapas da evolução da infecção, foi feita pela técnica de Imunoprecipitação, descrita por ZINGALES et al (1982a). Essa técnica compreende várias etapas a seguir:

Obtenção do antígeno:

As formas tripomastigotas sanguíneas foram obtidas de camundongos: Swiss/55, suprimidos com 200mg/Kg de peso de Ciclofosfamida (Enduxan, Pravaz) e CBA/J, inoculados com 10^5 formas tripomastigotas e sangrados pelo plexo braquial no pico da parasitemia. O sangue total dos animais foi recolhido em Heparina e as formas flageladas separadas por gradiente de Hypaque a 5% em Solução de Hanks pH 7.2 e centrifugadas a 192g por 25 minutos a 4 °C. Nessas condições os parasitas distribuídos na interface foram recolhidos e lavados duas vezes em Solução de Hanks pH 7.2, por centrifugação a 1.732 por 20 minutos a 4 °C.

Iodinação das proteínas de superfície:

A iodinação das proteínas de membrana das formas tripomastigotas sanguíneas foi realizada segundo as indicações de FRAKER & SPECK (1978). Em tubos pré-cobertos com 20ug de Iodogen (1,3,4,6 tetracloro, 3a, 6a difenilglicouril - Sigma Chemical Co. - St. Louis, USA), foram adicionados $2 - 5 \times 10^7$ parasitas e 0,5ml de Solução de Hanks contendo 500uCi de NaI^{131} (Iodeto de Sódio - IPEN - São Paulo). Essa mistura foi incubada por 10 minutos a 4 °C, depois do que a viabilidade dos parasitas foi verificada. Após a marcação, foram lavados duas vezes em Solução de Hanks, por centrifugação a 1.732g por 20 minutos a 4 °C, lisados em Tampão contendo 1% (V/V) de N-P40 (Nonidet-P40 - Sigma Chemical Co. - St. Louis, USA), 10mM de TRIS-HCl pH, 1mM de TLCK (N-a-tosil-L-lisilclorometilcetona - Sigma Chemical Co. - St. Louis, USA) e 1mM de PMSF (Fenilmetilsulfonilfluoreto - Sigma

Chemical Co. - St. Louis, USA), reincubados por 10 minutos a 37 °C, segundo as indicações de ZINGALES et al (1982a). Os lisados foram centrifugados a 4.340g por 30 minutos a 4°C e, os sobrenadantes estocados a - 70 °C até o momento do uso.

Imunoprecipitação:

Realizada segundo a técnica descrita por ZINGALES et al (1982a). A 1ml dos lisados de antígenos de T. cruzi, marcados pelo Iodo Radioativo foram adicionados 100ul de Staphylococcus aureus de cepa Cowan I, mortos e fixados previamente pelo calor e Formol, segundo as indicações de KESSLER (1975), numa suspensão a 10% em Salina Fosfatada 0,15M pH 7.2, cedida pela Profa. M.S.V. Gatti do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP. Essa mistura foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, com agitação esporádica e centrifugada a 4.340g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante, pré-clareado, foi dividido em alíquotas de 100ul correspondentes a 5×10^7 parasitas, que foram misturados a volumes iguais dos plasmas de camundongos em análise e, incubados a 4 °C por 120 minutos, com agitação ocasional. Depois, adicionou-se 200ul da mesma suspensão de S. aureus e reincubou-se por 30 minutos a temperatura ambiente, com agitação esporádica. Os complexos constituídos de S. aureus, antígeno e anticorpo, foram lavados duas vezes em tampão 10mM TRIS-HCl pH 7.5; 0,3M NaCl e 1mM EDTA e uma vez em Tampão 10mM TRIS-HCl; 0,3M NaCl; 0,1% SDS (Dodecil Sulfato de Sódio - Sigma Chemical Co. - St. Louis, USA) e 0,05% de N-P40, por centrifugação a 4.340g por 30 minutos a 4 °C. Os imunoprecipitados foram resuspensores em 50ul de Tampão de Amostra, indicado por TAKACS

(1979), contendo. 1M TRIS-HCl pH 6.8; 2-ME (2-mercaptoetanol - Sigma Chemical Co. - St. Louis, USA), Glicerol, SDS e 0,1% de Azul de Bromofenol, incubados inicialmente a 37 °C por 20 minutos, posteriormente a 100 °C por 3 minutos e centrifugados a 4.340g por 30 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram analisados por Eletroforese em Gel de Poliacrilamina.

Análise dos Imunoprecipitados:

Alíquotas de 20ul dos sobrenadantes obtidos na etapa anterior foram analisadas por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida a 10%, contendo Acrilamida e Bis-Acrilamida (Canalco Inc. - Rockville, USA), Persulfato de Amônio (Bio-Rad Laboratories - Califórnia, USA), Temed (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) e SDS, segundo técnica descrita por LAEMLI (1970). As corridas foram a 100 Volts á temperatura ambiente, por 6 horas. Os imunoprecipitados foram analisados junto aos padrões de pesos moleculares na concentração de 2ug : Miosina (MIOS), 205 KDa (Sigma Chemical Co. - St. Louis, USA); Soro Albumina Bovina (BSA), 68 kDa; Cadeias pesadas (IgGH) e leves (IgGL) de IgG de camundongo, 50 e 21 kDa, respectivamente (obtidas de IgG2a monoclonal pela Profa. W.M.S.C. Tamashiro); Ovoalbumina (OVA) 43 kDa (Sigma Chemical Co. - St. Louis, USA) e Mioglobina, (MIO) 16kDa (obtida do Departamento de Bioquímica da UNICAMP). Os géis foram corados com Solução de Coomassie Brilliant Blue a 0,25%. As autoradiografias foram feitas com filme Sakura para Raios-X (Companhia Brasileira de Filmes Sakura - Rio de Janeiro), usando-se como intensificador o EKRAN. O tempo de exposição variou entre 1 a 3 ou 4 a 10 dias a - 70 °C. Os pesos moleculares das bandas das proteínas

iodomarcadas foram estimados usando-se como base as bandas das proteínas padrões nos géis corados pelo Coomassie Blue.

IMUNOPROTEÇÃO PASSIVA:

Grupos de 6 camundongos CBA/J, sendo 3 machos e 3 fêmeas, foram inoculados pelo plexo orbital com 0,25ml de plasmas de camundongos obtidos de diferentes fases de evolução da infecção pelo T. cruzi, CBA/J:0, 21 e 28 dias; C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10): 0,21,28 e 42 dias; grupos controles receberam plasmas dos animais normais. Obedecido o intervalo de 60 minutos, os animais foram desafiados com 10^5 formas tripomastigotas sanguíneas, obtidas a partir do repique semanal de camundongos CBA/J, inoculadas pela via intraperitoneal. As parasitemias foram individualmente verificadas do 6º ao 8º dia após o desafio e a mortalidade dos animais foi seguida até o 30º dia após a infecção.

RESULTADOS :

PARASITEMIA E MORTALIDADE:

Nos diversos lotes de infecção das três linhagens de camundongos, CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10) que foram analisados, os níveis de parasitas detectados no sangue periférico dos animais no pico da parasitemia foram semelhantes aos que se encontram descritos na literatura (CORSINI et al., 1980a), sendo para o CBA/J os valores obtidos entre 10 a 15×10^5 parasitas/ml e, para o C57BL/10 e o F1 (CBA/J x C57BL/10), entre 3 a 4×10^5 parasitas/ ml.

A mortalidade dos animais foi acompanhada até o 42º dia após a infecção nos vários lotes de animais infectados. Na linhagem suscetível, CBA/J, foi de 50 a 100%. Nas linhagens resistentes, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10) as mortalidades foram de 10% e 7%, respectivamente.

QUANTIFICAÇÃO DOS DIFERENTES ISOTIPOS DE IMUNEGLOBULINAS SÉRICAS NOS PLASMAS DE CAMUNDONGOS, CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10), NORMAIS E INFECTADOS PELO T. CRUZI, DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL:

A quantificação dos diferentes isotipos de imunoglobulinas: IgM, IgG1, IgG2a e IgG2b, nos plasmas das três linhagens de camundongos, normais e infectados, no decurso da infecção experimental, foi realizada através da técnica de Imunedifusão Radial.

A análise dos plasmas dos animais normais (controles) não mostrou variações significativas ao longo dos experimentos em qualquer uma das três linhagens, de modo que os resultados dos grupos controles, ou animais não infectados, representam a média da concentração dos diferentes isotipos de imunoglobulinas nos plasmas obtidos do dia 0 ao 42º depois da infecção.

Os resultados das concentrações dos diferentes isotipos de imunoglobulinas nos plasmas dos camundongos infectados, independente da linhagem e do período da infecção, refletem as médias, com seus respectivos desvios-padrões, encontradas após a análise de pelo menos três grupos de animais infectados em épocas diferentes, entre os quais foram observadas pequenas variações.

A avaliação do nível de alteração dos diferentes isotipos de imunoglobulinas nos plasmas dos animais infectados das três linhagens em estudo (aumento ou diminuição em comparação aos controles normais) foi determinada pelo cálculo da relação entre a concentração dessa imunoglobulina no plasma imune e a concentração dessa imunoglobulina no plasma normal, no mesmo dia da infecção (Ig PI/Ig PN). Os valores da relação (Ig PI/Ig PN) situados entre 0.9 e 1.2 foram incluídos na faixa considerada normal, uma vez que a variação do método é igual ao inferior a 20%.

Isotipo IgM:

O resultado da concentração de IgM nas três linhagens de camundongos, no decorrer da infecção experimental, está na TABELA 1, onde pode-se observar um aumento progressivo desse isotipo nas três linhagens até o 28º dia após a infecção; a partir de então a concentração de IgM na linhagem CBA/J começa a declinar, enquanto na linhagem C57BL/10 e na linhagem híbrida, F1, ocorre uma estabilização.

O grau de alteração em relação ao grupo controle, demonstrado na FIGURA 1, refere no pico máximo de concentração dessa imunoglobulina um aumento de 2.0 vezes em relação ao normal para a linhagem CBA/J, de 3.0 vezes para o F1 e de 5.0 vezes para o C57BL/10, o qual produziu cerca de 2.0 vezes mais IgM que o CBA/J.

Isotipo IgG1:

A determinação da concentração desse isotipo nas três linhagens de camundongo, no decurso da infecção experimental, descrita na TABELA II, indica que a linhagem CBA/J é a única que apresenta aumento significativo desse isotipo a partir do 28º dia após a infecção, com um aumento de 2.0 vezes na concentração em relação ao controle, enquanto o C57BL/10 e o F1 mantiveram os seus níveis próximos ao normal, conforme a FIGURA 2.

Isotipo IgG2a:

A concentração do isotipo IgG2a, referida na TABELA III, nas três linhagens de camundongos, indica um aumento progressivo nas primeiras semanas da infecção, sendo a concentração máxima obtida para as linhagens CBA/J e C57BL/10 no 35º dia após a infecção, embora o CBA/J não mantenha esse nível até o 42º dia, o C57BL/10 mantém-se constante, enquanto a linhagem híbrida, F1, atinge a concentração máxima mais precocemente que seus parentais, 21º dia, e a mantém também até o final das análises.

A FIGURA 3 apresenta o grau de variação em relação ao normal na produção de IgG2a, durante a infecção experimental, nas 3 linhagens, que foi de cerca de 2.5 vezes no CBA/J, 4.5 vezes no C57BL/10 e de 3.5 vezes no híbrido, F1. Com relação C57BL/10 e CBA/J de 1.8 vezes.

Isotipo IgG2b:

O resultado da quantificação de IgG2b está relatado na TABELA IV, onde se verifica a síntese máxima de produção desse isotipo nas linhagens CBA/J e C57BL/10 no 28º dia após a infecção. No C57BL/10 esse nível se mantém sem diferenças significativas e, no CBA/J, o nível cai um pouco, se mantendo assim até o final das análises. A linhagem híbrida, F1, apresenta seu pico de síntese máxima precocemente, aos 21 dias, e o mantém sem diferenças significativas até o 35º dia, no final das análises, 42º dia, o nível desta imunoglobulina atinge o normal. As três linhagens iniciam a produção deste isotipo no 14º dia após a infecção. Na FIGURA 4 observamos o grau de variação entre os plasmas dos camundongos infectados e normais, que foi para o CBA/J de cerca de 2.5 vezes, para o C57BL/10 de 4.0 vezes e para o F1 de 2.0 vezes, no período que correspondeu à máxima produção desse isotipo.

FIGURA 1:

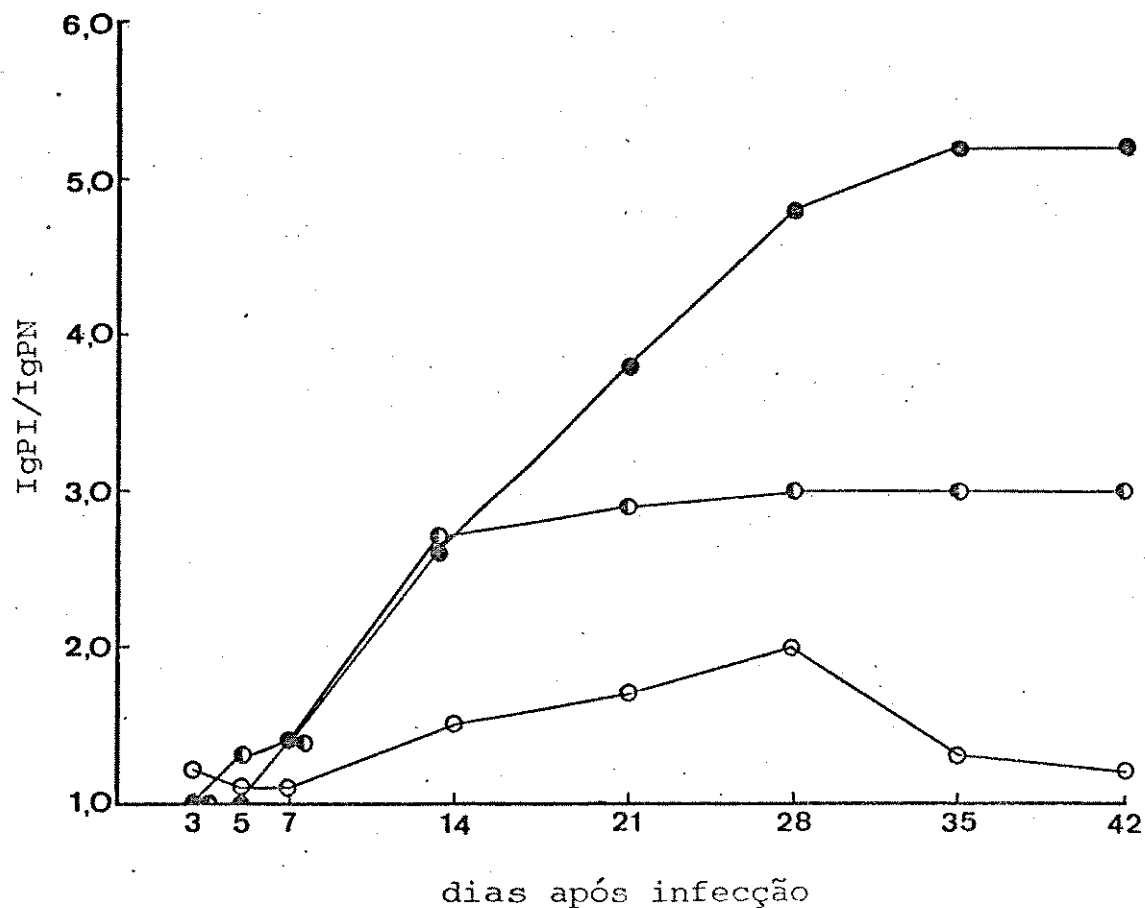


Fig. 1 - Relação entre a concentração de IgM presente nos plasmas dos camundongos infectados e normais (Ig PI/Ig PN) das linhagens, CBA/J (o), C57BL/10 (●) e F1 (CBA/J x C57BL/10) (◐), durante a infecção experimental pelo T. cruzi, determinada pela técnica de Imunedifusão Radial.

TABELA II: Concentrações proteicas de IgG1 nos plasmas dos camundongos: CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10), durante a infecção experimental pelo T. cruzi, determinadas pela técnica de Imunedifusão Radial.

Linhagens de camundongos				
Dias após	CBA/J	C57BL/10	F1	
infecção	prot.mg/ml	prot.mg/ml	prot.mg/ml	
Controles	3,3 ± 0,40	1,5 ± 0,42	1,10	
3	3,4 ± 0,12	1,5 ± 0,42	1,20	
5	---	---	-	
7	3,2 ± 0,40	1,3 ± 0,20	1,40	
14	3,4 ± 0,35	1,3 ± 0,10	1,10	
21	3,4 ± 0,29	1,4 ± 0,15	1,60	
28	6,9 ± 0,20	1,9 ± 0,20	1,00	
35	6,7 ± 0,20	2,0 ± 0,30	1,00	
42	6,7 ± 0,20	1,8 ± 0,30	1,00	

FIGURA 2:

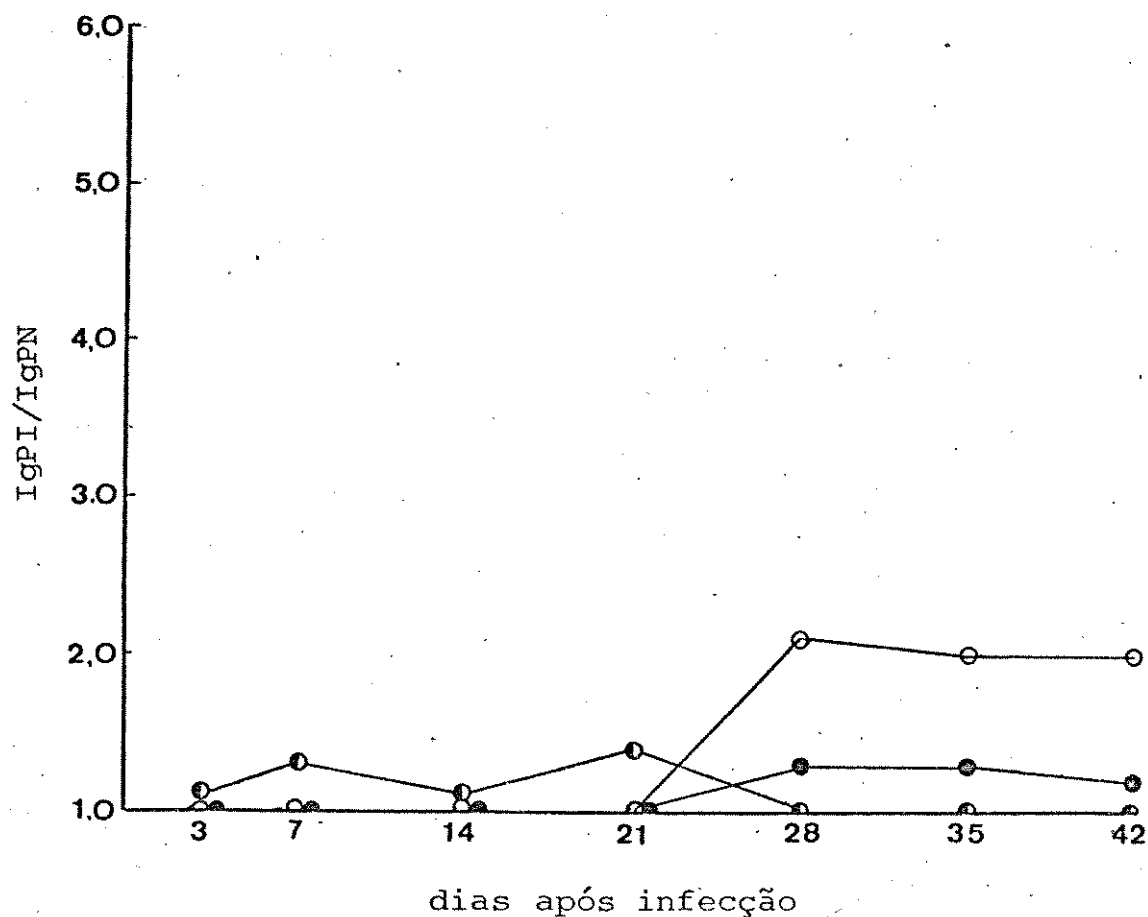


Fig. 2 - Relação entre a concentração de IgG1 presente nos plasmas dos camundongos infectados e normais (Ig PI/Ig PN) das linhagens CBA/J (○), C57BL/10 (●) e F1 (CBA/J x C57BL/10) (◐), durante a infecção experimental pelo T. cruzi, determinada pela técnica de Imunedifusão Radial.

TABELA III: Concentrações proteicas de IgG2a nos plasmas dos camundongos: CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10), durante a infecção experimental pelo T. cruzi, determinadas pela técnica de Imunodifusão Radial.

Linhagens de camundongos			
Dias após infecção	CBA/J prot.mg/ml	C57BL/10 prot.mg/ml	F1 prot.mg/ml
Controles	2,9 ± 0,05	2,4 ± 0,30	3,0 ± 0,29
3	2,9 ± 0,05	2,3 ± 0,10	3,0 ± 0,07
5	3,6 ± 0,85	2,9 ± 0,10	3,5 ± 0,30
7	3,2 ± 0,50	2,9 ± 0,50	4,1 ± 0,14
14	4,3 ± 0,46	4,0 ± 0,44	7,3 ± 1,00
21	5,9 ± 0,22	7,2 ± 0,68	10,3 ± 1,00
28	7,0 ± 0,60	10,0 ± 1,80	10,3 ± 1,00
35	7,5 ± 0,60	11,0 ± 0,78	10,3 ± 1,00
42	6,1 ± 0,60	11,0 ± 1,90	10,3 ± 1,00

FIGURA 3:

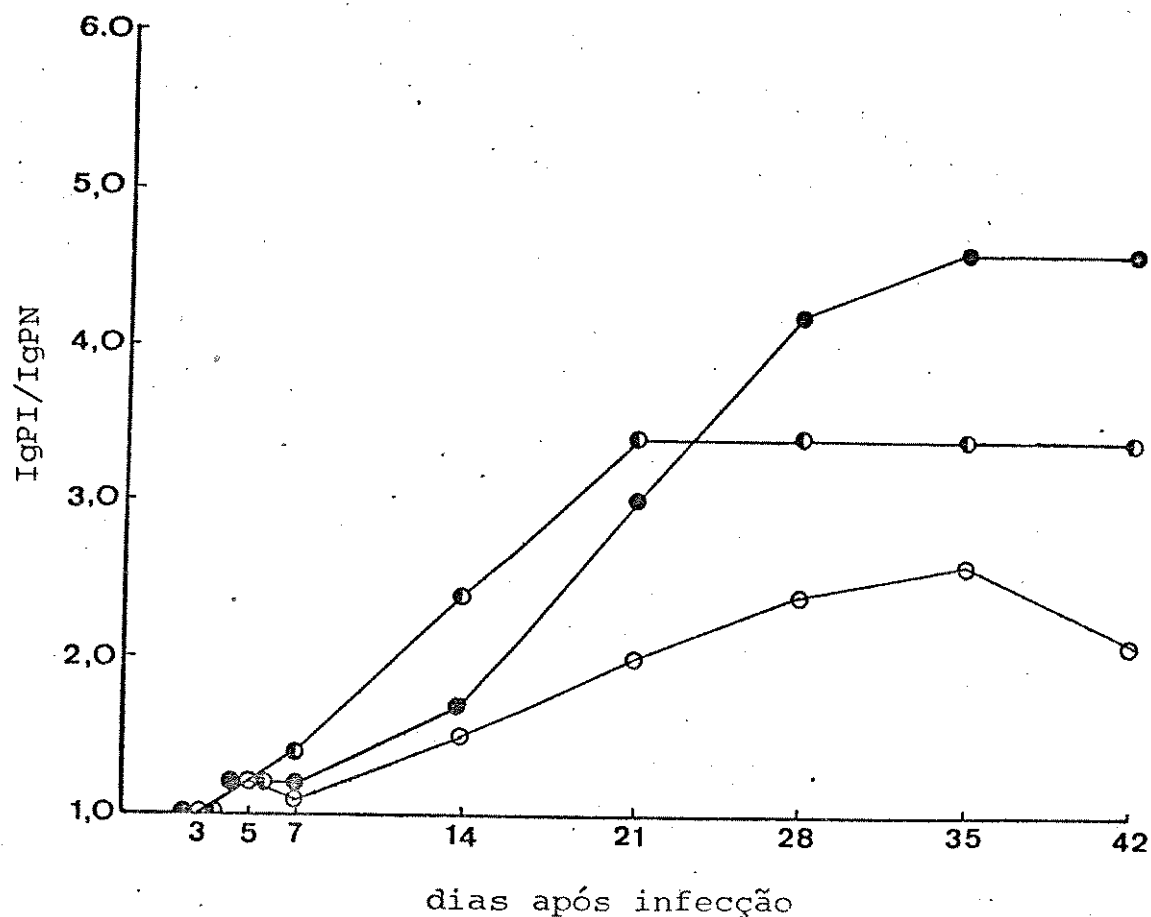


Fig. 3 - Relação entre a concentração de IgG2a presente nos plasmas dos camundongos infectados e normais (Ig PI/Ig PN) das linhagens, CBA/J (○), C57BL/10 (●) e F1 (CBA/J x C57BL/10) (○), durante a infecção experimental pelo T. cruzi, determinada pela técnica de Imunedifusão Radial.

TABELA IV: Concentrações proteicas de IgG2b nos plasmas dos camundongos: CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10), durante a infecção experimental pelo T. cruzi, determinadas pela técnica de Imunodifusão Radial.

Linhagens de camundongos			
Dias após infecção	CBA/J	C57BL/10	F1
	prot.mg/ml	prot.mg/ml	prot.mg/ml
Controles	1,4 ± 0,16	1,5 ± 0,20	2,3 ± 0,30
3	1,2 ± 0,06	1,2 ± 0,20	2,2 ± 0,20
5	1,2 ± 0,06	1,3 ± 0,02	2,9 ± 0,10
7	1,5 ± 0,32	1,5 ± 0,20	2,8 ± 0,50
14	2,0 ± 0,43	3,0 ± 0,60	3,3 ± 1,00
21	2,9 ± 0,50	5,4 ± 0,80	4,0 ± 1,20
28	3,7 ± 0,50	6,2 ± 0,70	3,6 ± 1,00
35	3,0 ± 0,50	6,0 ± 0,70	3,6 ± 1,00
42	3,0 ± 0,50	5,8 ± 0,70	2,3 ± 0,50

FIGURA 4 :

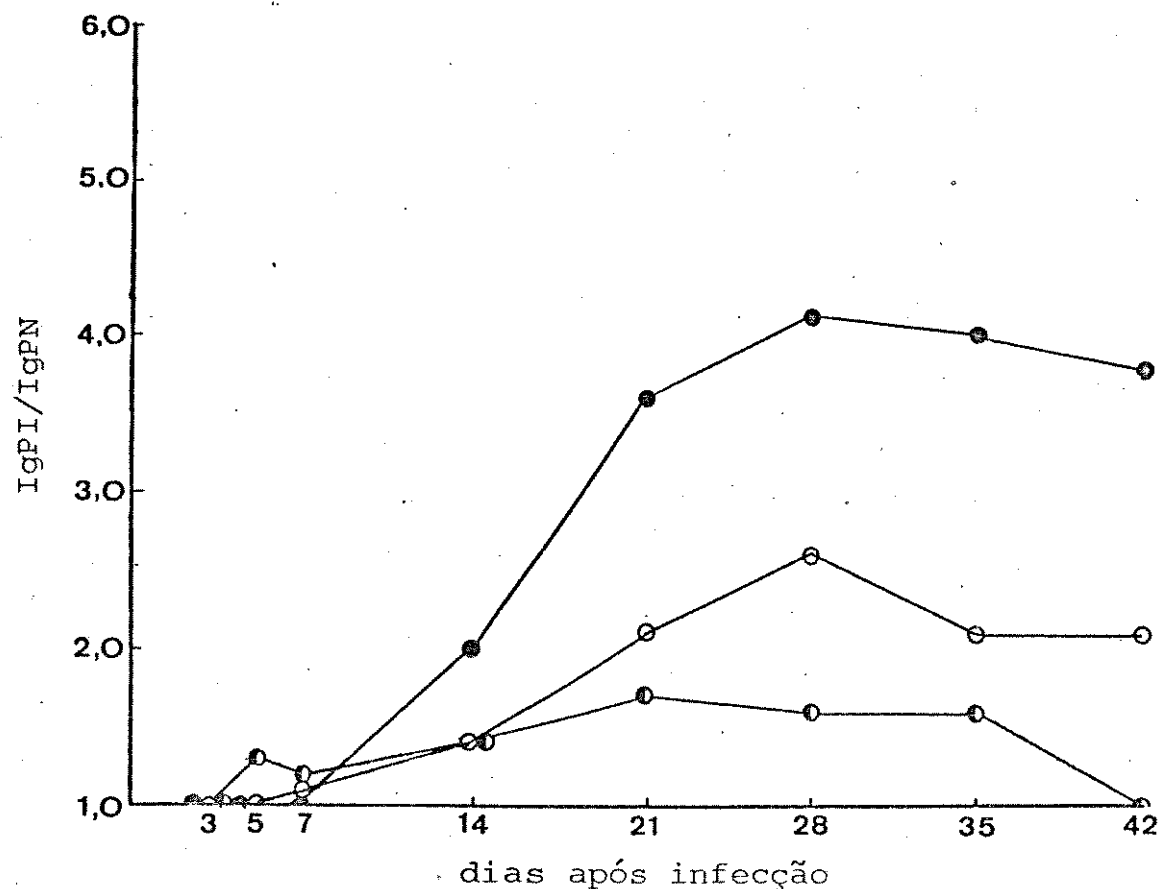


Fig. 4 - Relação entre a concentração de IgG2b presente nos plasmas dos camundongos infectados e normais (Ig PI/Ig PN) das linhagens, CBA/J (○), C57BL/10 (●) e F1(CBA/J x C57BL/10) (◐), durante a infecção experimental pelo T. cruzi, determinada pela técnica de Imunedifusão Radial.

PERFIL DE ALTERAÇÃO DOS ISOTIPOS DE IMUNEGLOBULINAS, IgM, IgG1, IgG2a e IgG2b, NAS LINHAGENS DE CAMUNDONGOS, CBA/J, C57BL/10 E F1 (CBA/J x C57BL/10), DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO T. cruzi:

A dosagem quantitativa dos isotipos de imunoglobulinas nas três linhagens de camundongos, mostrou algumas características que diferenciam o comportamento entre esses animais no decurso da infecção experimental.

A linhagem CBA/J mostra repostas aos estímulos antigênicos a partir do 14º dia da infecção, em níveis crescentes até o 28º dia, quando ocorre a estabilização na produção dos isotipos IgG. A FIGURA 5 mostra a participação de IgM, IgG2a e IgG2b nas três primeiras semanas depois da infecção e, no início das três últimas semanas analisadas, a participação é de todos os isotipos; entretanto, a partir do 35º dia a predominância é das IgG, com aumento de 2 a 3 vezes nas concentrações desses isotipos em relação aos controles.

A linhagem C57BL/10 inicia a sua resposta a partir do 14º dia pós-infecção. A estabilização da resposta aos estímulos antigênicos ocorre a partir do 35º dia. Os resultados da FIGURA 6 demonstram a participação dos isotipos: IgM, IgG2a e IgG2b, com a concentração aumentada de 4 a 5 vezes em relação aos animais controles.

A linhagem híbrida, F1, em relação aos seus parentais: CBA/J e C57BL/10, apresenta uma resposta intermediária aos estímulos antigênicos, com o estabelecimento da produção de anticorpos entre o 14º e o 21º dias depois da infecção, com um aumento na concentração dos isotipos IgM, IgG2a e IgG2b de 2,5, 3,5 e 1,5 vezes, respectivamente, em relação aos animais controles, conforme mostra a FIGURA 7. A partir do 21º dia até o final das nossas observações, 42º dia, inicia-se o declínio da IgG2b, existindo a predominância de IgM e IgG2a, nas mesmas concentrações apresentadas a partir da terceira semana após a infecção.

FIGURA 5:

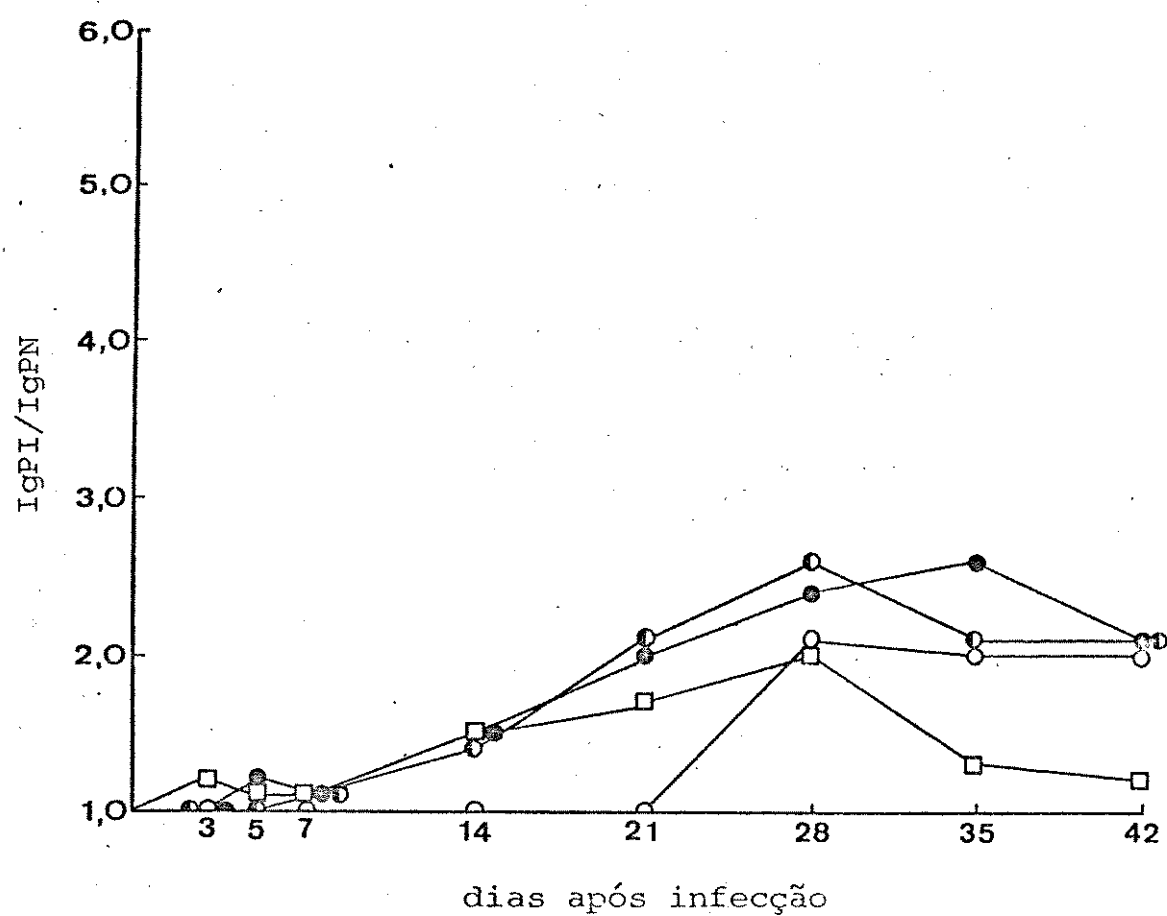


Fig. 5 - Perfil de alteração dos diferentes isotipos de imunoglobulinas: IgM (□), IgG1 (○), IgG2a (●) e IgG2b (●), na linhagem CBA/J durante a infecção experimental pelo T. cruzi, determinado pela relação (Ig PI/Ig PN). através da técnica de Imunedifusão Radial.

FIGURA 6:

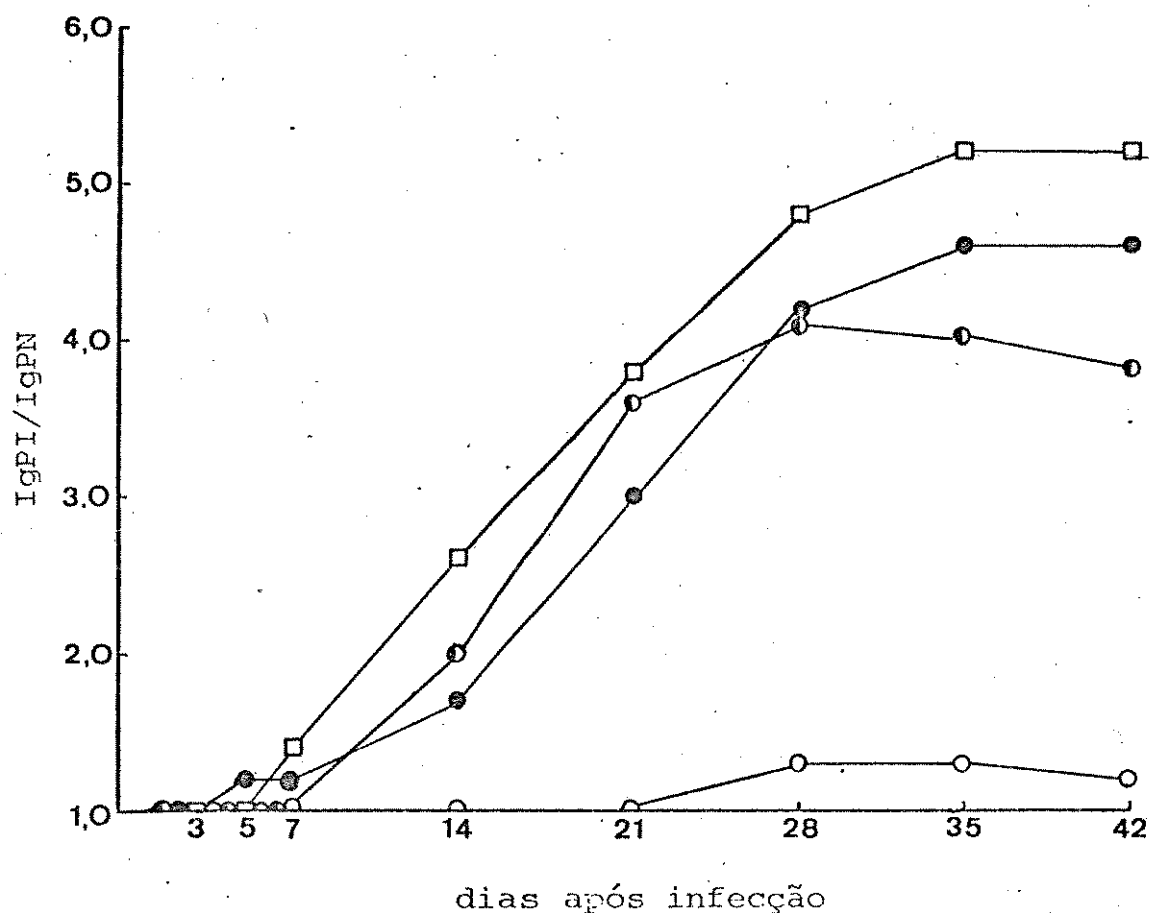


Fig. 6 - Perfil de alteração dos diferentes isotipos de imunoglobulinas: IgM (□), IgG1 (○), IgG2a (●) e IgG2b (◐), na linhagem C57BL/10 durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*, determinado pela relação (Ig PI/Ig PN), através da técnica de Imunedifusão Radial.

FIGURA 7:

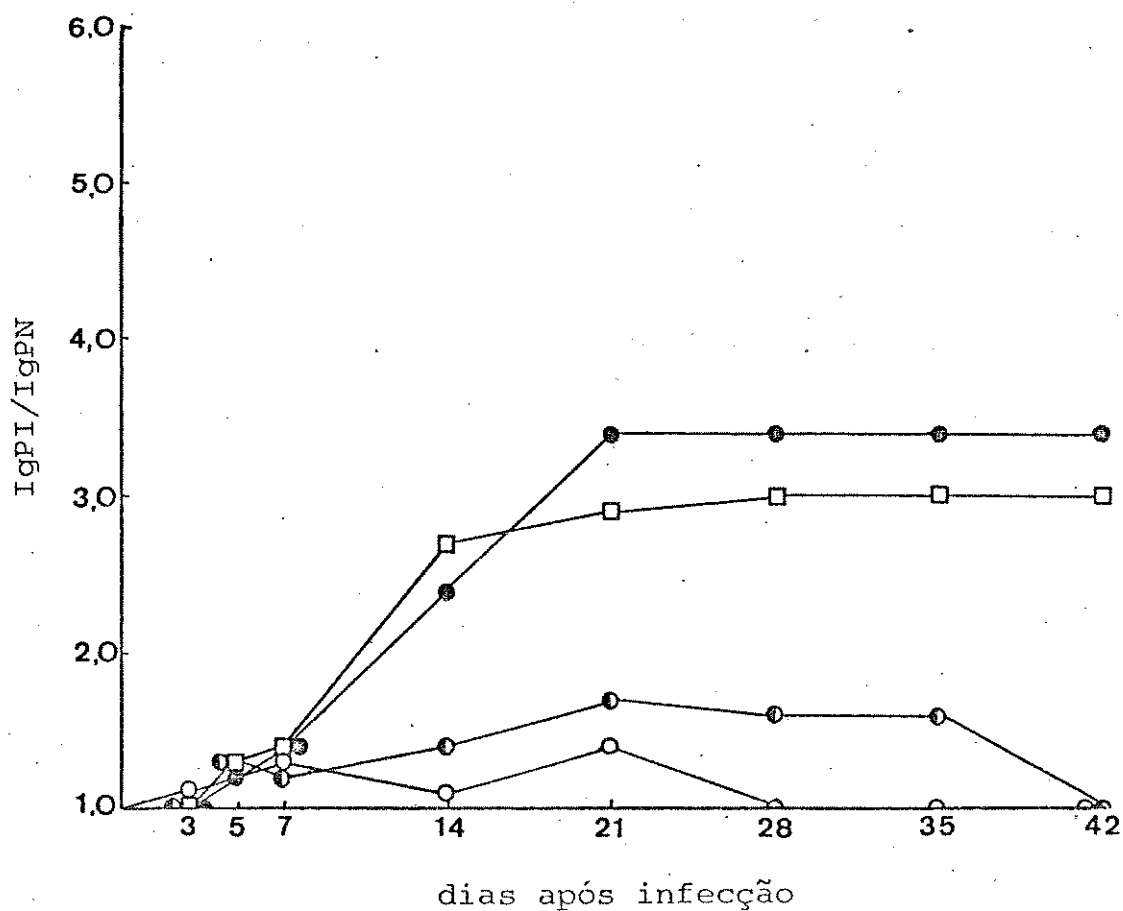


Fig. 7 - Perfil de alteração dos diferentes isotipos de imunoglobulinas : IgM (□), IgG1 (○), IgG2a (●) e IgG2b (●), na linhagem F1 (CBA/J x C57BL/10) durante a infecção experimental pelo T. cruzi, determinado pela relação (Ig PI/Ig PN), através da técnica de Imunedifusão Radial.

DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-T. cruzi NOS PLASMAS DOS CAMUNDONGOS, CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10), DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL:

Os níveis de anticorpos anti-T. cruzi nos plasmas dos camundongos, nos diferentes estágios da infecção experimental, foram determinados pelo método de Imunofluorescência Indireta, contra as formas tripomastigotas e amastigotas, tratadas pelo Formol e obtidas da cultura de células.

Os resultados apresentados na FIGURA 8 mostram anticorpos específicos contra as formas tripomastigotas do parasita. Entre o 7º e o 14º dias após a infecção não existe diferença entre os títulos de anticorpos específicos nas três linhagens de camundongos. No 14º dia começa a ocorrer uma variação nos títulos de anticorpos. Contudo, é a partir do 28º e até o 42º dia que se verifica uma maior distinção entre as linhagens de camundongos: o CBA/J apresenta títulos de anticorpos específicos 2 a 3 vezes inferiores aos dos C57BL/10 e F1.

Na FIGURA 9 são apresentados os títulos de anticorpos dirigidos contra as formas amastigotas de T. cruzi. O padrão de comportamento entre as três linhagens, nas duas primeiras semanas de infecção, não mostrou variação, tanto na cinética do aparecimento dos anticorpos, quanto nos títulos dos mesmos. No 21º dia após a infecção ocorre uma variação no padrão de resposta entre as linhagens de camundongos, o CBA/J apresenta títulos de anticorpos específicos inferiores aos apresentados pelo C57BL/10 e pelo F1. Deste período e até o final das análises não foram detectadas variações significativas.

FIGURA 8:

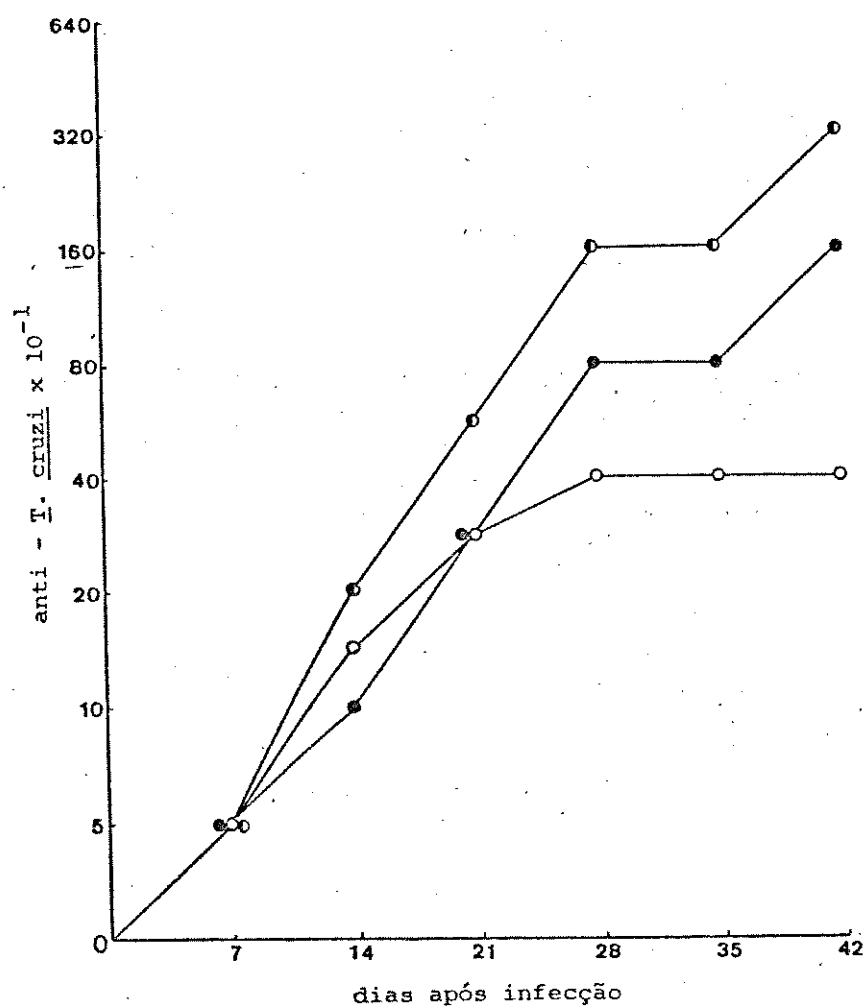


Fig. 8 - Títulos de anticorpos contra formas tripomastigotas nas linhagens de camundongos: CBA/J (○), C57BL/10 (●) e F1 (CBA/J $\times$ C57BL/10) (◐), durante a infecção experimental pelo T. cruzi, detectados por Imunofluorescência Indireta.

FIGURA 9:

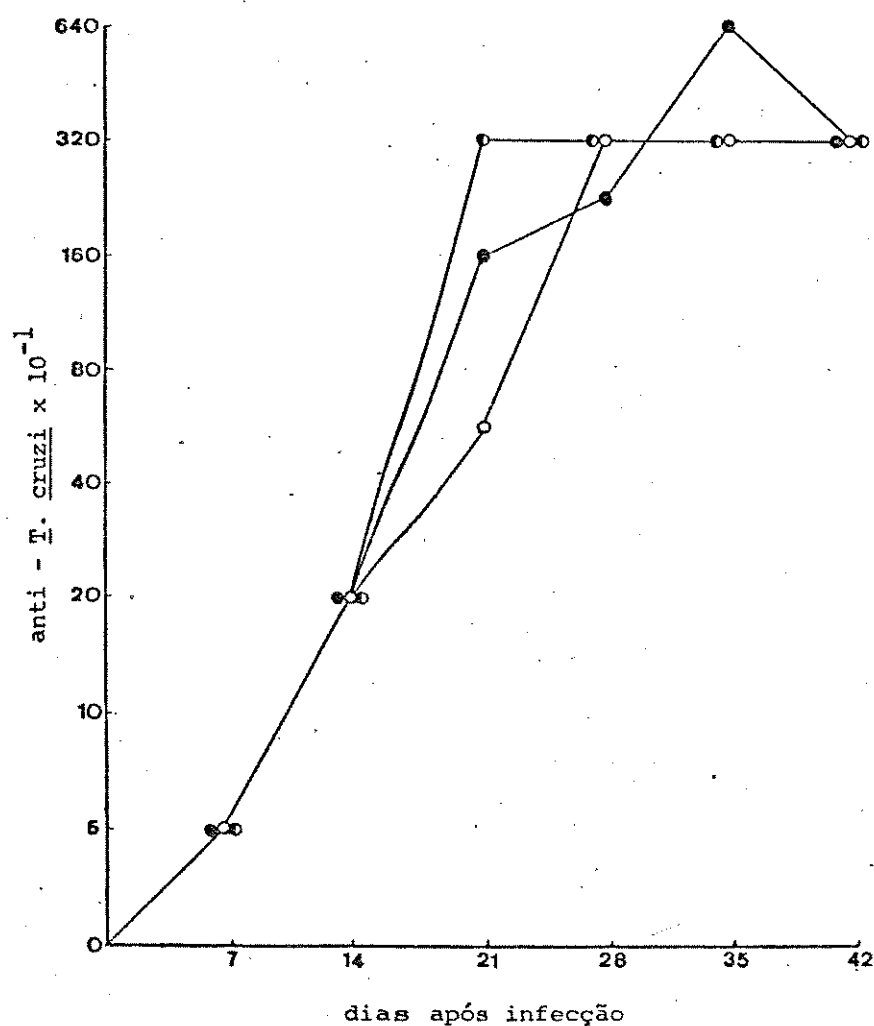


Fig. 9 - Títulos de anticorpos contra formas amastigotas nas linhagens de camundongos : CBA/J (○), C57BL/10 (●) e F1 (CBA/J x C57BL/10) (◐) durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*, detectados por Imunofluorescência Indireta.

IDENTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS DE T. cruzi ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE CAMUNDONGOS, CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10), DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL:

As análises dos antígenos de T. cruzi, envolvidos na indução da resposta imune humoral nas três linhagens de camundongos estudadas, foram feitas pelo método de Imunoprecipitação, onde formas tripomastigotas sanguícolas e viáveis foram marcadas com NaI¹³¹, solubilizadas e incubadas com as amostras dos plasmas dos camundongos. A revelação desses antígenos de superfície do parasita foi feita através da técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida a 10%, contendo SDS.

Na FIGURA 10 observa-se o padrão de precipitação de antígenos de T. cruzi por plasmas das linhagens de camundongos: CBA/J, C57BL/10 e F1, obtidos 14 dias depois da infecção, com início de reconhecimento de peptídeos nas regiões de pesos moleculares aparentes de 50 e 90 kDa, porém as bandas encontram-se marcadas com pouca intensidade.

A FIGURA 11 demonstra, embora de maneira difusa, peptídeos com pesos moleculares aparentes nas faixas de 50-56, 70-80 e 82-92 kDa, precipitados por plasmas das três linhagens de camundongos : CBA/J, C57BL/10 e F1, obtidos no 21º dia após a infecção.

O resultado das análises dos plasmas das linhagens de camundongos : CBA/J, C57BL/10 e F1, de 7, 28 e 42 dias após a infecção, está na FIGURA 12. Nas canaletas correspondentes às análises dos plasmas obtidos no 7º dia após a infecção, não foram detectadas bandas antigênicas; este foi também o padrão das análises dos plasmas normais, bem como dos plasmas obtidos 3 e 5 dias depois da infecção, independente da linhagem em estudo (dados não apresentados). Os plasmas de 28 e 42 dias depois da infecção, dos camundongos pertencentes à qualquer uma das três linhagens, detectaram peptídeos com pesos moleculares aparentes nas faixas de 50, 80, 90, 100, 140 e 160 kDa.

FIGURA 10:

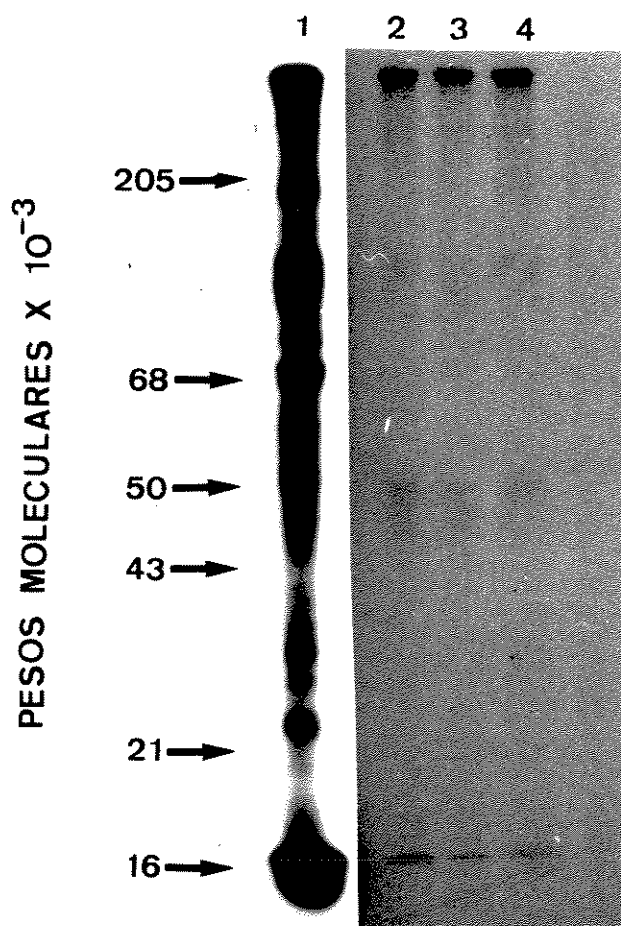


Fig. 10 - Imunoprecipitação de antígenos de superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi* marcadas com NaI¹³¹ (1), com plasmas obtidos no 14º dia após a infecção de camundongos, CBA/J (2), C57BL/10 (3) e F1 (CBA/J x C57BL/10) (4).

FIGURA 11:

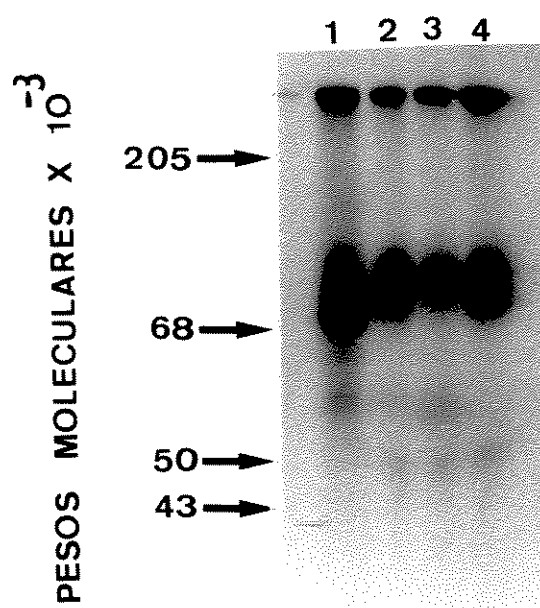


Fig. 11 - Imunoprecipitação de antígenos de superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi* marcadas com NaI¹³¹ (1), com plasmas obtidos no 21º dia após a infecção de camundongos, CBA/J (2), C57BL/10 (3) e F1 (CBA/J x C57BL/10) (4).

FIGURA 12:

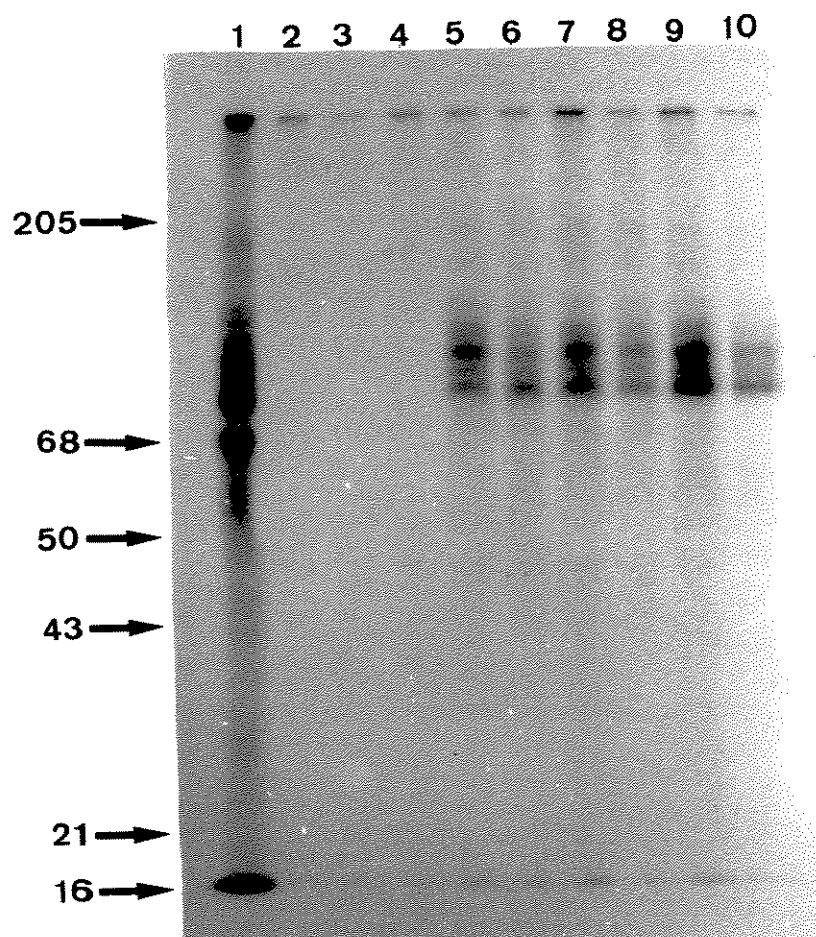


Fig. 12 - Imunoprecipitação de antígenos de superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi* marcadas com NaI^{131} (1), com plasmas obtidos nos 7^{os} (2, 3 e 4), 28^{os} (5, 6 e 7) e 42^{os} dias (8, 9 e 10) após a infecção de camundongos, CBA/J (2, 5 e 8), C57BL/10 (3, 6 e 9) e F1 (CBA/J x C57BL/10) (4, 7 e 10).

ATIVIDADE PROTETORA DOS PLASMAS DE CAMUNDONGOS, CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10), OBTIDOS DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO T. cruzi:

A atividade protetora dos anticorpos, produzidos pelas três linhagens de camundongos em estudo, foi verificada pelo método da Imunoproteção Passiva sobre camundongos suscetíveis da linhagem CBA/J.

Na TABELA V encontram-se apresentados os resultados das análises com os plasmas das três linhagens de camundongos, CBA/J, C57BL/10 e F1, obtidos em diferentes períodos após a infecção. Pode-se observar que não houve diferença significativa na capacidade de controlar a parasitemia, quando os plasmas utilizados foram das linhagens CBA/J e C57BL/10; entretanto, quando o plasma utilizado foi o da linhagem híbrida, F1, obteve-se tal controle. Quanto à capacidade de controlar a mortalidade, observou-se que os plasmas das linhagens resistentes, C57BL/10 e F1, obtidos a partir do 28º dia após a infecção, foram capazes de controlar parcialmente a morte dos animais suscetíveis, com menor ou maior eficiência, respectivamente.

TABELA V:

Atividade protetora dos plasmas de camundongos: CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10), obtidos durante a infecção experimental pelo T. cruzi, sobre camundongos CBA/J:

Plasmas obtidos em diferentes dias após a infecção								
Controle da infecção após desafio com 10^5 <u>T. cruzi</u>								
Parasitemia ($\log_{10}$)				% de sobrevivência				
7º dia				5	10	20	30	dias
CBA/J:								
controles	5.7	±	0,230	100	0	0	-	
21	6.1	±	0,120	100	0	0	-	
28	5.4	±	0,100	100	0	0	-	
C57BL/10:								
controles	5.9	±	0,230	100	0	-	-	
21	5.7	±	0,300	100	0	-	-	
28	5.3	±	0,300	100	33	0	-	
42	5.5	±	0,350	100	66	50	0	
F1:								
controles	6.0	±	0,370	100	0	-	-	
21	5.0	±	0,480	100	0	-	-	
28	5.1	±	0,400	100	66	50	33	
42	4.9	±	0,450	100	66	66	66	

DISCUSSÃO:

Na literatura existem numerosos relatos que pretendem elucidar o papel da resposta imune humoral na infecção causada pelo T. cruzi. Entretanto, esses dados são na sua maioria difíceis de serem analisados em face de esbarrarem em divergências básicas, referentes à diversidade de modelos experimentais empregados: macacos, coelhos, ratos e camundongos, por exemplo (TEIXEIRA et al., 1975 - CHIARI et al., 1980 e SCOTT et al., 1985); mesmo quando se trata apenas de camundongos a variedade é ampla, pois as linhagens isogênicas utilizadas apresentam comportamentos distintos em relação à suscetibilidade ao parasita (CORSINI et al., 1980a); ao estoque do parasita, são muitas as cepas do T. cruzi e suas morfologias, composições antigênicas e patogenicidades variam (BRENER & ANDRADE, 1979 - BRENER, 1980 e DVORAK, 1984); às diferentes fases de evolução da infecção que são analisadas (KRETTLI & BRENER, 1976 - HANSON, 1977 e McHARDY, 1977) e aos diversos parâmetros de comparação, envolvendo diferentes metodologias empregadas para as análises (GROGL & KUHN, 1985 e ZWEERINK et al., 1985); entre outras.

No entanto, os dados da literatura não relacionaram a indução da resposta imune humoral em linhagens de camundongos suscetíveis e resistentes, infectadas ao mesmo tempo com baixa dose de parasitas de uma cepa virulenta do T. cruzi, com níveis de imunoglobulinas, especificidade de anticorpo e proteção, durante as fases aguda e crônica da infecção chagásica experimental. Nossos resultados mostram variações na produção dos diferentes isotipos de imunoglobulinas entre os camundongos suscetíveis e resistentes, bem como o comportamento desses anticorpos anti-T. cruzi na detecção de antígenos de formas infectantes para os hospedeiros vertebrados.

Os resultados da parasitemia e da mortalidade nos vários lotes da infecção, não mostraram alterações significativas nos seus níveis em cada uma das três linhagens em estudo: CBA/J, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10) (CORSINI et al., 1980a).

As dosagens quantitativas dos isotipos de imunoglobulinas das linhagens em estudo mostram alterações características ao longo da infecção. Nenhuma alteração nos isotipos foram observadas nos 7 primeiros dias após a infecção, correspondente ao período pré-patente de parasitemia.

Nas linhagens resistentes, C57BL/10 e F1 (CBA/JxC57BL/10), o aumento de IgM foi concomitante com o período do pico da parasitemia, por volta do 12º dia após a infecção, e mortalidade. Por outro lado, a linhagem suscetível, CBA/J, com níveis de parasitemia e mortalidade superiores, apresenta nessa ocasião nível dessa imunoglobulina muito próximo ao dos animais normais.

Com relação às IgG2, observou-se que as três linhagens de camundongos iniciaram a produção desses isotipos durante o período que corresponde ao controle da parasitemia.

Nesta cinética de produção dos isotipos de imunoglobulinas verificou-se que na linhagem suscetível CBA/J o pico máximo de alteração foi por volta do 28º dia após a infecção, com aumento de IgG2a e IgG2b de 2,5 vezes em relação ao normal, permanecendo assim até o 42º dia. No C57BL/10 o pico máximo de alteração foi ao final da infecção, 35º dia, com participação de IgG2a e IgG2b com aumento de cerca de 4,0 vezes em relação ao normal, que foi mantido até o 42º dia. A linhagem F1(CBA/J x C57BL/10) atingiu a concentração máxima destes dois isotipos no 21º dia, entretando a alteração em relação ao normal foi de 3,5 vezes para o isotipo IgG2a e de 1,5 vezes para a IgG2b, além de manter constante até o final das análises somente a concentração de IgG2a.

A análise da especificidade dos plasmas dos camundongos obtidos durante a fase aguda da infecção, até o 14º dia, não mostra variações no grau de especificidade entre as formas amastigotas e tripomastigotas do parasita, independentes da linhagem em estudo. No 21º dia, os títulos de anticorpos específicos são inferiores na linhagem suscetível, CBA/J, independente da forma do parasita. A partir daí não são verificadas diferenças significativas entre o comportamento de qualquer uma das três linhagens de camundongos frente às formas amastigotas, o mesmo não acontecendo com relação às análises feitas contra formas tripomastigotas, onde mais uma vez a linhagem suscetível apresenta os mais baixos títulos.

A variação na especificidade entre as formas do parasita, por testes de Imunofluorescência Indireta, foi descrita por REPKA et al., (1985), em estudos realizados com as três formas de cultivo do parasita da cepa Y, com soros de camundongos infectados com a mesma cepa, onde foram verificados altos títulos de anticorpos específicos contra as formas amastigotas, baixos para as formas epimastigotas e intermediários para as formas tripomastigotas. Esse comportamento distinto pode ser explicado pela presença de antígenos estágio-específicos, caracterizados nas três formas do ciclo evolutivo do T. cruzi (NOGUEIRA et al., 1981 - YOSHIDA, 1983 e ZINGALES et al., 1984); e ainda, pela diversidade na resposta imune verificada por ZWEERINK et al., (1985) com base em que os polipeptídeos do parasita diferem nas propriedades antigênicas, conforme a linhagem de camundongos utilizada para a obtenção dos anti-soros.

Essa variação na especificidade ainda encontra apoio nas análises de SCOTT & GOSS - SAMPSON (1984), que verificaram no camundongo suscetível, a participação de anticorpos específicos, contra as formas epimastigotas do parasita, dos isotipos IgM e IgG2 e nos estudos cinéticos realizados por ARAUJO et al., (1984) na linhagem C57BL/6, resistente, que demonstraram a participação predominante de IgM, IgG2 e IgG3.

Durante a fase aguda da infecção, a concentração de IgM e IgG2a no animal suscetível, CBA/J, mostrou-se pouco alterada em relação ao controle normal; ao contrário, na linhagem híbrida resistente, F1, as concentrações dessas imunoglobulinas encontram-se aumentadas cerca de 2,5 vezes em relação aos controles; enquanto na linhagem parental resistente, C57BL/10, o aumento da IgM foi semelhante ao que ocorreu no híbrido e o da IgG2a foi próximo a 2,0

vezes, embora os títulos de anticorpos específicos contra o parasita nas três linhagens sejam semelhantes. Com base nesses dados podemos sugerir que, se com menor concentração desses isotipos de imunoglobulinas o animal suscetível, CBA/J, consegue um título de anticorpos específicos igual ao dos animais resistentes, que possuem maior concentração dessas imunoglobulinas, a linhagem CBA/J está na verdade produzindo nessa fase uma concentração de IgM e IgG2a específicos contra o T. cruzi maior do que o C57BL/10 e o F1. Em concordância estão os achados de GROGL & KUHN (1985), que no estudo da produção de anticorpos específicos contra o T. cruzi em linhagens suscetíveis e resistentes, verificaram que o C3H/He, suscetível, produz na fase aguda da infecção uma concentração de IgM e IgG2 epimastigota-específica, maior do que a linhagem resistente, C57BL/6. Também NICKELL et al., (1985), demonstram a presença de maior concentração de IgM e IgG tripomastigota-específica no camundongo suscetível. SAKURADA et al., (1987) a partir dos resultados de que a linhagem suscetível, CBA/J, quando comparada às linhagens resistentes C57BL/10 e F1, apesar de apresentar menor concentração dos isotipos de imunoglobulinas, IgM e IgG2a, apresenta o mesmo título de anticorpos específicos, sugerem que a diferença na suscetibilidade ou resistência entre as linhagens de camundongos não está na dependência da especificidade dos anticorpos produzidos.

A correlação entre o nível de anticorpos específicos anti-T. cruzi com suscetibilidade ou resistência foi recentemente sugerida por NICKELL & BOYER (1986), através da detecção dos níveis de IgM mais elevados na linhagem suscetível, sugerem que isto poderia estar contribuindo para a potencialização do curso da infecção, na promoção da patogenia; ou então, que as atividades dos anticorpos seriam

irrelevantes durante a infecção, com envolvimento de outros fatores do hospedeiro na determinação da suscetibilidade ou resistência.

TRISCHMANN (1983) sugere que o controle da parasitemia estaria na dependência de um mecanismo específico, ou inespecífico, ativo "in vivo" na morte ou limitação do desenvolvimento do parasita antes da fase aguda e, que os anticorpos seriam importantes no final da fase aguda, a fim de promoverem a destruição dos parasitas. De fato, no período correspondente à transição entre as fases aguda e crônica da infecção, por volta do 21º dia, quando a detecção das formas circulantes por métodos diretos é impossível, significando uma diminuição no número de parasitas, verifica-se um aumento na concentração dos isotipos IgM e IgG2, bem como no título de anticorpos específicos contra as formas infectantes para os mamíferos nas três linhagens de camundongos em estudo; contudo, esse crescimento é maior nas linhagens resistentes, C57BL/10 e F1; parece que nessa ocasião ocorre ou já ocorreu uma definição da resposta ao estímulo antigênico, persistindo apenas a diferenciação dos isotipos em termos quantitativos e qualitativos. A alta concentração de imunoglobulinas coincidente com o alto nível de parasitemia e mortalidade nos animais resistentes, em nossos resultados estão em concordância com a sugestão de TRISCHMANN (1986) de que essas imunoglobulinas não controlam o crescimento do parasita. Apesar dos índices de imunoglobulinas elevados e dos baixos títulos de anticorpos específicos durante a fase aguda nas linhagens resistentes, C57BL/10 e F1, sugerimos que durante o intenso parasitismo possa estar havendo o consumo desses anticorpos; por outro lado, ao final da fase aguda, a parasitemia e a mortalidade baixas agiriam colaborando para o baixo título destes anticorpos. Uma explicação para essa discrepância seria a Ativação Policlonal de

células B, pela estimulação de linfócitos não-específicos (CORSINI & COSTA, 1981). Outros autores, entretanto, estudando mecanismos de resposta imune humoral contra o T. cruzi, por meio de células formadoras de placas (PFC) isotipo-específicas, indicam a existência da ativação policlonal B como resultado de uma resposta específica ao antígeno que permanece por longo período, devido ao estímulo antigênico persistente, com a participação de IgM e IgG (TARLETON & KUHN, 1983), ou com predomínio de IgG2a e IgG2b (IMPÉRIO LIMA et al., 1985). No entanto, IMPÉRIO LIMA et al., (1986) sugerem que essa ativação policlonal seja um fenômeno geral na infecção de camundongos, pois não se verificam diferenças entre as linhagens suscetíveis e resistentes que sejam suficientes para explicarem esses padrões distintos de comportamento frente à infecção pelo T. cruzi.

Na elucidação dos mecanismos da resposta imune contra o T. cruzi são relatados fenômenos de Supressão no decorrer da infecção. De fato, parece que após um período de extensiva proliferação celular, o sistema entra num estado de exaustão, que caracterizaria uma depressão da resposta imune. Essa falta de resposta reflete-se tanto para antígenos relacionados ao parasita (ROWLAND & KUHN, 1978 e TARLETON & KUHN, 1985), quanto para antígenos não-relacionados (CUNNINGHAM & KUHN, 1980a) e, embora camundongos infectados com T. cruzi sejam incapazes de reagirem contra neoantígenos, esses animais são capazes de responder para antígenos contra os quais sofreram estimulações antes da infecção (CUNNINGHAM et al., 1980). Essas respostas de anticorpo, entretanto, podem ser restauradas pela adição de IL-2 exógena (REED et al., 1984 e TARLETON & KUHN, 1984a) e este fato parece estar relacionado com o desaparecimento da imunesupressão, via estimulação antigênica repetitiva, em intervalos que

corresponderiam ao aparecimento de células prontas a sofrerem estimulação (CHOROMANSKI & KUHN, 1986). Vários mecanismos têm sido propostos na tentativa de explicar essa imunossupressão, os mais comentados são a respeito de fatores séricos (CUNNINGHAM & KUHN, 1980b, 1980c e 1980d) e de células supressoras (REED et al., 1983 e TARLETON & KUHN, 1984b). Com respeito à células supressoras, macrófagos supressores foram encontrados em baços de camundongos da linhagem CBA/J, suscetível, infectados com T. cruzi (JENG & KERSZENBAUM, 1984) e, a fatores séricos, está relatada a presença de uma proteína com atividade supressora que é produzida por células esplênicas de camundongos sensíveis ou resistentes à infecção pelo T. cruzi, que é capaz de agir sobre células de camundongos normais, diferente de qualquer linhagem daquela de onde foi induzida, que é mais potente quando é produzida por camundongos suscetíveis, cujas células esplênicas também são mais sensíveis à sua ação (SERRANO & O'DALY, 1987). Os relatos de TARLETON & SCOTT (1987) da existência de células T supressoras não específicas ao T. cruzi, regulando respostas parasita-específicas e, de CHOROMANSKI & KUHN (1986) de que níveis de anticorpos essencialmente elevados podem ser supressores, contribuem para tentar explicar os nossos resultados de altos níveis de imunoglobulinas e baixos títulos de anticorpos específicos.

Os antígenos de superfície das formas tripomastigotas do T. cruzi, analisados através do método de Imunoprecipitação, revelados preferencialmente com o isotipo IgG, pelas condições experimentais onde os complexos antígeno-anticorpo são adsorvidos pela proteína A de S. aureus, começam a ser delineados a partir do 14º dia após a infecção, fase que corresponde ao aparecimento desse isotipo pela estimulação antigênica, apresentando um padrão difuso, envolvendo

peptídeos contidos dentre uma larga faixa de pesos moleculares aparentes de 50 e 90 kDa, sugerindo que esses antígenos estão expressando uma grande variedade de epítopos, ou ainda, que os anticorpos anti- T. cruzi possuem baixa afinidade. No 21º dia, o padrão de precipitação imune ainda abrange uma ampla faixa de epítopos que apresentam pesos moleculares muito próximos, verificados pelas largas faixas nas autoradiografias e sem muita delimitação entre essas; porém, nessa fase estão mais intensamente coradas e, de acordo com ARAÚJO et al., (1984) isto é sugestivo de natureza altamente antigênica. Nossa sugestão é de que quantidades maiores de antígenos estão sendo expostas em função do período de infecção, e também do aumento dos títulos dos anticorpos específicos. A partir do 28º e até o 42º dia a diferença notada em relação à análise anterior é a detecção de polipeptídeos com pesos moleculares aparentes iguais e superiores a 100 kDa. Entretanto, não houve diferença quando comparamos os padrões de precipitação com os plasmas de diferentes fases da infecção das três linhagens de camundongos estudadas. Uma curiosidade foi observada em alguns padrões de precipitação, independente do período da infecção ou do plasma de qualquer uma das linhagens, quando verificou-se uma maior intensidade nas bandas, onde se pode sugerir em cada um dos casos que a linhagem correspondente possui nesse período determinado, um maior número de anticorpos dirigidos contra esses antígenos, ou ainda, uma maior afinidade desses anticorpos.

A ausência de alterações significativas nos padrões de precipitação imune dos plasmas obtidos, das três linhagens de camundongos, nas várias etapas de infecção estão de acordo com os achados de WONG et al., (1986) de que a qualidade da resposta imune

humoral anti- T. cruzi é precocemente estabelecida e que não varia num período de até doze meses.

Os estudos cinéticos de caracterização dos antígenos de T. cruzi em diferentes períodos de infecção, realizados por ZWEERINK et al., (1985), nas linhagens de camundongos: C3H/HeJ, NZB e Balb/c, através da técnica de Imunoprecipitação contra formas tripomastigotas, detectam peptídeos com pesos moleculares compreendidos entre as faixas de 52 e 85 kDa, a partir da terceira semana da infecção independente da linhagem de camundongos, confirmando nossos resultados; esses mesmos autores, entretanto, observam um padrão de imunoprecipitação variável em função do tempo de infecção, frente a antígenos de formas epimastigotas, além de variarem os padrões de detecção entre as linhagens de camundongos suscetíveis e resistentes. Esta última análise encontra apoio nos estudos cinéticos realizados por GROGL & KUHN (1985), através de técnica de "Immunoblotting", contra formas epimastigotas, onde foi observada uma variação no padrão de reconhecimento de antígenos entre as linhagens, suscetível, C3H(He) e C57BL/6, resistente e, além de caracterizarem antígenos com os soros de primeiros dias após a infecção, esses autores detectam antígenos do parasita com anticorpos obtidos de soros normais da linhagem resistente. De fato, a existência de "anticorpos naturais" na infecção pelo T. cruzi foi detectada, tendo sido inclusive observada uma atividade lítica nesses anticorpos (YOSHIDA & ARAGUTH, 1987) e uma explicação para este fato é que o parasita compartilha antígenos com microorganismos de vida livre, como certo fungo, Dactylium dendroides (SCHNAIDMAN et al., 1986).

As pesquisas de ARAUJO et al., (1984) no sentido de esclarecer a participação de diferentes classes de anticorpos na infecção chagásica, através de soros obtidos em camundongos C57BL/6 no 50º e 150º dias após a infecção, mostraram que tanto anticorpos IgM, quanto IgG reconhecem essencialmente os mesmos antígenos 90 e 45 kDa em formas epimastigotas, com variação no soro de 150º dia, que reconhece antígenos próximos a 31 kDa, enquanto o soro de 50º dia não o faz. O antígeno de 90 kDa é reconhecido nos três estágios de evolução do parasita (NOGUEIRA et al., 1981 e SNARY et al., 1981), caracterizada como uma glicoproteína (SNARY & HUDSON, 1979) e com capacidade protetora (SNARY, 1983).

Com os soros obtidos da fase crônica da infecção de camundongos CF1, inoculados com formas tripomastigotas irradiadas, ZWEERINK et al., (1984) detectaram através do método de "Immunoblotting", antígenos de 100 kDa e dois polipeptídeos com pesos moleculares aparentes superiores a 200 kDa e, por experimentos de transfêrencia sugerem que os peptídeos de 100 kDa podem estar correlacionados com a resistência à infecção.

MARTINS et al., (1985) na análise de soros que continham anticorpos líticos e não-líticos, de camundongos experimentalmente infectados e de pacientes chagásicos, detectam peptídeos com pesos moleculares aparentes de 70 e 160 kDa. O antígeno de 160 kDa foi detectado apenas por soros que continham anticorpos líticos, levando os autores a sugerirem ser esse um possível antígeno correlacionado com a resistência à infecção.

Com base nas informações de que a atividade protetora dos soros estaria restrita à fase crônica da infecção chagásica (HANSON, 1977 e BRENER, 1980), com restrição ao isotipo IgG2 (TAKEHARA et al.,

1981 e SCOTT & GOSS-SAMPSON, 1984), com atividade lítica (KRETTLI & BRENER, 1982 e ROMEIRO et al., 1984) e protetora do soro do híbrido F1 (CBA/J x C57BL/10) para o seu parental CBA/J a partir da quarta semana de infecção (GAVINO, 1985) e dos nossos resultados de que esse híbrido apresenta os níveis dos isotipos IgM e IgG2, preferencialmente envolvidos na resistência à infecção (ARAUJO et al., 1984 e SCOTT & GOSS-SAMPSON, 1984), intermediários em relação aos máximos obtidos pelo seu parental resistente, C57BL/10 e aos mínimos do seu parental sensível CBA/J, embora tendo os títulos mais elevados de anticorpos específicos anti-T. cruzi, procuramos analisar se os plasmas das três linhagens em estudo, obtidos a partir da terceira semana pós-infecção, quando os títulos do isotipo IgG2 são quantitativamente mais significativos, apresentavam a mesma qualidade em experimentos de Imunoproteção Passiva em camundongos suscetíveis. Foi demonstrada a presença de anticorpos diferentes nas linhagens resistentes, F1 e C57BL/10; no caso do C57BL/10, no período analisado, não se observou o controle da parasitemia; quando se tratou do plasma de F1 (CBA/J x C57BL/10), a parasitemia foi controlada; quanto à mortalidade, observou-se que o híbrido, F1, apresenta maiores concentrações do anticorpo que a controla precocemente. Nossos resultados mostram que não pode ser estabelecida uma relação direta entre o fenômeno da proteção parcial e o padrão de reconhecimento antigênico obtido nos ensaios de Imunoprecipitação quando analisamos os plasmas das três linhagens de camundongos. Comparando-se os níveis de anticorpos entre as linhagens resistentes, C57BL/10 e F1, verifica-se que não se pode estabelecer correlação entre a concentração de imunoglobulinas e a atividade protetora dos plasmas de F1 (CBA/J x C57BL/10), embora possa haver correlação direta entre os títulos de anticorpos específicos e a

capacidade protetora dos plasmas dessa linhagem. Quanto à restrição isotípica, verifica-se que, tanto no C57BL/10 como no F1 (CBA/J x C57BL/10), há a predominância quantitativa de IgM e IgG2. Esses dados sugerem que a qualidade dos anticorpos está restrita à especificidade pelo antígeno do parasita, que provavelmente não foi detectado pelos ensaios de Imunoprecipitação, pois apesar dessa técnica permitir a detecção de determinantes tanto sequenciais como conformacionais (CELADA, 1979), a extração dos polipeptídeos utiliza detergentes, aquecimento e agentes redutores, que poderiam prejudicar a afinidade de ligação, não sendo também ideal para a detecção de epítomos críticos, ou presentes em baixa concentração (WONG et al., 1986).

O conjunto de informações sobre o papel do anticorpo na elucidação dos mecanismos de resistência ao T. cruzi com a utilização de anticorpos monoclonais ou policlonais, tem mostrado a caracterização de alguns antígenos parasita-específicos (ARAUJO, 1982 e YOSHIDA, 1986) e antígenos não relacionados ao parasita, ou antígenos de reação cruzada (SCHNAIDMAN et al., 1986, PETRY et al., 1987). Com os anticorpos monoclonais obtidos por diferentes autores (SNARY et al., 1981 - FLINT et al., 1984 - ALVES et al., 1986 e TAMASHIRO et al., 1987) a grande dificuldade está na seleção de anticorpos específicos para as formas tripomastigotas e com atividades biológicas correlacionadas com os mecanismos de resistência ao T. cruzi. Além da seleção de anticorpos para as formas tripomastigotas, WRIGHTSMAN et al., (1986) sugerem a necessidade da obtenção de anticorpos cepa-específicos, uma vez que alguns anticorpos selecionados por esses autores interagem com antígenos presentes em outras cepas do parasita. Estes fatos por sua vez, sugerem a necessidade do conhecimento das estruturas do parasita, para facilitar

a compreensão da biologia do parasita e suas interações com o hospedeiro.

Nesse trabalho contamos com um parâmetro adicional nas análises dos resultados: uma linhagem híbrida do cruzamento de camundongos sensíveis e resistentes, facilitando a comparação do seu comportamento com qualquer de seus parentais, talvez promovendo interesse para a discussão de parâmetros genéticos envolvidos na determinação da resistência à infecção de Chagas experimental.

RESUMO E CONCLUSÕES:

No presente trabalho procuramos estudar a variação dos isotipos de imunoglobulinas, IgM, IgG1, IgG2a e IgG2b, a especificidade de anticorpos produzidos contra a cepa Y do T. cruzi, bem como a atividade funcional destes anticorpos durante a infecção experimental de camundongos CBA/J, sensível, C57BL/10 e F1 (CBA/J x C57BL/10), resistentes.

O conjunto de resultados obtidos nos permitiram concluir que:

1) A alteração isotípica ocorre após a primeira semana de infecção, 7º dia;

2) Cada linhagem de camundongos apresenta um período de síntese máxima com uma variação isotípica característica: a linhagem CBA/J no 28º dia, com a predominância de IgG1, IgG2a e IgG2b, apresentando alteração em relação ao normal de 2,0 a 3,0 vezes; a linhagem C57BL/10, no 35º dia, com alteração da relação normal de 4,0 a 5,0 vezes com a participação de IgM, IgG2a e IgG2b; e, o F1 no 21º dia, com IgM e IgG2a aumentadas de 2,0 a 3,0 vezes em relação aos controles normais;

3) A análise da especificidade dos anticorpos por Imunofluorescência não mostrou variação significativa na cinética de aparecimento e nem nos títulos de anticorpos anti-T. cruzi nos plasmas das três linhagens de camundongos até o 14º dia após infecção. A partir do 21º dia surgiram variações nos títulos entre as linhagens, que se estabeleceram a partir do 28º dia, com títulos inferiores na linhagem suscetível;

4) A análise da especificidade por Imunoprecipitação não mostrou variação no padrão de peptídeos reconhecidos pelos plasmas das três linhagens de camundongos. O reconhecimento destes peptídeos iniciou-se no 14º dia e estabilizou-se a partir do 28º dia após a infecção.

5) Testes de Imunoproteção Passiva demonstraram a presença de anticorpos protetores nos plasmas das linhagens de camundongos resistentes, C57BL/10 e F1 obtidos a partir do 28º dia após a infecção; embora as atividades destes anticorpos sejam distintas, já que os plasmas de C57BL/10 não foram capazes de controlar a parasitemia.

6) Nossos resultados sugerem que a resistência à infecção pode ser correlacionada com a produção de anticorpos específicos contra um pequeno número de determinantes e, que as linhagens resistentes, C57BL/10 e F1, produzem estes anticorpos precocemente e em níveis superiores aos da linhagem suscetível CBA/J.

BIBLIOGRAFIA:

- ALCINA, A. & FRESNO, M. Activation by synergism between endotoxin and lymphokines of the mouse macrophage cell line J774 against infection by Trypanosoma cruzi. Parasite Immunol. 9 (2): 175-86, 1987.
- ALVES, M.J.M. ; ABUIN, G.; KUWAJIMA, V.Y. & COLLI, W. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cell by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol., 21 : 75-82, 1986.
- ANDRADE, S.G. ; ANDRADE, V. ; ROCHA FILHO, F.D. & BARRAL NETO, M. Análise antigênica de diferentes cepas do T. cruzi. Rev.Inst.Med. Trop. São Paulo, 23 (6) : 245-50, 1981.
- ANDREWS, N. W.; ALVES, M.J.M. ; SCHUMACHER, R.I. & COLLI, W. Trypanosoma cruzi: Protection in mice immunized with 8-methoxypsoralen inactives trypomastigotes. Exp. Parasitol., 60 (3): 255-66, 1985.
- ARAUJO, F.G. & REMINGTON, J.S. Characterization os stages and strains of Trypanosoma cruzi by analysis of cell membranes components. J. Immunol., 127 (3): 855-9, 1981.
- ARAUJO, F.G. Detection of circulating antigens of Trypanosoma cruzi by enzyme immunoassay. Ann. Trop. Med. Parasitol., 76 (1): 25-36, 1982.
- ARAUJO, F.G.; HEILMAN, B. & TIGHE, L. Antigens of Trypanosoma cruzi detected by different classes and subclasses of antibodies. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 78 (5): 672-7, 1984.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo, 4 : 389-96, 1962.
- BRENER, Z. & ANDRADE, Z. Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Ed. Guanabara Kocgan, 1 Edição, Rio de Janeiro, 1979.

- BRENER, Z. Immunity to Trypanosoma cruzi. Adv. Parasitol., 18: 247-92, 1980.
- BRENER, Z. Pathogenesis and Immunopathology of chronic Chagas' disease Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Suppl.1, 82 : 205-13, 1987.
- BRETANA, A.; AVILA, J.L.; ARIAS-FLORES, M.; CONTRERAS, M & TAPIA, F. J. Trypanosoma cruzi and American Leishmania ssp: Immunocytochemical localization of a Laminin-like Protein in the plasma membrane. Exp. Parasitol., 61 (2) : 168-75, 1986.
- BURGESS, D.E. ; KUHN, R. E. & CARLSON, K. Induction of parasites specific T helper lymphocytes during Trypanosoma cruzi infections in mice. J. Immunol., 127 (5) : 2092-5, 1981.
- CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis: Technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi in a slide test. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 8 : 227-34, 1966.
- CELADA, F. Hierarchic immunogenicity of protein determinants, In: Systems and Theory in Immunology (Lecture notes in Biomathematics, 32) Heidelberg : Springer Verlag, pp. 28-37, 1979.
- CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana: Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schyzotrypanum cruzi n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida no homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1 : 159-218, 1909.
- CHAPMAN Jr., W.L.; HANSON, W.L. & WAITS, V.B. The influence of gonadectomy of host on parasitemia and mortality of mice infected with T. cruzi. J. Parasitol., 61: 213-6, 1975.
- CHIARI, E. ; TAFURI, W.L.; BAMBIRRA, E.A.; REZENDE. M.M.; RIBEIRO, T.O.; CASTRO, L.D.; SALGADO, J.A. & AMARAL DE PADUA, R.A. The rabbit as a laboratory animal for studies on Chagas' disease. Research note. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 22 (4): 207-8, 1980.
- CHOROMANSKI, L. & KUHN, R.E. Repeated antigenic stimulation overcomes immunosuppression in experimental Chagas' disease. Immunology, 59 (2): 289-94, 1986.
- CIAMPI, D.B. Correlação entre anticorpos líticos e anticorpos mediadores da reação de Imunofluorescência durante a infecção pelo Trypanosoma cruzi (CHAGAS, 1909) em camundongos isogênicos. Tese de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1985.
- CORSINI, A.C.; COSTA, M.G.; OLIVEIRA, O.L.P.; CAMARGO. I.J.B. & STELINI Jr., A. Susceptibility of inbred mice to Trypanosoma cruzi strain Y. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 22: 281-5, 1980a.
- CORSINI, A.C.; OLIVEIRA, O.L.P. & COSTA, M.G. Unimpaired Delayed Type Hypersensitivity reactions in mice infected with Trypanosoma cruzi strain Y. Z. Parasitenkd., 61: 179-85, 1980b.

- CORSINI, A.C. & COSTA, M.G. Immunosuppression in mice infected with Trypanosoma cruzi (CHAGAS, 1909). I. Evidences of polyclonal B cell activation in experimental infections mimicked by an extrat prepared from circulating trypomastigotes Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 23 (3) : 114-21, 1981.
- CORSINI, A.C. & STELINI Jr., A. Immune T cells control Trypanosoma cruzi infections. Experientia, 37, Birkhauser Verlag, (Basel Schweiz), 1981.
- CULBERTSON, J.T. & KOLODNY, M.H. Acquired immunity in rats against Trypanosoma cruzi. J. Parasitol., 24 : 83-90, 1938.
- CUNNINGHAM, D.S. ; BENAVIDES, G.R. & KUHN, R.E. Differences in the regulation of humoral responses between mice infected with Trypanosoma cruzi and mice administered T. cruzi - induced supressor substance. J. Immunol., 125 : 2317- ,1980.
- CUNNINGHAM, D.S. & KUHN, R.E. Trypanosoma cruzi - induced supression of the primary immune response in murine cell cultures to T Cell-dependent and independent antigens. J.Parasitol., 66: 16-27, 1980a.
- CUNNINGHAM, D.S. & KUHN, R.E. Trypanosoma cruzi - induced supressor substance. I. Cellular involvement and partial characterization. J. Immunol., 124: 2122-9, 1980b.
- CUNNINGHAM, D.S. & KUHN, R.E. Trypanosoma cruzi - induced supressor substance. II. Regulatory acvtivity. Immunogenetics, 10: 557-71, 1980c.
- CUNNINGHAM, D.S. & KUHN, R.E. Trypanosoma cruzi - induced supressor substance. III. Activation of supressor cells. J.Parasitol., 66: 881-7, 1980d.
- DITTEBRANDT, M. Application of the Weichselbaum Biuret reagent to the determination of spinal fluid protein. Amer.J.Clin. Pathol., 18: 439, 1948.
- DVORAK, J.A. The natural heterogeneity of Trypanosoma cruzi: Biological and medical implications. J. Cell Biochem., 24: 357-71, 1984.
- EY, P.L.; PROUSE, S.J. & JENKIN, C.R. Isolation of pure IgG1, IgG2a e IgG2b immunoglobulins from mouse serum using Protein A-Sepharose. Immunochemistry, 15: 429-36, 1978.
- FLINT, J.E. ; SCHECHTER, M. ; CHAPMAN, M.D. & MILES, M.A. Zymodeme and species specificities of monoclonal antibodies against Trypanosoma cruzi. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 78 (2): 193-202, 1984.
- FRAKER, F.J. & SPECK, J.C. Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloroamide 1,3,4,6 - tetrachloro - 3a, 6a - diphenyl - glycoluril. Biochem. Biophys. Res. Commun., 80: 849-57, 1978.

- GAVINO, V. A. Doença de Chagas: Atividade protetora dos soros de camundongos infectados com formas tripomastigotas sanguícolas ou de cultura de tecido. Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1985.
- GOBLE, F.C. Observations of experimental Chagas' disease in dogs. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1: 189- , 1952.
- GOBLE, F.C. South American Trypanosomiasis. In: JACKSON, G. J.; HERMAN, R. ; SINGER, J., eds. "Immunity to parasitic animals", New York, Appleton-Century-Crofts, pp. 597-689, 1970.
- GRABAR, P. & BURTIN, P. Imunoelktrophoretische analysis. Elsevier, Amsterdam, 1964.
- GROGL, M. & KUHN, R.E. Identification of antigens of Trypanosoma cruzi which induces antibodies during experimental Chagas' disease. J. Parasitol., 71 (2); 183-91, 1985.
- GUERREIRO, C. & MACHADO, A. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento de diagnóstico. Brasil Med., 23: 225-6, 1913.
- HANSON, W.L. Immune response and mechanisms of resistance in Trypanosoma cruzi. Pan American Health Organization Scientific Publication, 347: 22-34, 1977.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Biochem., 48: 422-7, 1972.
- HAUSCHKA, T.S.; GOODWIN, M.B. ; PALMQUIST, J. & BROWN, E. Immunological relationship between seven strains of Trypanosoma cruzi and its application in the diagnosis of Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30: 1-16, 1950.
- IMPÉRIO LIMA, M.R., JOSKOWICZ, M. ; COUTINHO, A. & KIPNIS, T. Very large and isotypically atypical plaque-forming cell responses in mice infected with Trypanosoma cruzi. Eur. J. Immunol., 15: 201-3, 1985.
- IMPÉRIO LIMA, M.R. ; EISEN, H.; MINÓPRIO, P. ; JOSKOWICZ, M. & COUTINHO, A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. J. Immunol., 137 (1): 353-6, 1986.
- JAMES, S.L.; KIPNIS, T.L. ; SHER, A. & HOFF, R. Enhanced resistance to acute infection with Trypanosoma cruzi in mice treated with an interferon inducer. Infect. Immun., 35 (2): 588-93, 1982.
- JENG, G.K.C. & KIERSZENBAUM, F. Alteration in producing immunoglobulins classes and sub-classes during experimental Trypanosoma cruzi infection. Infect. Immun., 43 (2): 768-70, 1984.

- JOINER, K.; HIENY, S. KIRCHOFF, L.V. & SHER, A. GP72, the 72 kilodalton glycoprotein, is the membrane acceptor site for C3 on Trypanosoma cruzi epimastigotes. J. Exp. Med., 16 (5): 1196-1212, 1985.
- KAGAN, I.Q. & NORMAN, L. Immunologic studies on T. cruzi. III. Duration of acquired immunity in mice initially infected with a North American strain of T. cruzi. J. Infect. Dis., 108: 213-7, 1961.
- KAGAN, I.Q. & NORMAN, L. Immunologic studies on T. cruzi. IV. Serial transfer of organisms from immune to non-immune mice. J. Parasitol., 38: 584-8, 1962.
- KATZIN, A.M. & COLLI, W. Lectin receptors in Trypanosoma cruzi: An N-acetyl-D-glucosamine containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. Biochem. Biophys. Acta, 727: 403- 11, 1983.
- 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: 1617-24, 1975.
- KIERSZENBAUM, F. & HOWARD, J.C. Mechanisms against experimental T. cruzi infections: The importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. J. Immunol., 116: 1208-11, 1976.
- KIERSZENBAUM, F. & PIENKOWSKI, M.M. Thymus-dependent control of host defense mechanisms against Trypanosoma cruzi infection, Infect. Immun., 24 (1): 117-20, 1979.
- KIERSZENBAUM, F. Protection of congenitally athymic mice against Trypanosoma cruzi infection by passive antibody transfer. J. Parasitol., 66 (4): 675-7, 1980.
- KIERSZENBAUM, F. ; ACKERMAN, S.J. & GLEICH, G.H. Destruction of bloodstream forms of Trypanosoma cruzi by eosinophil granule major basic protein. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30 (4): 775-9, 1981.
- KIERSZENBAUM, F.; LIMA, M.F. & 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: 409-13, 1985.
- KIPNIS, T.L.; DAVID, J.R.; ALPER, C.A.; SHER, A. & DIAS DA SILVA, W. Enzymatic treatment transforms trypomastigote of Trypanosoma cruzi into activators of the alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci., 78: 602-5, 1981a.

- KIPNIS, T.L.; JAMES, S.L.; SHER, A. & DAVID, J.R. Cell-mediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi. II. Antibody-dependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils or neutrophils. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30 (1): 47-53, 1981b.
- 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 (2): 217-26, 1985.
- KIPNIS, T.L. ; SUCUPIRA, M. & DIAS DA SILVA, W. Transformation of Trypanosoma cruzi trypomastigote bloodstream forms by immune IgM and its Fab fragment into activators of the alternative complement pathway. Braz. J. Med. Biol. Res., 20 (1): 105-14, 1987.
- KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections. J. Immunol., 116: 755-60, 1976.
- KRETTLI, A.U., CARRINGTON, P.W. & NUSSENZWEIG, R.S. Membrane-bound antibodies of bloodstream of Trypanosoma cruzi in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. Clin. Exp. Immunol., 3: 1-8, 1979.
- KRETTLI, A.U. Antibodies to Trypanosoma cruzi in experimental and human infections. Afr. Jr. Clin. Exp. Immunol., 3: 327-45, 1982.
- KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. Resistance against Trypanosoma cruzi associated to anti-living trypomastigote antibodies. J. Immunol., 128 : 2009-12, 1982.
- KRETTLI, A.U. Resposta imune humoral na Doença de Chagas. Interciência, 8 (6): 374-83, 1983.
- LAEMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the Head of bacteriophage T4, Nature, 227: 680-5, 1970.
- LAGES-SILVA, E. ; KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. Effect of protective and non-protective antibodies in the phagocytosis of Trypanosoma cruzi by mouse peritoneal macrophages. Resumos X Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambu, Brasil, 1.35, 1983.
- LIMA-MARTINS, M.V.C.; SANCHEZ, G.A.; KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity against Trypanosoma cruzi is only mediated by protective antibodies. Parasite Immunol., 7 (4): 367-76, 1985.
- MADEIRA, E.D.; DE ANDRADE A.F.B.; BUNN-MORENO, M.B. & BARCINSKY, M. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity of Trypanosoma cruzi. Characterization of the effector cell from normal human blood. Infect. Immun., 25 (1): 34-8, 1979.
- MANCINI, G. ; CARBONARA, A. O. & HEREMANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single Radial Immunodifusion. Immunochemistry, 2: 235- , 1965.

- MARTINS, M.S.; HUDSON, L.; KRETTLI, A.U.; CANÇADO, J.R. & BRENER, Z. Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to Trypanosoma cruzi infection. Clin. Exp. Immunol., 61 (2): 343-50, 1985.
- McDANIEL, J.P.; HOWARD R.J. & DVORAK, J.A. Identification and analysis of epimastigote surface and metabolic proteins in Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol., 19 (2): 183-94, 1986.
- McHARDY, N. Passive immunization of mice against T. cruzi infection using convalescent mouse serum. Tropenmed. Parasit., 28: 195-201, 1977.
- MILES, M.A.; MARSDEN, P.D.; PETTIT, L.E.; DRAIER, C.; WATSON, S.; SEAH, S.L.K.; HUTT M.S.R. & FOWLER, J.M. Trypanosoma cruzi in rhesus monkeys. III. Eletrocardiographic and histopathological findings. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 73: 528-32, 1979.
- MILES, M.A. & CIBULSKIS, R.E. The heterogeneity of Trypanosoma cruzi: Zymodeme characterization of Trypanosoma cruzi. Parasitol. Today, 2 (4): 94-7, 1986.
- MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E.P.; MATTEI, D.M.; ROMANHA, A.J. & SIMPSON, L. Strains and clones of Trypanosoma cruzi can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc. Natl. Acad. Sci., 77 (11): 6810-4, 1980.
- MOREL, C.M.; DEANE, M.P. & GONÇALVES, A.M. The heterogeneity of Trypanosoma cruzi: The complexity of Trypanosoma cruzi populations revealed by schizodeme analysis, Parasitol. Today, 2 (4): 97-101, 1986.
- MORGADO, M.G.; VAN HOEGAERDEN, M. & GALVÃO CASTRO, B. Antigenic analysis of Trypanosoma cruzi strains by crossed immunoelectrophoresis: demonstration and isolation of antigens particular to some strains. Z. Parasitenkd., 71 (2): 169-78, 1985.
- MULLER, L.A.; ANASCO, N. & GONZALES - CAPPA, S.M. Trypanosoma cruzi: Isolate dependence in the induction of lytic antibodies in the mouse and rabbit. Exp. Parasitol., 61: 284-93, 1986.
- NICKELL, S.P. ; HOFF, R. & BOYER, M.H. Susceptibility to acute T. cruzi infection in autoimmune strains of mice. Parasite Immunol., 7 (4): 377-86, 1985.
- NICKELL, S.P. & BOYER, M.H. Trypanosoma cruzi: Protective immunization of susceptible strains of mice prone to autoimmunity. Exp. Parasitol., 62 (3): 450-2, 1986.
- NICKELL, S.P.; GEBREMICHAEL, A.; HOFF, R. & BOYER, M.H. Isolation and functional characterization of murine T cell lines and clones specific for the protozoan parasite Trypanosoma cruzi. J. Immunol., 138 (3): 914-21, 1987.

- NOGUEIRA, N. ; CHAPLAN, S. & COHN, Z. Trypanosoma cruzi: Factors modifying ingestion and fate of blood forms trypomastigotes. J. Exp. Med., 152: 447-51, 1980.
- NOGUEIRA, N.; CHAPLAN, S. ; REESING, M.; TYDINGS, J.P. & COHN, Z. Trypanosoma cruzi: surface antigens of blood and culture forms. J. Exp. Med., 153: 629-39, 1981.
- NOGUEIRA, N.; CHAPLAN, S.; TYDINGS, J.P.; UNKELESS, J. & COHN, Z. T. cruzi: induction of microbial activity in human mononuclear phagocytes. J. Immunol., 128: 2142-6, 1982.
- OKABE, K.; KIPNIS, T.L.; GALICH, V.L.G. & DIAS DA SILVA, W. Cell-mediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi. I. Antibody Dependent Cell mediated Citotoxicity to trypomastigote bloodstream forms. Immunopathology, 16: 344-53, 1980.
- OUAISSI, M.A. ; CORNETTE, J. & CAPRON, A. Identification and isolation of Trypanosoma cruzi trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. Mol. Biochem. Parasitol., 19 (3): 201-11, 1986.
- OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progress. Allerg., 5: 78- , 1958.
- PERALTA, J.M.; FILARDI, L.; LOURES, M.A.L. & TORRES, S.T. Trypanosoma cruzi: antibodies in mice infected with different strains of T. cruzi. J. Parasitol., 66 (2): 342-4, 1980.
- PEREIRA DA SILVA, L.H. & NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo albino. Folia Clin. Biol., 20: 191-207, 1953.
- PEREIRA, M.G.; DOSEA, J.G. ; JOHNSON, N.E.; CASTRO, C.N. & MACEDO, V. Serum albumin and gammaglobulin in T. cruzi infections. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 77: 32-4, 1983.
- PETRY, K.; SCHOTTELIUS, J. & BALTZ, T. Characterization of 19,000 mol wt flagellum-specific protein of T. cruzi, T. dionisii and T. vespertilionis by a monoclonal antibody. Parasitol. Res., 73 (2): 180-1, 1987.
- PLATA, F.; GARCIA PONS, F. & EISEN, H. Antigenic polymorphism of Trypanosoma cruzi: clonal analysis of tripomastigote surface antigens. Eur. J. Immunol., 14 (5): 392-9, 1984.
- PLATA, F.; WIETZERBIN, J.; GARCIA PONS, G. ; FALCOFF, E. & EISEN, H. Synergistic protection by specific antibodies and Interferon against infection by Trypanosoma cruzi in vitro. Eur. J. Immunol., 14: 930- , 1985.
- POSTAN, M. ; DVORAK, J. & Mc DANIEL, J.P. Studies of Trypanosoma cruzi clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HEN mice with two clones isolated from a common source. Am. J. Trop. Med. Hyg., 32 (3): 497-506, 1983.

- POSTAN, M. ; Mc DANIEL, J.P. & DVORAK, J.A. Studies of Trypanosoma cruzi clones in inbred mice. II. Course of infection of C57BL/6 mice with single cell isolated stocks. Am J. Trop. Med. Hyg., 33 (2) : 236-8, 1984.
- REED, S.G. ; ROTERS, S.B. & GOLD, E.A. Spleen cell- mediated supression of IgG production to a non parasite antigen during chronic Trypanosoma cruzi infection in mice. J. Immunol., 131: 1978- , 1983.
- REED, S.G.; INVERSO, J.A. & ROTERS, S.B. Supressives antibody responses to sheep erythrocytes in mice with chronic Trypanosoma cruzi infections are restored with Interleukin-2. J.Immunol., 133 :3333, 1984.
- REPKA, D.; RANGEL, H.A. ; ATTA, A. M.; GAVINO, V. & PIEDRA BUENA, A.E. Experimental Chagas' disease in mice infeted with one LD₅₀ of parasites. Rev. Bras. Biol., 45: 309-16, 1985.
- RITTER, D.M. & ROWLAND, E.C. Corpus Christi strain-induced protection to Trypanosoma cruzi infection in C3H(He) mice : Effective dose, time, route and number of vaccinations. J.Parasitol., 70 (5) : 755 - 9, 1984.
- ROBERSON, E. L. ; HANSON, W.L. & CHAPMAN, W.L Trypanosoma cruzi : effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. Exp. Parasitol., 34 : 168-73, 1973.
- ROMEIRO, S.A. ; TAKEHARA, H. A. & MOTA, I. Isotype of lytic antibodies in serum of Chagas' disease patients. Clin.Exp.Immunol., 55 : 413, 1984.
- ROWLAND, E. C. & KUHN, R.E. Supression of cellular responses in mice during Trypanosoma cruzi infections. Infect. Immun., 20: 393-7, 1978.
- RUBIOLLO, E.R. Immunogenicity of Trypanosoma cruzi in different animal species. Acta Physiol. Latinoam., 31 : 199-206, 1981.
- RYCKMAN, R.E. Experimental control of Trypanosoma cruzi by immunological methods. J. Med. Entomol., 2 : 105-8, 1965.
- SAKURADA, J.K.; DE BRITTO, M.H. S.S. ; TAMASHIRO, W.*M. S. C. & RANGEL, H. A. Comparative study of antibody production in different strains of mice infected with T. cruzi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Suppl. I, 82 : 145, 1987.
- SANCHEZ, G.A. ; KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. Characterization of the immunoglobulin subclasses responsible for complement mediated lytic activity against Trypanosoma cruzi. Resumos IX Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu, Brasil, p. 77, 1982.

- SCHMUNIS, G.A. ; GONZALEZ-CAPPA, S. M. ; TRAVERSA, O.C. & YANOVSKY, J. F. The effect of immunodepression due to neonatal thymectomy on infections with Trypanosoma cruzi in mice. Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg., 65 : 89-94, 1971.
- SCHNAIDMAN, B.B. ; YOSHIDA, N. ; GORIN, P. A.J. & TRAVASSOS, L.R. Cross-reactive polyssaccharides from Trypanosoma cruzi and Fungi (Especially Dactylium dendroides). J. Protozool., 33 (2) : 186-91, 1986.
- SCOTT, M.T. The nature of immunity against Trypanosoma cruzi in mice recovered from acute infection. Parasite Immunol., 3 (3): 209-18, 1981.
- SCOTT, M.T. & SNARY, D. American trypanosomiasis (Chagas's Disease). In : Immunology of parasitic infections (Edited by COHEN, S & WARREN, K.S.). Blackwell Scientific Publications, London, pp. 261-98, 1982.
- SCOTT, M.T. & GOSS-SAMPSON, M. Restricted IgG isotype profiles in T. cruzi infected mice and Chagas' Disease patients. Clin.Exp.Immunol., 58 : 372-9, 1984.
- SCOTT, M.T. & NEAL, R. A. & WOODS, N.C. Immunization of marmosets with Trypanosoma cruzi cell surface glycoprotein (GP90) Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 79 (4) : 451-4, 1985.
- SEGURA, E.L.; BUA, J.; ROSENSTEIN DE CAMPANINI, A.; SUBIAS, E.; ESTEVA, M.; MORENO M. & RUIZ, A.M. Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of Trypanosoma cruzi : complement-mediated lytic activity against trypomastigotes and passive immunoprotection in mice. Immunology Letters, 13 : 165-71, 1986.
- SERRANO, L. E. & O'DALY, J.A. Protein fraction from Trypanosoma cruzi infected spleen cells supernatants with immunosuppressive activity in vitro. Int. J. Parasitol., 17 (3) : 851-61, 1987.
- SNARY, D.E. & HUDSON, L. Trypanosoma cruzi cell surface proteins: Identification of one major glycoprotein. FEBS Letters, 100: 166-70, 1979.
- SNARY, D. ; FERGUSON, M. A.J. ; SCOTT, M.T. & ALLEN, A.K. Cell surface antigen of Trypanosoma cruzi : Use of monoclonal antibodies to identify and isolate epimastigote specific glycoprotein. Mol. Biochem. Parasitol., 3 : 343-56, 1981.
- SNARY, D. Cell surface glycoproteins of Trypanosoma cruzi : protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 77 (1) : 126-9, 1983.
- SNARY, D. Receptors and recognition mechanisms of Trypanosoma cruzi. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 79 : 587-90, 1985.

- TAKACS, B. Electrophoresis of proteins in Polyacrilamide slab gels. In: Immunological Methods. Copyright by Academic Press Inc. pp. 81-105, 1979.
- TAKEHARA, H.A. ; PERINI, A. ; DA SILVA, M.H. & MOTA, I. Trypanosoma cruzi: role of different antibody classes in Protection again infection in the mouse. Exp. Parasitol., 52: 137-46, 1981.
- TAMASHIRO, W.M.S.C.; LOPES, J.D.; SAKURADA, J.K. & RANGEL, H.A. Monoclonal antibodies to Trypanosoma cruzi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Suppl. 1, 82: 145, 1987.
- TANOWITZ, H.B.; AMOLE, P.; HERMAN, R. & WITTNER, M. Protection against fatal murine Chagas' disease with a Leishmania brasiliensis panamensis stock. Am.J.Trop.Med.Hyg., 35 (5): 937-411, 1986
- TARLETON, R.L. & KUHN, R. E. Changes in the cell populations and Immunoglobulin-Producing cells in the spleens of mice infected with Trypanosoma cruzi: correlations with parasite-specific antibody response. Cell Immunol., 80: 392-404, 1983.
- TARLETON, R.L. & KUHN, R. E. Restoration of "in vitro" immune responses of spleen cells from mice infected with Trypanosoma cruzi by supernatants containing Interleukin 2. J. Immunol., 133: 1570-1577, 1984a
- TARLETON, R. L. & KUHN, R.E. Loss of supressor activity in the serum of mice infected with Trypanosoma cruzi. J. Parasitol., 70 : 253-257, 1984b.
- TARLETON, R. L. & KUHN, R. E. Measurement of parasite-specific immune responses "in vitro" : Evidence for supression of the antibody response to Trypanosoma cruzi. Eur. J. Immunol., 15: 845, 1985.
- TARLETON, R.L. & SCOTT, D. W. Initial induction of immunity, followed by supression of response to parasite antigens during Trypanosoma cruzi infection of mice. Parasite Immunol., 8 : 579-89, 1987.
- TEIXEIRA, A.R. L. ; TEIXEIRA, L. & SANTOS-BUCH, C. A. The immunology of experimental Chagas's disease. IV. Production of lesion in rabbits similar to those of chronic Chagas's disease in man. Am. J. Pathol., 80: 163-78, 1975.
- TEIXEIRA, M. & YOSHIDA, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi identified by monoclonal antibodies,. Mol. Biochem. Parasitol., 18 (3) : 271-82, 1986.
- TRISCHMANN, T.M. & BLOOM, B. R. Genetics of murine resistance to Trypanosoma cruzi. Infect. Immun., 35 (2) : 546-51, 1982.
- TRISCHMANN, T.M. Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental Chaga's disease. J. Immunol., 130 : 1953-7, 1983.

- TRISCHMANN, T.M. Role of cellular immunity in protection against Trypanosoma cruzi in mice. Parasite Immunol., 6 (6) : 561-70, 1984.
- TRISCHMANN, T.M. Trypanosoma cruzi : Early parasite proliferation and Host resistance in inbred strains of mice. Exp. Parasitol., 62 (2) : 194-201, 1986.
- TUCHYA, H.N. ; MENDES, I.F. ; MIYAKI, C. & RIZZO, E. Study on the growth promotion capacity of calf serum for animal cells "in vitro". I. Test of 56 lots of calf serum against several cell lines and primary cell cultures. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 22 : 281-5, 1980.
- UMEKITA, L.F. ; TAKEHARA, H.A. & MOTA, I. Role of the antibody Fc in the immune clearance of Trypanosoma cruzi. Immunology Letters, 17 : 85-9, 1988.
- VOLLER, A. & SHAW, J.J. Immunological observations on an antiserum to Trypanosoma cruzi. Ztschr. Tropenmed. Parasit., 48: 180-7, 1965.
- WHITAKER, J.R. & GRANUM, P.E. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. Anal. Biochem., 109 : 156-9, 1980.
- WIRTH, J. & KIERSZENBAUM, F. Inhibition of mammalian host cell infection by insect-derived, metacyclic forms of Trypanosoma cruzi in the presence of human or rabbit anti- T. cruzi antibodies. Int. J. Parasitol., 17 (3) : 841-5, 1987.
- WONG, R.C. K. ; HUDSON, L. & HINDMARSH, P.J. E. Immune precipitation and immunoblotting for the detection of Trypanosoma cruzi antigen. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 80: 275-81, 1986.
- WRIGHTSMAN, R. ; KRASSNER, S & WATSON, J. Genetic control of responses to Trypanosoma cruzi in mice : multiple genes influencing parasitemia and survival. Infect. Immun., 36 (2) : 637-44, 1982.
- WRIGHTSMAN, R. A. ; LEON, W. & MANNING, J. E. Variation in antigenic determinants specific to the infective stage of Trypanosoma cruzi. Infect. Immun., 53 (2) : 235-9, 1986.
- YOSHIDA, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. Infect Immun., 40 : 836-9, 1983.
- YOSHIDA, N. ; TEIXEIRA, M.M. G. ; CHRISTO, C.N. & SBRAVATE, C.A. Resistance of mice immunized with killed culture trypomastigotes against infection by insect-derived trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 26 : 239-93, 1984.
- YOSHIDA, N. Trypanosoma cruzi: Recognition of trypomastigote surface antigens by lytic antisera from mice resistant to acute infection. Exp. Parasitol., 61 : 184-91, 1986.

YOSHIDA, N. & ARAGUTH, M.F. Trypanolytic activity and from antibodies to metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi in non-chagasic human sera. Parasite Immunol., 9 (3) : 389-93, 1987.

ZINGALES, B. ; ANDREWS, N.W. ; KUWAJIMA, V. Y. & COLLI, W. Cell surface antigens of Trypanosoma cruzi : possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. Mol. Biochem. Parasitol., 6 : 111-24, 1982a.

ZINGALES, B.; MARTIN, N.F.; DE LEDERKREMER, R. M.. & COLLI, W. Endogenous and surface labeling of Glycoconjugates from the three differentiation stages of Trypanosoma cruzi. FEBS Letters, 142 (2) : 238-42, 1982b.

ZINGALES, B. ; ABUIN, G. ; ROMANHA, A.J. ; CHIARI, E. & COLLI, W. Antigens of stocks and clones of Trypanosoma cruzi from humans. Acta Tropica, 41 : 5-16, 1984.

ZWEERINK, H.J. ; WESTON, H.D. ; ANDERSEN, D.F. ; GARBER, S. S. & HAYES, E. C. Immunity against infection with Trypanosoma cruzi in mice correlates with presence of antibodies against three trypomastigote polypeptides. Infect. Immun., 46 (3) : 826-30, 1984.

ZWEERINK, H.J. ; ANDERSEN, D.F. ; GREENBLATT, H.C. & MURRAY, K. Parasite specific antibodies in three strains of mice after infection with Trypanosoma cruzi. J. Parasitol., 71 (1) : 43-9, 1985.

"After all the above work and discussion it is clear that finding an answer for a specific question does not help very much since with the answer there comes a cascade of new questions. As these accumulate on and on one needs to master the art of not going insane. How to achieve this is something that we can discuss in a different place, possibly by the pool with some drinks."

(F. G. Araujo)