

*Este exemplar
corresponde a redação
final da tese defendida pelo
candidato Irandaia Ubirajara Garcia
e aprovada pela comissão julgadora*

IRANDAIA UBIRAJARA GARCIA

"ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANAFILÁTICOS,
E DA PARTICIPAÇÃO DOS MASTÓCITOS NA TRIPANOSOMÍASE
CRUZI EXPERIMENTAL"

Tese apresentada ao INSTITUTO DE
BIOLOGIA da UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS para obtenção do título
de MESTRE EM BIOLOGIA na área de
IMUNOLOGIA.

ORIENTADOR: PROF. DR. IRINEU JOSÉ BARSANTI DE CAMARGO

CO-ORIENTADOR: DRa. ANNIE PROUVOST-ALVAREZ

CAMPINAS - SÃO PAULO

1987

G165e

9153/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais,
pelo exemplo de amor,
honestidade e perseverança.

A meus filhos,
Juliana e Raphael,
pela significativa razão
de viver.

Este trabalho foi realizado no
departamento de Microbiologia e Imunologia
do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas.

Instituições que contribuíram financeiramente
para a realização deste trabalho:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
e Tecnológico (CNPq).
- Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de
Ensino Superior (CAPES).

Agradecimentos

- A Dra. Annie Prouvost-Alvarez, pelo carinho e dedicação dos ensinamentos recebidos, sem os quais poucas condições teria para desenvolvimentos deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Irineu S.B. de Camargo pela dedicação e apoio na orientação do desenvolvimento deste trabalho.
- Aos Profs. Drs. Paulo M. F. de Araújo, Washington Luiz Tafuri, Adenir Perini, Julia Franceschi e Julia K. Sakurada pelas contribuições, que favoreceram o enriquecimento deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Osmar J.B.H. de Lucca pela dedicada contribuição ao trabalho nas análises estatísticas.
- Ao Prof. Dr. Humberto A. Rangel pela sabedoria, apoio e amizade, que sempre mostrou durante o trabalho.
- Aos Profs. Dr. Norair Salviano dos Reis, Wirla M.S.C. Tamashiro, Elizabeth Malagueno Santana, pelos indispensáveis apoio, ensinamentos e auxílios técnicos, os quais facilitaram a execução deste trabalho.
- A coordenação do curso de Pós-Graduação em imunologia, e a chefia do departamento de Microbiologia e Imunologia.
- Aos professores, colegas e funcionários, integrantes do Instituto de Biologia, pelos ensinamentos recebidos e a agradável convivência durante o período de desenvolvimento deste trabalho.
A todas as pessoas, que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho, cuja relação nominal seria de difícil execução, expresso o meu profundo agradecimento.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	
1. Animais	21
2. <i>Trypanosoma Cruzi</i> - Infecção experimental e obtenção de soros	21
3. Antígenos - obtenção e análises	22
3.1 - Extrato de formas epimastigota	22
3.2 - Extrato de formas tripomastigota e amastigota	23
4. Imunossoros	24
4.1 - Soro de rato anti-Fc de IgE de camundongo	24
4.2 - Soro de camundongo anti-ovalbumina	24
5. Preparação do extrato de célula Hela	25
6. Estudo da produção de anticorpos anafiláticos através da Reacção Anafilática "in vitro" de Mastócitos Peritoneais.....	26
6.1 - Reacção Anafilática Ativa "in vitro" de mastócitos peritoneais	27
6.2 - Reacção Anafilática Passiva de mastócitos peritoneais "in vitro"	29
6.2.1 - Estudo da produção de IgE em soro de camundongos infectados	29
6.2.2 - Estudo da produção de IgG em soro de camundongos infectados	31

7. Exame do Mesentério:	
7.1 - Quantificação dos mastócitos do mesentério de camundongos normais e infectados por <i>T.cruzi</i>	33
7.1.1 - Quantificação de mastócitos situados no tecido conectivo peri-vascular.....	34
7.1.2 - Quantificação de mastócitos situados no tecido conectivo inter-vascular	34
7.2 - Estudo do infiltrado inflamatório no tecido conectivo pré-vascular, e no tecido conectivo inter-vascular	34
8. Análises Estatísticas	35

RESULTADOS

1. Produção de IgE total e específica para antígenos de <i>T.cruzi</i> , detectada ao nível da superfície de mastócitos, e sua comparação entre linhagens de camundongos	37
2. Produção de IgE específica para antígenos de <i>T.cruzi</i> ao nível de soro de animais infectados, e a sua comparação entre linhagens de camundongos	44
3. Produção de IgG1 específica para antígenos de <i>T.cruzi</i> , ao nível de soro de animais infectados, e a sua comparação entre linhagens de camundongos	50

4.	Inibição da degranulação de mastócitos de camundongos infectados e mastócitos normais frente a soro de animais infectados, em presença de antígenos não relacionados a <i>T.cruzi</i>	56
5.	Análise da variação do número e da degranulação de mastócitos de camundongos infectados por <i>T.cruzi</i> , a nível de tecido conectivo peri-vascular	59
6.	Análise da variação da degranulação de mastócitos no mesentério de camundongos infectados à nível do tecido conectivo inter-vascular	63
7.	Análise do infiltrado inflamatório nos tecidos do mesentério de camundongos infectados por <i>T.cruzi</i>	65
	DISCUSSÃO	69
	RESUMOS E CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Está descrito na literatura, que por volta de 20 milhões de pessoas na América Latina apresentam reações sorológicas positivas para o parasita *Trypanosoma cruzi*, que é o agente etiológico responsável pela doença de Chagas (Carlos Chagas, 1909). Além disso, tem sido estimado uma incidência desta doença em 800.000 novos casos por ano (Kierszenbaum, 1985). O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário, que se acha distribuído desde a região centro-sul dos Estados Unidos até as Américas Central e do Sul.

Existe um ciclo de transmissão natural do parasita entre os animais silvestre, o qual é transmitido acidentalmente ao homem, através da picada de insetos do gênero *Triatoma* portadores do parasita no trato digestivo. Quando inoculado no homem desenvolve principalmente sintomas crônicos na chamada Tripanosomíase Sul Americana, também conhecida como doença de Chagas. Na fase crônica a doença se manifesta por miocardites e síndrome dos megas em esôfago, colon e outras regiões do sistema gastro-intestinal. Programas de profilaxia da doença de Chagas tem-se fundamentado basicamente no interesse de controlar o vetor desta infecção (Brener, 1986). Os programas políticos-sociais de eliminação dos Triatomídeos têm ocasionado operações desastrosas com o uso de inseticidas, e o aparecimento de cepas do parasita mais resistentes, além disso ocasionam o desequilíbrio ecológico e a migração territorial destes insetos para outras áreas onde a infecção se manifesta com alta virulência.

Diante de tais fatos, podemos enfatizar a idéia que existem inúmeras razões em se valorizar as pesquisas, que envolvem os mecanismos da resposta imune ao *T.cruzi*, os meios de escape desenvolvido pelo parasita, bem como os processos gerais de imunização contra o parasita, como uma importante alternativa no controle da doença de Chagas (Brenner, 1986).

Entretanto, sabe-se que numerosos pesquisadores têm encontrado obstáculos, para o desenvolvimento de esquemas de vacinação, para proteger da doença de Chagas milhares de pessoas, que atualmente habitam áreas endêmicas e são portanto tidas como populações de risco. Estas dificuldades estão fundamentadas inicialmente pela presença de um grande mosaico antigênico, que o parasita apresenta ao sistema imunológico do seu hospedeiro. As diferenças funcionais, o polimorfismo e as características isoenzimáticas de várias cepas de *T.cruzi*, evidenciam a complexidade das populações deste parasita. O encontro destas grandes diferenças sugeriu a autores ser o *T.cruzi* um grande complexo de coleção de organismos, os quais frequentemente existem como populações heterogêneas, dentro de um equilíbrio dinâmico (Morel et alii, 1986). Outras dificuldades estão relacionadas aos diferentes mecanismos imunopatológicos desenvolvidos durante as várias fases da infecção.

Inicialmente, pós a forma tripomastigota penetrar em um indivíduo, ocorre um período de incubação geralmente assintomático. Nesta fase, o parasita penetra e se multiplica em células do sistema fagocítico mononuclear, e outras células apresentadoras de antígenos não pertencentes a este sistema.

A fase aguda, que precede a primeira fase geralmente é sintomática e algumas vezes acompanhada por um pequeno número de óbitos, sendo principalmete atribuidos à deficiências cardíacas. Pode também ocorrer neste período, complicações bronco-pulmonares ou neurológicas.

O período que precede a dissiminação do parasita, apresenta-se com manifestações locais, devido a penetração do *T.cruzi* na conjuntiva, ocorrendo o sinal Romaña, ou na pele formando o Chagoma de Inoculação. Neste local de penetração é desenvolvido um processo inflamatório agudo

A fase aguda da infecção é caracterizada por uma alta parasitemia, onde as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas no interior das células do sistema fagocítico, e caem na circulação sanguínea. Esta interiorização do tripanossoma na célula fagocítica, ainda é um assunto discutível, necessitando maiores esclarecimentos (Brenner-Rev, 1980). Entretanto, conhece-se que o tripanossoma escapa à ação dos fagossomas, multiplicando-se e ocasionando uma ruptura na membrana celular, dando origem a uma rápida disseminação da infecção. A predominância de macrófagos em grandes quantidades em órgãos tais como: baço, medula e etc., tem sido relacionada ao tropismo das diferentes cepas estudadas (Melo et al, 1978).

Após o período da fase aguda surge um período, que se caracteriza predominantemente em uma diminuição da parasitemia na circulação periférica designado como fase indeterminada. Assim os indivíduos que sobrevivem a estas fases iniciais, evoluem para uma fase crônica, a qual pode manter-se assintomática indefinidamente.

Atualmente, apesar dos conhecimentos advindos das pesquisas em doença de Chagas persiste a idéia, segundo Almeida Prado (1959), que

existe um "elo perdido" entre a fase aguda e a fase crônica dentro da história natural da doença. A vasta literatura, que se desenvolveu nos últimos tempos sobre a doença, em todo seu conjunto mostra que os resultados descritos são por muitas vezes contraditórios, desconhecendo-se os diversos mecanismos biológicos associados à infecção e à patogenia da doença.

Foi inicialmente no período da fase crônica da infecção, que se fizeram as primeiras descrições histopatológicas, através dos trabalhos de Vianna (1911), onde se mostravam degenerações de células não infectadas, após ruptura de células vizinhas infectadas. Trabalhos recentes revelam, através de análises histopatológicas, que a fase crônica está associada a frequentes processos inflamatórios, acompanhados por completa destruição miocárdial, com presença de fibroses (Tafuri, 1985)⁹.

É portanto na fase crônica, que vão se desenvolver as miocardites chagásicas, megaesôfago e megacolon com presença de infiltrados inflamatórios crônicos e fibrose intersticial, seguidos de processos degenerativos de células musculares com grande frequência. É preferencialmente na fase crônica, que os processos inflamatórios tornam-se altamente progressivos. Em geral, são descritos que os focos inflamatórios estão inicialmente confinados aos focos com presença de parasitas, mas observou-se em outras fases da infecção, que estes focos estão disseminados envolvendo fibras musculares não parasitadas. Mais recentemente tem sido observado também, que ocorrem processos inflamatórios em algumas regiões de tecidos, com desenvolvimento de fibroses na ausência completa de parasitas (Andrade, 1983).

O fenômeno da disseminação de infiltrados na ausência de parasitas, tem sido relacionado com a resposta imune às células do hospedeiro, modificadas pela adsorção passiva de antígenos (Hudson et al., 1982). Por outro lado, poderia estar ocorrendo uma manifestação do sistema imunológico, através do fenômeno de autoimunidade, ou seja a indução de anticorpos específicos antígenos das próprias células do hospedeiro. Entretanto, a autoimunidade é um aspecto muito polêmico na doença de Chagas, pois sabe-se que indivíduos chagásicos desenvolvem anticorpos específicos à laminina (Szarfman, 1982), e que a heterogeneidade antigênica do *T.cruzi* é responsável por inúmeras reações cruzadas com várias moléculas (Hudson, 1985).

Por inúmeras razões tem sido abordada a importância ou não da autoimunidade para antígenos de tecidos em Chagas (Kierszenbaum, 1986). Discute-se quais seriam os verdadeiros fenômenos biológicos responsáveis pelas lesões progressivas durante a evolução da doença. Várias observações sugerem a possibilidade de existir uma autoreatividade da imunidade mediada por células nos processos de miocardites.

Estudos mostraram que linfócitos de pacientes chagásicos em cultura, apresentam citotoxicidade contra células alogeneicas do coração (Teixeira et al., 1978), e ao lado destas observações, animais imunizados com parasitas mortos também apresentam alterações histopatológicas semelhantes aos animais infectados, indicando a não necessidade de adquirir a infecção, para manifestar os sintomas da doença (Teixeira et al., 1975).

Portanto, é extremamente complexo se estabelecer metas definidas, para que se possa utilizar medidas imunoproláticas a infecção por *T.cruzi*, já que são contraditórias as propostas dos mecanismos responsáveis pelos fenômenos patogênicos presentes.

Há quase meio século foi levantada a primeira hipótese de que a patogenia miocárdial poderia ser uma reação alérgica, causada por produtos do parasita (Magarinos, 1929), e mais tarde foi mencionado como um provável fenômeno alérgico (Chagas, 1934).

Outras propostas teóricas surgiram na tentativa de explicar os mecanismos lesivos na doença de Chagas, associando-os ainda a fenômenos alérgicos (Torres, 1941). Logo após, surgiram na literatura publicações científicas do mesmo grupo, quando extratos de *T.cruzi* eram inoculados em macacos, usando um esquema tipo dose sensibilizante por via endovenosa e dose desencadeante, diretamente nos tecidos examinados; a pleura e o miocárdio. Estes autores obtiveram como resultado lesões inflamatórias semelhantes às lesões encontradas em chagásicos e foram reconhecidas como lesões hiperérgicas (Muniz et al, 1947).

Outros autores mostraram fenômenos durante a infecção, que em diferentes aspectos eram associados aos fenômenos alérgicos. Observaram os tipos de reações, que se desenvolviam na pele, quando injetavam extratos ou inóculo de *T.cruzi* (Mazza et alii, 1936). Mais tarde, foram analisadas a natureza histopatológica das reações cutâneas provocadas em chagásicos, injetando na pele lisados de *T.cruzi*. Estas reações foram sugeridas como reações alérgicas (Mazza et al, 1943).

Também foram feitos estudos sobre o fenômeno do Sinal de Romãña, e detectaram que tanto o *T.cruzi*, quanto a saliva dos Triatomídeos tinham ação sensibilizante e poderiam determinar edema palpebral de iguais dimensões tegumentares. Estas reações no tecido poderiam favorecer a penetração do parasita, através do tegumento (Lumbreras et alii, 1959).

Atualmente, vários autores tem relacionado a patogenia das lesões chagásicas à fenômenos do tipo hipersensibilidade retardada (Santos-Buch et al, 1974). Tem sido descrito que nas infecções crônicas onde é escasso o parasitismo, a inflamação local é responsável pela destruição das fibras cardíacas, com consequentes liberações de auto-antígenos, os quais provavelmente seriam responsáveis pela reação de hipersensibilidade retardada contra o miocárdio (Ribeiro dos Santos et al, 1985).

Além dos fenômenos de hipersensibilidade nas cardiopatias, há trabalhos sugerindo que o edema palpebral e os Chagomas de Inoculação, também possam estar envolvidos por estes mecanismos (Teixeira et al, 1978). Também, nas infecções experimentais em camundongos ocorrem fenômenos do tipo hipersensibilidade em períodos tardios na infecção induzidos por adjuvantes e vacinas (Abrahamsohn et alii, 1983).

O camundongo tem sido utilizado amplamente em pesquisa, por ser um modelo biológico que representa aspectos clínicos e patológicos, semelhantes aos ocorridos nas infecções humanas, desenvolvendo similaridades na fase aguda e crônica da infecção. Pode-se verificar características bem marcantes na infecção, quando são utilizadas linhagens isogênicas de camundongos, com diferentes graus de resistência e susceptibilidade, como a linhagem do camundongo CBA/J a qual é altamente susceptível quando infectadas com pequeno número de parasitas da cepa Y; ou seja 100 formas. Entretanto esta mesma cepa, com o mesmo número de formas inoculadas é pouco virulenta para a linhagem C57B1/10 (Corcini et alii, 1980). As variações da resistência à infecção entre as linhagens de camundongos isogênicos, têm sido correlacionadas à capacidade do animal desenvolver uma adequada resposta imune ao parasita

(Kierszenbaum et al, 1976; Krettli et al, 1976; Trischman et alii, 1978).

A participação do sistema imunológico na defesa do hospedeiro ao parasita se faz inicialmente com um arsenal de células, que trabalham dentro de um sistema fundamental de cooperação. Nos hospedeiros vertebrados sabemos que as células do sistema macrofágicas são as primeiras populações celulares a entrar em contato com o tripanossoma (Wirth et al, 1984). Entretanto, os mecanismos de penetração e a função exata das células macrofágicas não estão bem elucidados (Brener, 1980; Piras et alii, 1983; Carvalho et alii, 1985).

Uma segunda população de células, que tem um importante papel na infecção são os linfócitos, os quais participam das interações celulares com importantes papéis efetores (Reed, 1980).

Outras populações de células fagocíticas têm sido indicadas como importantes na vigilância imunológica durante a infecção, uma vez que destroem formas infectantes nos hospedeiros vertebrados tanto "in vitro" (Kierszenbaum et alii, 1974). Recentes estudos mostraram evidências da susceptibilidade de formas sanguíneas de *T. cruzi* associadas a fenômenos tipo citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), mediados por diversos tipos celulares, inclusive o eosinófilo (Kierszenbaum, 1979; Kierszenbaum et al, 1980- Kipnis et alii, 1981; Kierszenbaum et al, 1986). Tem sido sugerido, que os eosinófilos exercem uma atividade citotóxica fundamental na infecção chagásica, diferente ao que se pensava ter esta atividade a célula T "Killer" (Sanderson, et alii, 1977).

As informações sobre o quadro eosinofílico na doença de Chagas ainda são limitadas. Um dos primeiros trabalhos sobre este aspecto

mostrou presença de eosinofilia no último estágio da fase aguda da infecção (Dias, 1912).

Foi analisada a eosinopóiese em linhagens de camundongos susceptíveis e resistentes à infecção mostrando que há diferenças entre as duas linhagens infectadas. Em geral, o nível de eosinófilos aumenta na fase aguda e permanece pouco aumentado na fase crônica, entretanto sendo maior este aumento na linhagem susceptível (Rowland et al, 1983).

Apesar de atualmente não serem mencionados níveis alterados de eosinófilo no sangue periférico de chagásicos, ou em animais (Repka et alii, 1985), tem-se verificado em cortes histológicos do miocárdio humano (originado de um óbito com miocardite chagásica aguda) um intenso exsudato de células mononucleares repleto de granulócitos eosinofílo. Neste caso, as células cardíacas sofrem fenômenos agressivos, observando-se fusões com as membranas dos eosinófilos, sugerindo um estado de agressão destas células às cardíacas, nas fase aguda da doença (Taffuri et alii, 1983).

Estudos "in vitro" com modelo de eosinófilo de camundongo, sugerem que os mecanismos de citotoxicidade desta célula seriam também responsáveis "in situ" pela destruição tecidual, através de interações dos anticorpos com os antígenos de *T.cruzi* exibidos na superfície das células cardíacas (Lopes et al, 1983).

Sabe-se perfeitamente que um dos principais fatores quimiotáticos do eosinófilo é fator quimiotático para eosinófilo-anafilático (EQFA), liberado pelo mastócito. É conhecido também, que a concentração de histamina é um fator importante na atividade quimiotática do eosinófilo (Clark et alii, 1977).

Em exames histopatológicos na doença de Chagas frequentemente indicavam um aumento considerável de mastócitos. Em camundongos cronicamente infectados foram encontrados na pele, no local da reinoculação, um grande aglomerado de mastócitos (Menezes et al, 1985). Outros autores estudando as lesões produzidas pelo *T.cruzi* nos plexos de Meissner e Auerbach, no intestino de camundongo, observaram que durante a fase crônica os fenômenos inflamatórios dos tecidos parasitários eram acompanhados por uma grande mastocitose, sendo verificado também um grande

número de mastócitos na muscular do intestino destes animais (Tafuri et al, 1967), e na muscular própria do esôfago em pacientes chagásicos crônicos (Tafuri et alii, 1971). Foi observado por estes autores, que em geral a mastocitose se apresentava difusa, e portanto não acompanhavam os pontos inflamatórios em atividade na musculatura.

Verificou-se também um aumento de mastócito na miocardites chagásicas, constatando-se que quanto maior fosse a miocardite, havia uma maior mastocitose. Embora a distribuição dos mastócitos no tecido cardíaco não apresentasse uniforme, foi encontrado um maior número desta célula nos focos inflamatórios do miocárdio (Almeida et alii, 1975).

A quantificação do número de mastócitos na musculatura do esôfago de chagásicos crônicos, mostrou que os mesmos se apresentavam aumentados (Pereira, 1972).

Os mastócitos estão altamente nos tecidos das espécies mamárias, derivam do sistema de células indiferenciadas da medula óssea (Denburg et alii, 1980), e sua diferenciação ocorre sob a influência de um fator derivado do linfócito T; fator de crescimento do mastócito (MCGF) (Kitamura et alii, 1981). Se caracterizam por possuírem matriz citoplasmática, grânulos com uma grande variedade de mediadores farmacológicos neo ou pré-formados, com intensa atividade biológica, tais como; histamina, serotonina, heparina, enzimas proteolíticas, fatores quimiotáticos para neutrófilos e eosinófilos, e etc.

Em geral, o teor desses mediadores variam com as diferentes subpopulações destas células. Apesar do teor de histamina dos mastócitos dentro de uma mesma espécie se variável, e depender da maturação celular (Ishizaka et alii, 1977), o mastócito apresenta o maior estoque de histamina nos tecidos das espécies mamárias. O seu citoplasma, geral-

mente acomoda de 500-1000 grânulos, os quais em presença de estímulos apropriados liberam o seu conteúdo para o meio extra-celular.

Na espécie humana, os mastócitos são encontrados principalmente nos tecidos conectivos, e estão presentes em grande número na pele, nos órgãos linfóides, medula óssea e na sub-mucosa dos trato-respiratórios e gastro-intestinais. Estão principalmente situados nos tecidos que contornam os vasos sanguíneos. Em geral, as populações de mastócitos apresentam dentro de uma mesma espécie características distintas, sendo diferentes imunológica, morfológica, e citoquimicamente. Apresentam variados teores de substâncias nos diversos estágios de diferenciação, levando a características diferentes dos seus grânulos (Pretlow et al, 1970; Lee et alii - Rev.1985; Pearce, Rev,1986). Existem hipóteses que estas diversibilidades poderiam ser responsáveis pelas diferentes manifestações da patogenia, que seguem às respostas biológicas dos mastócitos (Kaliner et al, 1980).

Na pele humana existem aproximadamente 10.000 mastócitos/mm³, o que está provavelmente associado ao seu papel protetor, como barreira para maioria dos microorganismos que ganham acesso aos órgãos internos através da pele. Assim, os mastócitos presentes na derme e nas mucosas estão presentes nesta primeira fase de defesa, induzindo uma resposta inflamatória junto ao sítio de penetração do microorganismo.

Nos animais que ainda não tiveram um contato prévio com o parasita, e portanto não desenvolveram um padrão imune de respostas específicas, a penetração do parasita na pele pode acionar mecanismos não imunológicos, ativando a via alternativa do complemento, gerando frações C3A, C4A e C5A (anafilatoxinas), as quais se fixam em receptores dos mastócitos, iniciando assim um processo de excitose inespecífica.

Entretanto, quando o animal teve um contato prévio e em um segundo contato com o parasita ou com seus antígenos, ao penetrar na pele estes antígenos interagem especificamente com determinados isotipos de imunoglobulinas, presentes na superfície do mastócito. Assim será promovida uma exocitose ou degranulação desta célula e teremos uma reação anafilática local.

Por outro lado sabe-se que os antígenos do parasita podem interagir especificamente com algumas imunoglobulinas; IgG2, IgG4 e IgM, para formarem imune-complexos, os quais ativam a via clássica do complemento e conseqüentemente promovem a formação de anafilatoxinas.

Inicia-se então um processo dinâmico de reposição de células, estruturas moleculares e também o número de mastócito na pele e nas mucosa é aumentado, pela frequência de exposição ao parasita e conseqüentemente ampliação dos processos inflamatórios.

A inflamação e a imunidade são dois fenômenos que estão inter-relacionados. De fato, na maioria dos vertebrados os componentes imunológicos são elementos efetores no processo inflamatório. A participação da imunidade no fenômeno biológico da inflamação representa uma eficiente e efetiva resposta de defesa de um hospedeiro (Oppenheim, 1981).

Também, fatores não-imunológicos podem agir como adjuvantes dentro de um processo inflamatório, podendo assim ampliar as reações imunológicas do hospedeiro. Entretanto, os efeitos dos mastócitos por exemplo; na inflamação estão associados a exocitose de seus grânulos. A histamina liberada por estas células participa efetivamente na inflamação.

Pesquisadores têm demonstrado o papel benéfico das reações anafiláticas cutâneas passivas na neutralização de toxinas diftérias em sí-

tios da pele de animais infectados (Ishizaka et alii, 1970). Sabemos também, que ocorrem processos de neutralização de toxinas bacterianas em sítios da pele, e que o grau de neutralização está associada ao trabalho das interações dos mastócitos com a IgE (Steinberg et alii, 1974).

Nos modelos experimentais descritos é possível que certos antígenos microbianos sejam capazes de estimular a formação de IgE no tecido, e portanto sensibilizar os mastócitos da região. Neste caso, os antígenos depositados na superfície das mucosas levam a processos de degranulação, liberando mediadores farmacológicos e proporcionando um aumento da permeabilidade vascular, permitindo portanto a translocação de anticorpos do soro para o local, como também permitindo a passagem de células que vão participar efetivamente no processo inflamatório. São portanto estas sequências de eventos, que produzem as reações anafiláticas, as quais contribuem com um papel benéfico nos mecanismos de defesa a vários patógenos (Kay et alii, 1971).

Sabemos que a produção de anticorpos específicos é um importante fator na defesa do hospedeiro contra a infecção a *T.cruzi* (Krettli, Rev, 1983). Autores que analisam os padrões de respostas humorais de camundongos durante a infecção, concluíram que existe uma correlação inversa entre a habilidade do animal em produzir anticorpos e a sua susceptibilidade à infecção (Kierszenbaum et al, 1976).

Apesar de na fase aguda não ser observado por alguns autores um aumento de IgG1 (Scott et al, 1984), sabe-se que a classe IgG mantém-se elevada durante toda a infecção em animais e também em humanos (Brener, Rev, 1980). Tem sido desenvolvido estudos com o objetivo de detectar a classe de anticorpo, a qual seria a responsável pela proteção da infecção no hospedeiro, e tendo-se verificado que em camundongo a IgG2b confere uma proteção parcial à infecção (Takehara et alii, 1981).

Apesar do propalado aumento de anticorpos anafiláticos em animais e humanos infectados por helmintos, raramente encontramos um aumento destes anticorpos, principalmente de IgE no soro de pacientes infectados por protozoários parasitas (Radermecker et alii, 1974). Em geral, os parasitas apresentam diferentes habilidades em potenciar a síntese de IgE e os mecanismos responsáveis por estas diferenças ainda são mal elucidados. Pelo estudo das respostas em parasitas helmínticos, tem-se entendido que a indução da resposta imunitária do hospedeiro está relacionada ao ciclo de vida do parasita, sendo a migração para os tecidos o principal fator para que seja induzida uma bio-síntese de IgE. Esta diferença ocorre em helmintos que apresentam um ciclo de vida inteiramente confinado à luz intestinal (Dessaint, 1982).

Podemos dizer que são inúmeros e complexos os aspectos indutores de respostas anafiláticas durante as interações parasita-hospedeiro.

São conhecidos através da literatura duas classes principais de anticorpos anafiláticos em diversas espécies: No homem os anticorpos da classe IgE ou anticorpo reagínico, isolado por Ishizaka, e Ishizaka e Johansson e Bennich independentemente em 1967, e parece ser comum a todas as espécies mamárias, e representarão dentro das reações anafiláticas um destaque especial, e o anticorpo da classe IgG, que dependendo da espécie apresenta atividades anafiláticas em suas diferentes sub-classes.

Em camundongos são produzidos tanto a IgG, como a IgE, sendo que a $\gamma 1$ (IgG1), é normalmente sintetizada em grandes quantidades, na ordem de mg/ml-especialmente após um esquema de hiperimunização. Essa imunoglobulina é termo estável e induz reação de PCA em pele homóloga, após um período de 2 horas de latência (Nussensweig et alii, 1964).

A IgE em geral é produzida em pequenas quantidades, sendo uma imunoglobulina termo-lábil persistindo na pele homóloga por dias, e induzindo reação de PCA com um período de 72hs de latência (Mota et al, 1966; McCamish, 1967; Prouvost-Danon et al, 1967).

Estas duas classes de imunoglobulina têm a propriedade em comum de se fixarem através da porção Fc em receptores específicos de células como: mastócito, basófilo, monócito, macrófago, eosinófilo, neutrófilo e etc., e desempenham uma grande atividade biológica, cooperando efetivamente nas respostas imunológicas dos organismos no combate a invasão ou na manutenção da sua integridade orgânica.

O papel do basófilo e do mastócito nas reações de hipersensibilidade imediata foi estabelecido no século XIX por Kanthact e Handy em 1834 e por Ehrlich em 1879, respectivamente. Em experiências "in vitro", verificou-se que os mecanismos de sensibilização dos mastócitos,

para os dois tipos de imunoglobulinas são consideravelmente diferentes. A IgE tem uma maior afinidade pelo receptor do mastócito, e não é removida por lavagem técnica (Prouvost-Danon, 1966), enquanto a IgG1(γ_1) se fixa fracamente no receptor da célula, e pode ser removida com lavagens. A IgG1 induz degranulação através da formação prévia de complexos solúveis com o antígeno específico (Prouvost-Danon, 1972). Estes fenômenos independem da presença do complemento (Prouvost-Danon, 1968).

No homem o papel da IgG na liberação de mediadores anafiláticos, ainda são fenômenos que não estão bem elucidados. Sabe-se que a IgG4 apresenta um papel no reconhecimento de alérgenos, mas a sua capacidade de induzir a liberação de histamina ainda é contestada.

Em animais de laboratório, em geral verifica-se que as respostas de IgE e IgG não são paralelas. A dissociação entre estas duas respostas é frequentemente observada, quando são utilizados determinados adjuvantes, que só favorecem a resposta para IgE, enquanto que outros são excelentes indutores para as respostas de IgG. Estas dissociações de respostas entre IgE e IgG, estão relacionadas aos diferentes sistemas de cooperação, reguladas por linfócitos T, que atuam através de fatores potenciadores ou supressivos das respostas de biossíntese destas imunoglobulinas (Ishizaka, 1985).

Em geral, os programas de pesquisas em imunoparasitologia nos últimos anos, têm-se concentrado com grande empenho nos estudos das estruturas derivadas dos parasitas, visando o isolamento e caracterização de antígenos, fato que têm contribuído para um maior desenvolvimento da biologia das doenças parasitárias. Contudo, muitas vezes estas investigações ficam demasiadamente envolvidas nas atividades de

moléculas e dissociam-se um pouco do quadro anatomopatológico das infecções. Diante de tal aspecto, a história natural da doença de Chagas tem-se revelado como um modelo de estudo extremamente complexo, no qual a compreensão mais global das interações hospedeiro-parasita. E, principalmente nas infecções Chagásicas estas complexidades de interações têm afastado de certa forma as associações dos mecanismos investigados com a patogênia da doença. Baseados nestes fatos perduram os questionamentos de certos autores sobre quais seriam os mecanismos exatos responsáveis pelo rompimento do equilíbrio entre hospedeiro/parasita, o qual ocorre principalmente na fase crônica, e que surge com o aparecimento das cardiopatias graves e das peristalse (Tafuri, 1987).

Baseando-se nos relatos que evidenciam os fenômenos alérgicos da doença de Chagas (Magarinos, 1929), nota-se uma tendência especial nas publicações científicas, que os processos inflamatórios e as lesões, estariam associados a fenômenos de hipersensibilidade. Apesar de serem desenvolvidas estas idéias no decorrer dos anos, complementando mais evidências relacionadas a este fenômeno, não foi possível ter uma visão global dos fenômenos biológicos obtidos, os quais explicassem satisfatoriamente a maioria dos eventos biológicos.

A hipersensibilidade tipo retardada foi um evento inúmeras vezes citado como um dos principais mecanismos responsáveis pelas lesões miocárdiais. Complementando esta idéia sabemos que o mastócito é uma célula efetora essencial dentro do processo de hipersensibilidade retardada (Askenase et al, 1983). Assim, constitui-se a reflexão, que estes sistemas de hipersensibilidade detectados na infecção chagásica, poderiam estar associados aos processos patológicos gerais, principalmente sabendo-se que na realidade as reações de hipersensibilidade na maioria das vezes estão inter-relacionadas e se complementam entre si.

A grande quantidade de IgE nas parasitoses helmínticas, apresenta-se na maioria das vezes uma limitada especificidade aos antígenos destes parasitas (Dessaint et alii, 1975; Rousseaux-Prévost et alii, 1978; Ottesin et alii, 1981).

Tendo em vista o exposto acima, interessa-nos questionar se os títulos baixos deste isotipo de imunoglobulina (IgE), que parecem ser mantidos durante todo o processo infeccioso, poderiam portar uma alta especificidade, suficientemente capaz de exercer atividades anafiláticas durante a infecção.

Por outro lado tem-se observado na literatura pouca atenção as pesquisas das sub-classes de IgG com atividades anafiláticas talvez em decorrência ao maior enfoque dado pelos trabalhos científicos no estudo da IgE. O estudo desse aspecto da IgG seria justificável considerando-se principalmente que na espécie humana tem-se indícios de que a IgG participa com duas sub-classes dentro do processo anafilático. Além da IgG4 existe uma outra sub-classe, que é capaz de sensibilizar a pele humana e sobretudo de primatas a (short-time-sensitizing antibody) S.T.S.A., a qual apresenta esta atividade para muitos antígenos bacterianos (David, 1985).

Em sequência a estas colocações ficaria uma outra questão na infecção de Chagas: Qual seria o verdadeiro papel do mastócito diante de todo o exposto acima?

Apesar das várias evidências dos possíveis mecanismos anafiláticos associados à infecção chagásica, nunca foi comprovada experimentalmente, de uma maneira efetiva, onde se pudesse correlacionar as células, e seus produtos secretados nos eventos investigados.

A proposta deste trabalho é sugerir a possibilidade que, entre os vários tipos de hipersensibilidade que possam estar ocorrendo na infecção, haja uma participação das reações anafiláticas em algum período da fase aguda os quais poderiam ser responsáveis por diversos fenômenos anatomo-patológicos.

Baseando-se nos fatos relatados sobre as reflexões do fenômeno de hipersensibilidade que foram descritos inicialmente a quase meio século passado, será retomado o estudo do fenômeno, apoiado em uma investigação mais detalhada, com o auxílio de uma metodologia atualizada e com os entendimentos modernos dos mecanismos básicos das reações de hipersensibilidade. Assim, o presente trabalho tem como objetivo estudar a cinética da produção de anticorpos anafiláticos em animais experimentais infectados por *T. cruzi*, através das reações anafiláticas de degranulação ativas e passivas "in vitro" assim como também estudar a participação dos mastócitos nos processos inflamatórios desenvolvidos em tecidos do mesentério, durante a fase aguda da infecção Chagásica.

Para este fim serão investigadas paralelamente as respostas em camundongos isogênicos susceptíveis a infecção (CBA/J) e moderadamente resistentes (C57BL/10), quando inoculados com baixas doses do parasita.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos isogênicos, machos da linhagens CBA/J e C57B1/10, com 3 a 4 meses de idade.

Também foram utilizados camundongos albinos (Swiss-55), fêmeas, heterogênicos, com idades de 4 a 6 meses, sendo todos originados do Biotério Central da UNICAMP e mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP.

Para o estudo da participação do mastócito e dos processos inflamatórios, foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens CBA/J e C57B1/10, com idades de 3 a 4 meses, originados do Biotério Central da UNICAMP.

2. *Trypanosoma cruzi* - Infecção experimental e obtenção de soros

Foram utilizadas cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (Pereira da Silva e Nussensweig, 1953), altamente virulentas para camundongos e mantida através de transferência passiva semanais.

Lotes de camundongos CBA/J e C57B1/10 foram inoculados com 100 formas do parasita subcutâneamente no dorso do animal e controlada a parasitemia no 8º dia de infecção em análise de gota de sangue. Os so-

ros de camundongos CBA/J e C57B1/10 inoculados com *T.cruzi*, foram coletados em dias padronizados para todas as análises. Foram feitas punções do plexo retro-orbital nos dias: 10, 15 e 20 após a infecção, e foi coletado na mesma região o sangue de camundongo normal, que correspondeu ao dia zero. Estes soros foram separados de acordo com os respectivos grupos de animais e acondicionados em pool a -20°C até o momento do uso. Para as análises de IgG1, aliquotas de soro foram previamente inativadas pelo calor a 56°C durante 4 horas de modo a destruir a atividade relativa a IgE.

3. ANTÍGENOS - obtenção e análises

Utilizaram-se antígenos obtidos das três formas diferentes de *T.cruzi*: epimastigota, tripomastigota e amastigota.

3.1 - Extrato de epimastigota

Os antígenos das formas epimastigotas foram obtidos através das frações solúveis de extrato total originário de cultura de formas epimastigota em meio L11 (Liver Infusion Tryptose), contendo um total de $5,0 \times 10^{10}$ formas por 0,75g do extrato. Este extrato foi tratado com 2-mercaptoetanol 15mM, suspenso em solução de salina 0,15M e preservado a -20°C até o momento de uso. Estes extratos apresentaram atvida-

de enzimática sobre substratos sintéticos do tipo BANA (Benzoil L-Arginina Naftil Amida) e AFNE (acetil-DL-Fenilalanina-2-Naftil.Ester) segundo análise realizada de acordo com as indicações de Uriel (1971) para determinações qualitativas.

3.2 - Extrato de Tripomastigota e de Amastigota

Formas sanguícolas do *T.cruzi* foram isoladas de camundongos e transferidas assepticamente cultura em célula Hela. As duas formas: tripomastigota e amastigota foram obtidas separadamente, através do sobrenadante das culturas enriquecidas destas formas (\pm 90% de formas) contendo $2,0 \times 10^7$ formas de tripo/ml e $5,0 \times 10^8$ formas de amast./ml. Após a separação, os parasitas foram sonicados e suas rupturas foram controladas através da análise microscópica. Estas aliquotas foram preservadas a -20°C . Os extratos solúveis apresentaram atividades enzimáticas sobre extratos sintéticos tipo BANA e AFNE.

O teor proteico dos extratos solúveis foi dosado empregando-se o método de Lowry Modif. (Hartree, 1972) e os resultados obtidos se encontram no quadro abaixo:

Extratos solúveis	Alíquotas dos extratos	Teor proteico/ μg
E = Epimastigota	1mg	94 $\mu\text{g}/\text{prot.}$
T = Tripomastigota	1ml	344 $\mu\text{g}/\text{prot.}$
A = Amastigota	1ml	344 $\mu\text{g}/\text{prot.}$

4. IMUNESSOROS:

4.1 - Soro de rato anti-Fc de IgE de camundongo:

Para estudar a concentração de IgE totais ao nível da superfície dos mastócitos foi utilizado soro de rato anti-Fc_ε de camundongo em uma diluição final 1/3.000, sendo utilizado como um controle técnico das reações anafiláticas ativas.

Este imunessoro foi especialmente doado por Annie Prouvost-Alvarez (Instituto Pasteur - Paris), sendo obtido em ratos imunizados com sucessivas injeções intra-peritoneais de 1.3 µg de IgE monoclonal anti-DNP (Liu et alii, 1980) e absorvido para obter anti-Fc. As análises prévias, frente a mastócitos de camundongos normais deram índices de degranulação em torno de 40% para diluições de 1/5.000 (utilizando-se da reação anafilática ativa de mastócitos "in vitro").

4.2 - Soro de camundongo anti-ovalbumina:

-Obtenção de IgE e IgG1-

O soro de camundongo contendo anticorpos da classe IgE e IgG1 anti-ovalbumina foi obtido no departamento, utilizando-se o esquema de imunização em camundongo Swiss 55, isogênico (College de France), através de esquema de imunização, segundo recomendação de Annie-Prouvost Alvarez - (comunicação pessoal).

Os camundongos foram hiperimunizados com doses de 10 ug de ovalbumina (Flein-Bochenica Heidelberg - 5x cristalizado Sewa), adsorvida em 1mg de gel de Hidroxido de alumínio [Al(OH)₃] por animal, em via subcutânea.

Após 14 dias da dose imunizante inicial, foi administrado um reforço do imunógeno, nas mesmas condições, e repetidas em um período equivalente de 1 mes. Os animais foram sangrados em períodos variáveis, por punções do plexo retro-orbital, e o soro coletado foi estocado em aliquotas a -20 C. Os títulos dos imunossoros foram obtidos através das reações de anafilaxia cutânea passiva (PCA) descrita por Ovary e modificada por Mota, I.e Wong (Ovary, 1952; Mota e Wong, 1969).

Os imunossoros destinados à análise de IgG1 foram aquecidos a 56°C durante 4 horas antes de utilizados, obtendo-se reações de PCA em título de 1/1.000 para IgE e 1/10.000 para IgG1.

5. PREPARO DO EXTRATO DE CÉLULA HELA:

Com a finalidade de servirem como controle dos extratos de tripo e amastigota, foram preparados extratos de cultura de células Hela, contendo em média $4,0 \times 10^5$ células/ml, as quais foram sonicadas e submetidas a análise do teor protéico, tendo sido verificado a presença de atividades enzimáticas segundo as mesmas técnicas já descritas anteriormente. Os extratos foram preservados a -20°C.

6. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANAFILÁTICOS ATRAVÉS DA REACÇÃO ANAFILÁTICA "IN VITRO" DE MASTÓCITOS PERITONEAIS.

Obtensão de Mastócitos Peritoneais

Obteve-se mastócitos da cavidade peritoneal de camundongos CBA/J e C57B1/10, infectados com *T.cruzi* nos dias 10, 15 e 20 após a infecção e em camundongos normais considerados como o dia zero. Mastócitos peritoneais de camundongos Swiss normais foram utilizados para análises de IgE e IgG1 séricas das linhagens CBA/J e C57B1/10.

Utilizaram-se grupos de 10 animais por experimento; os quais foram sacrificados com éter sulfúrico.

Nos camundongos normais ou infectados foram inoculados intraperitonealmente 2ml de meio RPMI - 1640 (Flow, Lab.England) com glutamina, sem antibiótico e sem bicarbonato de sódio, tamponado com HEPES (Sigma-USA) 10mM/ml em pH 6.9. Ao serem inoculados com o meio RPMI, os camundongos receberam uma leve massagem abdominal, após o qual o meio (\pm 1,5ml) foi retirado contendo células da cavidade peritoneal.

As suspensões celulares foram lavadas duas vezes com o meio RPMI e centrifugadas durante 10 minutos a 1.500 rpm à temperatura ambiente. O pool de células foi ressuspensão no mesmo meio, contendo em geral o correspondente entre 2×10^3 e 5×10^5 mastócitos por camundongo adulto, que representam de 4 a 5% da população total das células peritoneais.

Para análise da IgE sérica foi acrescentado ao meio à partir desta etapa, garamicina (0,04 mg/ml) e bicarbonato de sódio a 0.1% em concentração final. Todo o procedimento técnico para a análise de IgE sérica foi feito em condições estéreis sob fluxo laminar.

6.1 - Reação Anafilática Ativa de Mastócitos Peritoneais "In Vitro".

A reação anafilática ativa foi o método utilizado para verificação da imunoglobulina IgE através da degranulação de mastócitos, sensibilizados "in vivo", em camundongos infectados por T.cruzi.

Foram realizados lavados peritoneais em lotes de camundongos CBA/J e C57B1/10, nos dias 10, 15 e 20 após a inoculação. As suspensões celulares contendo 2×10^6 células/ml foram distribuídas em placas de cultura de tecido (Cluster Castar - USA - 24 Wells), no volume de 250 ul/poco e submetida a B.M.a 37°C por 10 minutos, para estabilização do sistema.

Indução da Degranulação

Com a finalidade de induzir a degranulação dos mastócitos, foram adicionados às suspensões celulares, um total de 10 ug de proteína/10 ul por poço, correspondentes aos seguintes antígenos: epimastigota, tripomastigota e amastigota.

Para a solução controle adicionou-se a mesma concentração de proteína de extrato de célula Hela. Adicionou-se também 10 ul de soro anti-Fc ϵ de camundongo a todas as suspensões celulares do testemunho positivo em análise. Foi estabelecido um volume final de 300 ul a cada solução. Os sistemas foram incubados em B.M. a 37°C durante 10 minutos com uma leve agitação.

Evidência da Degranulação

Para evidenciar a degranulação, os mastócitos peritoneais foram corados especificamente com Azul de Orto, toluidina 0.1% (solução aquosa), que foi adicionado ao sistema em volume de 30 ul à temperatura ambiente, de acordo com a fórmula seguinte:

- 0.1% de Azul de Orto-toluidina (Merck)
- 10% de Formoldeido a 40%
- 50% de Alcool Etílico
- 1% de Ácido Acético

Contagem dos Mastócitos Degranulados:

Os pcos de reação contendo as suspensões celulares foram examinados ao microscópio invertido (Zeiss) onde foram contados os mastócitos normais e degranulados. Foi calculada a percentagem de degranulação após estas células terem atingido a coloração metacromática, que as diferenciam dos demais tipos celulares. Contou-se um mínimo de 100 e um máximo de 300 mastócitos por exame.

A percentagem de degranulação espontânea, era no máximo 10% de degranulação dentro dos padrões normais técnicos. Estimou-se a degranulação espontânea através das leituras dos testemunhos negativos.

6.2 - Reação Anafilática Passiva de Mastócitos Peritoneais "in vitro".

Para analisar as imunoglobulinas anafiláticas, presentes no soro de animais infectados, e com especificidade à antígenos de *T.cruzi*, foi utilizada a reação anafilática passiva "in vitro".

6.2.1 - Estudo da Produção da IgE em Soro de Camundongos Infectados:

Obtenção de mastócitos peritoneais normais:

Todo o procedimento experimental foi feito sob condições estéreis, em fluxo laminar.

Um grupo de 10 camundongos Swiss-55 normais, fêmeas, foram sacrificados com éter sulfúrico e após terem sido imersos em solução alcoólica 70%, foram inoculados na cavidade peritoneal 2ml de meio RPMI-1640 contendo glutamina e tamponado com solução de HEPES 10mM/ml, numa concentração final de 0,5%, pH 6,9.

As suspensões de células recolhidas da cavidade peritoneal foram lavadas duas vezes em meio RPMI e centrifugadas a 1.500 rpm, durante 10 minutos. A seguir as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 contendo glutamina e garamicina (0,04 mg/ml), e bicarbonato de sódio, num pH 6,9. As suspensões de células foram distribuídas em alíquotas de 250 ul em microtubos.

Sensibilização dos Mastócitos:

Sobre as suspensões celulares foram adicionados 10 ul dos soros anti-T.cruzi, provenientes das linhagens CBA/J e C57B1/10, referentes aos dias 10, 15, 20 de infecção e soros dos animais normais referentes ao dia zero. Foram adicionados 10 ul de soro anti-ovalbumina, sobre suspensões de células, que corresponderam aos testemunhos positivos. Após leve agitação, as amostras foram levadas a uma estufa de incubação a 37° C com uma atmosfera de 10% de CO₂, por um período de 4 a 5 horas.

Indução da Degranulação:

Após a incubação as suspensões de células foram lavadas em meio RPMI 1640, livre de bicarbonato e antibiótico e tamponado com HEPES

10mM, numa concentração final de 0,5%, pH 6,9. As células foram então distribuídas em placas de cultura de tecido e mantidas durante 15 minutos a 37°C em B.M., para estabilização da temperatura.

A reação de degranulação foi desencadeada pela adição de 10 ul de antígenos das formas de *T.cruzi* contendo 10 ug de proteína total. Ao testemunho positivo adicionou-se 10 ul de solução de ovalbumina contendo 10 ug proteína total. Adicionou-se 10 ug de proteína contidos em 10 ul de extrato de Hela, para os testemunhos negativos da cultura.

As placas de cultura contendo as células, soros e os respectivos antígenos, foram incubadas a 37°C em B.M., durante 20 minutos e a evidência da degranulação, seguida da contagem dos mastócitos degranulados e normais, segundo descrição anterior.

6.2.2 - Estudo da Produção da IgG1 em Soro de Camundongos

Infectados:

Para esta análise foram obtidos mastócitos peritoneais de camundongos normais, Swiss 55, conforme descrito anteriormente (item 6).

Obtensão de Imune-Complexos:

Os imune-complexos foram preparados adicionando-se 10 ul de soro anti-*T.cruzi*, previamente aquecidos, ou soro anti-ovalbumina, e 10 ug de proteína de antígeno correspondendo a um ligeiro excesso. Es-

ta proporção tem como modelo o padrão clássico de reação utilizado pelo sistema Ovalbumina (Prouvost-Danon et alii, 1968). Esta solução foi colocada em B.M. a 37°C durante 3 minutos. A mistura foi mantida a 37°C por mais um período de 3 minutos, quando se adicionou 10 µl de soro anti-T.cruzi ao testemunho positivo. Os imunesoros tiveram uma diluição final de 1/3000.

Indução da Degranulação:

Para que ocorresse a reação anafilática foram logo após adicionados a cada experimento, alíquotas de células peritoneais de Swiss normais, permanecendo em contato durante um período de 3 minutos em B.M. a 37°C. Terminado este período a reação foi interrompida com um abaixamento da temperatura para 0°C, durante 10 minutos.

Para evidenciar os mastócitos degranulados ou não, e efetuar as contagens dos degranulados e normais, foi empregada a técnica descrita no item (6.1).

7. EXAME DO MESENTÉRIO

Para acompanhar a participação do mastócito no processo inflamatório desenvolvido no mesentério durante a infecção experimental por

T.cruzi. foram feitas análises histológicas do mesmo, colhendo-se o material do seguinte modo:

Sacrifício do animal com éter, abertura da cavidade abdominal e retirado "in totum" do mesentério, o qual era lavado em solução salina.

Estes animais correspondiam a camundongos das linhagens CBA/J e C57B1/10, sacrificados nos dias 10, 15 e 20 após a infecção e o animal normal correspondendo ao dia zero.

Após lavagem, os mesentérios foram fixados em formol a 10% tamponado em pH 7,2 por um período de 12 horas.

Após este tempo, o mesentério foi tratado em xilol, por um período de 5 minutos e em seguida passado por uma série de alcoóis de graus diferentes e retornados novamente para a solução de xilol.

Os mesentérios foram colocados em imersão em solução de Azul de Orto-toluidina a 0,1% em um pH 4,6 durante 1 minuto.

Fragmentos de mesentério foram incluídos em parafina, cortados em 5 μ e corados em hematoxilina-eosina, para verificar presença de parasitas.

Os cortes foram colocados em montagens definitivas em Bálsamo do Canadá.

7.1 - Quantificação dos mastócitos do mesentério de camundongos normais e infectados por I.cruzi.

7.1.1 - Quantificação de Mastócitos Situados no Tecido Conectivo Peri-Vascular:

Os mastócitos foram contados em 20 campos diferentes ao longo do tecido peri-vascular em grupos de 6 animais para cada dia de infecção, correspondendo a uma área total de 16mm^2 /por animal. Foram considerados degranulados apenas os correspondentes a um ponto máximo de degranulação, quando restou quase que somente o núcleo íntegro da célula

7.1.2 - Quantificação de Mastócitos Situados no Tecido Conectivo Inter-vascular:

Na região do tecido inter-vascular do mesentério, foi contada a população de mastócito nos camundongos CBA/J e C57Bl/10, em um total de 100 mastócitos, e assim determinada a percentagem de degranulação.

7.2 - Estudo do Infiltrado Inflamatório no Tecido Conectivo Peri-vascular, e no Tecido Conectivo Inter-vascular.

Foi examinada ao longo da infecção, a cinética da evolução dos infiltrados celulares no mesentério das duas linhagens de camundongos

CBA/J e C57B1/10 , através da observação de áreas do tecido peri-vascular e tecido conjuntivo inter-vascular em cortes corados pelo Azul de Orto-toluidina a 0,1% em pH 4,6.

Foram atribuídos valores estimativos para a presença de infiltrados celulares nos tecidos, os quais representaram variações limites de zero a 4 cruces, conforme descrito a seguir:

(-)	ausente
(+)	moderado
(++)	alterado
(+++)	aumentado
(++++)	intenso

Foram utilizados um total de seis animais diferentes para cada dia de infecção.

8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram Utilizadas análises comparativas entre os dados de animais de resistência moderada e animais susceptíveis a infecção para o estudo da produção dos anticorpos anafiláticos, através da aplicação da análise do quiquadrado (χ^2) corrigido para a continuidade pela correcção de Yates. Sendo $n=400$ e o número de observações de cada grupo igual a 200.

$$\chi^2_{\text{crítico}} = 3,84 \text{ para } p = 0,05$$

As análises de cada experimento isoladamente foram feitas através de cálculos dos desvios padrões (Lison. - 1968).

RESULTADOS

1 - Produção de IgE total e específica para antígenos de T.cruzi, detectada ao nível da superfície de mastócitos, e sua comparação entre linhagens de camundongos:

A presença de IgE na superfície de mastócitos, foi estimada com base nos dados da percentagem de degranulação de mastócitos peritoneais de camundongos normais e infectados, tendo sido desencadeada a degranulação "in vitro" através da presença de antígenos isolados de formas evolutivas de T.cruzi (Figuras 1, 2 e 3 - pgs 38,39).

Quando observados os níveis percentuais de degranulação dos mastócitos dos testemunhos negativos espontâneo) ou em presença de antígenos de célula Hela não infectadas, constatou-se que estas degranulações atingiram índices básicos mínimos, considerados portanto como espontâneos. Esta observação foi verificada nas duas linhagens de camundongos utilizadas. A degranulação espontânea apresentou um limite de 10% de exocitose nas linhagens de camundongos (Tabela 1).

Para caracterizar as imunoglobulinas do isotipo IgE, localizadas nas superfície dos mastócitos peritoneais normais e infectados, sensibilizados "in vivo", foi utilizado o soro de rato anti-Fc de IgE de camundongo.

Foi observado que de uma maneira geral os mastócitos dos animais normais e infectados, quando incubados com soro anti-Fc apresentaram uma diminuição no índice de exocitose ao longo da infecção (Figura 3). Isto veio sugerir a possibilidade de haver uma supressão para a síntese de IgE em geral, para os animais que permaneceram normais no ambiente do biotério, e para os animais infectados por T.cruzi, os quais apresentaram em geral fenômeno com mais intensidade. (Tabela I) Entretanto-

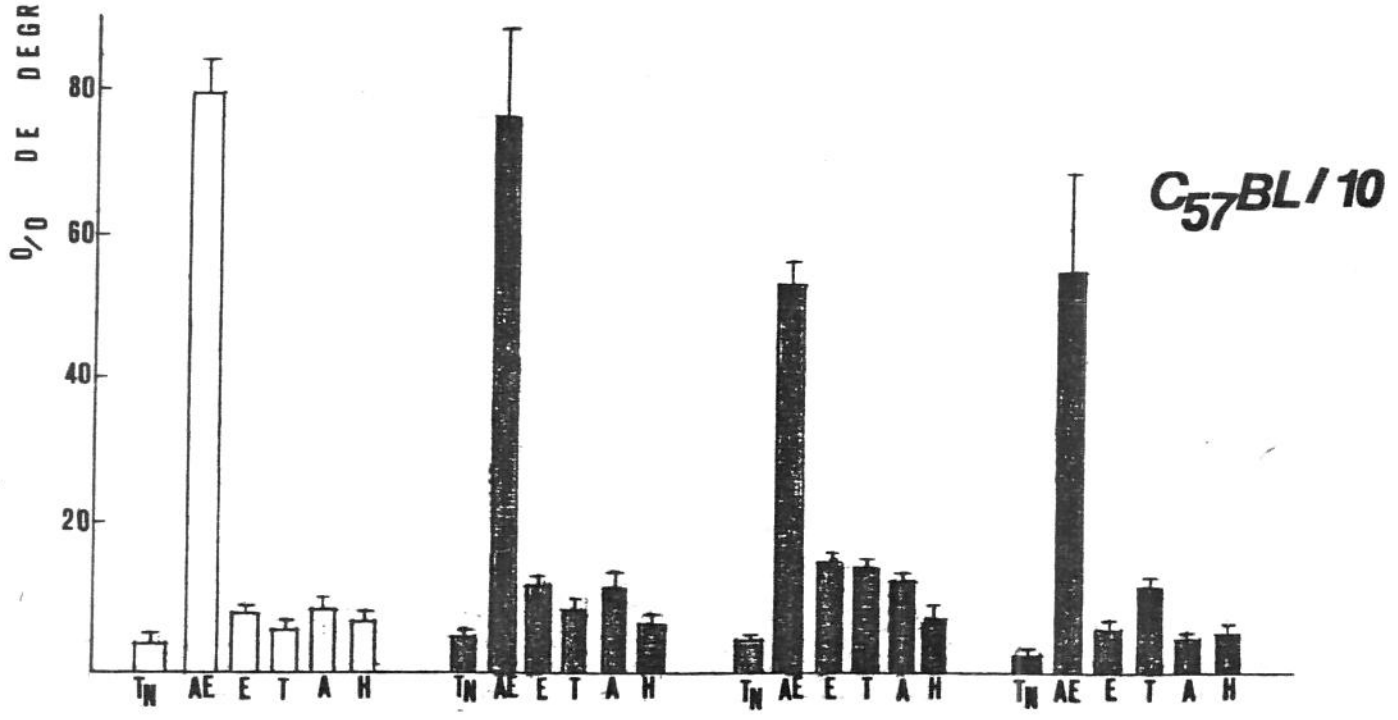
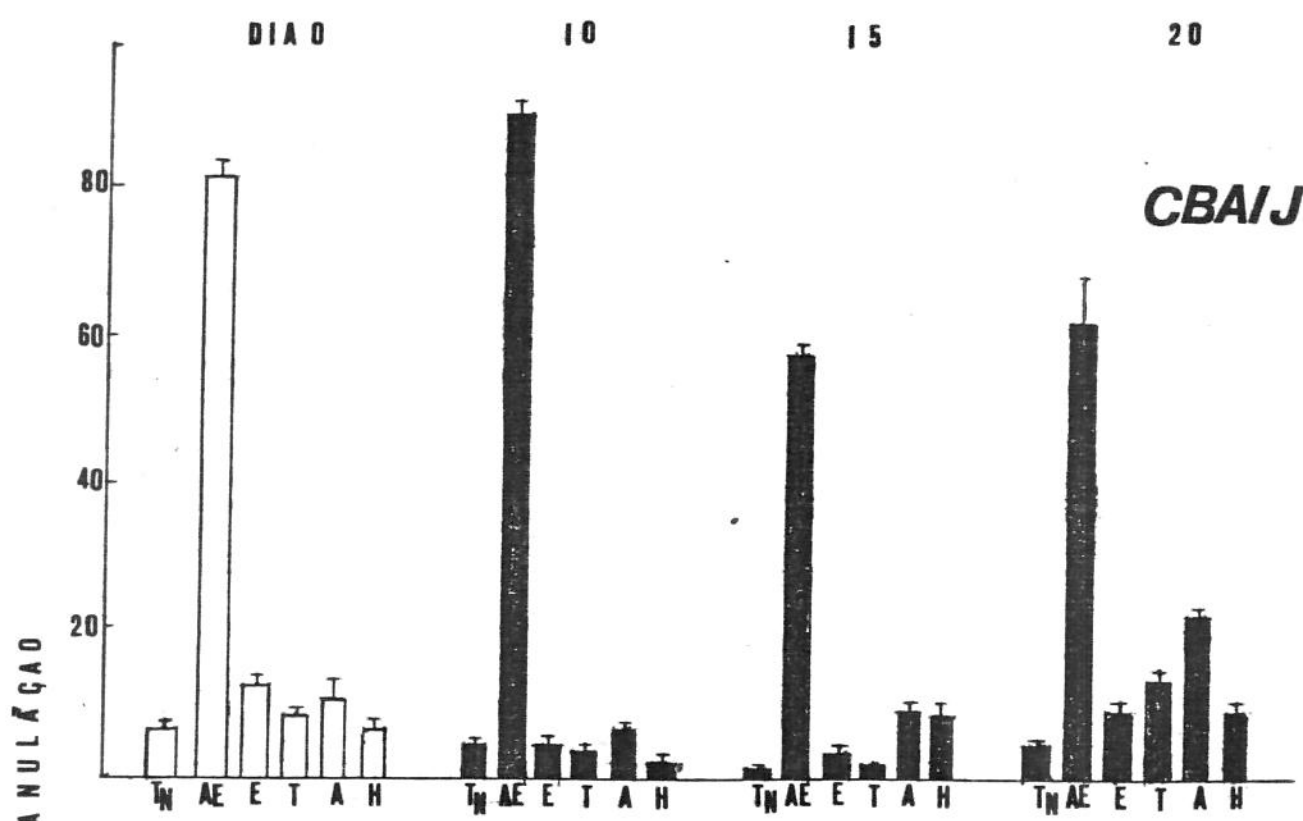




FIGURA 1: **Mastócito peritoneal normal** de camundongo CBA/J em meio RPMI-1940. Célula com superfície lisa e íntegra. Coloração: azul de Orto-toluidina. (500 x aumentado)

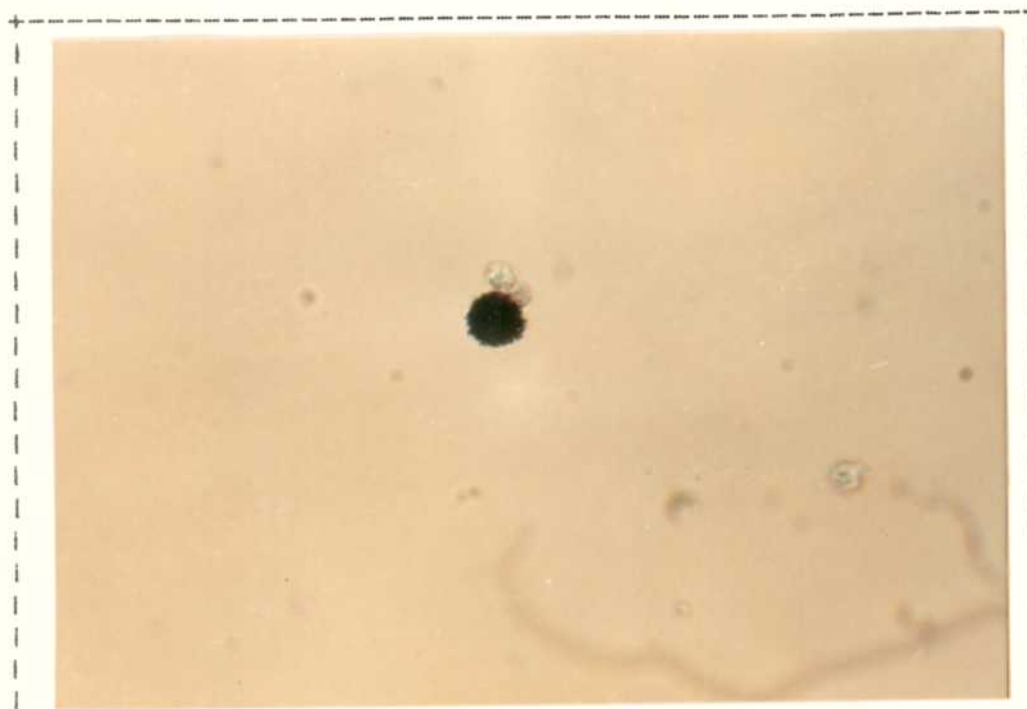


FIGURA 2: **Mastócito peritoneal degranulado** de camundongo CBA/J, em meio RPMI-1940. Célula com a superfície irregular. Coloração: Azul de Orto-Toluidina. (500 x aumentado).

Figura 3 - Reação anafilática ativa de mastócitos "in vitro" à nível de IgE de superfície.

Legenda -

- - Média aritmética de mastócitos de animais normais obtidos concomitantemente aos animais dos dias 10, 15, 20, após a infecção.
- - Mastócitos de animais infectados.
- TN - Testemunho negativo (espontâneo).
- AE - Testemunho positivo (anti-Fc de IgE)
- E - Extrato solúvel de epimastigota.
- T - Extrato solúvel de tripamastigota.
- A - Extrato solúvel de amastigota.
- H - Extrato solúvel de célula Hela.

*Cada barra representa a média aritmética \pm desvio padrão de 12 animais.

TABELA 1: Percentagem de degranulação de mastócitos de camundongos normais e infectados com T.cruzi sensibilizados "in vivo" com IgE.

Dias de * infecção	Mastócitos das linh. de camu.	Test.neg. (espont.)	% de Degranulação				
			Anti-IgE **	E	T	A	H
10	CBA N	8	88	13	9	7	4
	CBA INF	5	91	5	4	7	2
15	CBA N	7	77	16	10	18	11
	CBA INF	2	58	4	2	9	9
20	CBA N	6	74	9	8	8	6
	CBA INF	5	62	9	13	22	9
10	C57B1 N	3	78	6	3	7	4
	C57B1 INF	5	77	12	8	12	7
15	C57B1 N	3	75	8	6	7	6
	C57B1 INF	5	54	16	15	13	8
20	C57B1 N	6	96	11	10	13	11
	C57B1 INF	3	56	6	12	5	6

* - Fase aguda da infecção

** - (Anti-IgE) - sistema anti-Fc de IgE de camundongo

a - Extrato solúvel de epimastigota

b - Extrato solúvel de tripomastigota

c - Extrato solúvel de amastigota

d - Extrato solúvel de célula Hela

Controles = testemunho negativo - (espontâneo)

testemunho positivo - (Anti-Fc IgE)

- Valores representativos da média aritmética 12 animais, de três experimentos -

to, quando se calculou a média das exocitoses desencadeadas por soro anti-Fc dos mastócitos de animais normais, ou seja a média dos dias 10-15-20 normais, verificou-se que o índice de exocitose médio das duas linhagens se equivaliam. Isto veio sugerir que em geral as duas linhagens apresentavam um número semelhante de IgE na superfície dos mastócitos peritoneais normais (Figura 3). Observando as reações com anti-Fe₂ nesta figura, verificamos que o CBA/J no início da infecção 10º dia apresentou um leve aumento de exocitose, para em seguida ter uma acentuada diminuição no 15º dia mantendo em geral neste nível de exocitose até o 20º dia. A linhagem C57B1/10 apresentou um declínio de exocitose no 10º dia e até o 15º dia, semelhantemente ao CBA/J quando foi mantido este nível de exocitose até o 20º dia.

Foram observados, que os mastócitos de animais normais e infectados, quando incubados com antígenos das formas evolutivas de *T.cruzi* apresentaram em geral índices de exocitose baixos, com exceção do CBA/J no 20º dia frente a antígenos de amastigota. Também a linhagem do C57B1/10 apresentou no 15º dia um leve aumento da exocitose para antígenos de epimastigota e tripomastigota.(Figura 3).

Com o objetivo de analisar as diferenças das respostas entre os animais normais e infectados, e as diferenças das respostas entre as duas linhagens de camundongos estudadas, foi realizado um estudo comparativo entre os índices percentuais de degranulação dos mastócitos. Conforme a tabela 2 - I, em geral não houve diferenças em relação a exocitose espontânea entre os animais normais e infectados.

Quando os mastócitos dos animais normais foram comparados com os animais infectados nos dias equivalentes, e tratados com anti-IgE foi observado que existe uma diferença significativa no 15º dia nas duas linhagens, e no 20º dia essa diferença foi significativa somente para linhagem C57B1/10.

TABELA 2:

I: Dados comparativos da percentagem de degranulação de mastócitos de camundongos normais/infectados sensibilizados "in vivo" com IgE.

Dias de* infeccção	Mastócitos de linhagens camundongos	Test.neg (espont)	% de Degranulação					
			Anti- IgE	E E	E T	E A	E H	
10	CBAN - INF	8-5	88-91	(13-5)	9-4	7-7	4-2	
15	CBAN - INF	(7-2)	(77-58)	(16-4)	(10-2)	(18-9)	11-9	
20	CBAN - INF	6-5	74-62	9-9	8-13	(8-22)	6-9	
10	C57B1N-INF	3-5	78-77	6-12	3-8	7-12	4-7	
15	C57B1N-INF	3-5	(75-54)	(8-16)	(6-15)	7-13	6-8	
20	C57B1N-INF	6-3	(96-56)	11-6	10-12	(13-5)	11-6	

II: Dados comparativos da percentagem de degranulação de mastócitos de camundongos normais e infectados sensibilizados "in vivo" com IgE entre as linhagens CBA/S e C57BL/10.

Dias de* infeccção	Mastócitos de linhagens camundongos	Test.neg. (espont)	% de Degranulação					
			Anti- IgE **	E E	E T	E A	E H	
10	CBAN -C57B1N	(8-3)	(88-78)	(13-6)	(9-3)	7-7	4-4	
	" INF- " INF	5-5	(91-77)	(5-12)	(4-8)	7-12	(2-7)	
15	CBAN -C57B1N	7-3	77-75	(16-8)	10-6	(18-7)	11-6	
	" INF- " INF	2-5	58-54	(4-6)	(2-15)	9-13	9-8	
20	CBAN -C57B1N	6-6	(74-96)	9-11	8-10	8-13	6-11	
	" INF- " INF	5-3	62-56	9-6	3-12	(22-5)	9-6	

() - Significativos para $p = 0,05$

* - Fase aguda da infeccção

** - (anti-IgE) - sistema anti-Fc IgE de camundongo

a - Extrato solúvel epimastigotas

b - Extrato solúvel tripomastigota

c - Extrato solúvel amastigota

d - Extrato solúvel células Hela

Controles = Testemunho negativo (espontâneo)

Testemunho positivo (anti-Fc IgE)

- Valores representativos da média aritmetica de 12 animais, de três experimentos.

Com relação a exocitose frente a antígenos de *T.cruzi*, observaram-se diferenças, que estão distribuídas entre os vários antígenos, e que são consequências de fenômenos diversos. Podemos observar o CBA/J no 15º dia apresentando diferenças entre animal normal e infectado através de exocitose inespecífica nos mastócitos normais, entretanto o C57B1/10 neste mesmo dia apresentou uma diferença, provavelmente por uma exocitose específica nos mastócitos de animais infectados. Possivelmente, o CBA/J no dia 20 apresente uma diferença entre o animal normal/infectado relativo a uma exocitose específica (22%).

Quando se comparou as duas linhagens foi observada uma diferença significativa de exocitose, obtida através da presença de soro anti-Fc, somente entre os animais normais no 10º e 20º dia e entre os infectados somente no 10º dia. (Tabela 2-II). A diferença de exocitose inespecífica para antígenos de *T.cruzi* entre as duas linhagens foi apresentada nos animais normais do 15º dia, e uma diferença de exocitose específica foi verificada em animais infectados no 15º e no 20º dia.

2 - Produção de IgE específica para antígenos de *T.cruzi* ao nível de soro de animais infectados, e a sua comparação entre as linhagens de camundongos.

Para avaliar a produção da imunoglobulinas do isotipo E presentes no soro de animais infectados, foram utilizadas reações de degranulação de mastócitos normais, sensibilizados passivamente com IgE presentes no soro imune. Com o objetivo de adquirir um índice passivo de sensibilização mais efetivo para IgE, foi utilizado o recurso técnico de uma cultura curta de mastócitos (Daeron et alii, 1980), com modificações do período de sensibilização para 4 a 5 horas.

Foram obtidos índices de degranulação de mastócitos normais, sensibilizados "in vitro" com IgE presentes no soro de camundongos CBA/J e C57B1/10, e desencadeada a reação em presença de antígenos das formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de *T.cruzi*.


Os testemunhos negativos (espontâneos) e os controles para extrato de célula Hela, mostraram resultados de exocitose abaixo dos padrões limites exigidos pela técnica.(Figura 4)

Nas análises para o testemunho positivo (Sistema Ova-anti-ova), obtivemos um índice máximo de exocitose dos mastócitos no valor de 35% em presença de soro de CBA/J normal, e de 27% em presença de soro de C57B1/10 normal. Entretanto, após a incubação com soros obtidos ao longo da infecção, esta exocitose foi sensivelmente diminuída em ambas as linhagens de camundongos analisadas (Tabela 3).

Quando mastócitos peritoneais de camundongos normais foram adicionados antígenos de *T.cruzi*, em presença de soros normais durante 4-5 hrs, foram observados diminuições nos índices percentuais de degranulação nas duas linhagens de camundongos (Tabela 3).

Figura 4 - Reação anafilática passiva in vitro* de mastócitos sensibilizados por IgE sérica.

Legenda -

 - Soro de camundongo normal.

 - Soro de camundongo infectado.

TN - Testemunho negativo (espontâneo)

AE - Testemunho positivo (Sistema.Ova-anti-Ova).

E - Extrato solúvel de epimastigota.

T - Extrato solúvel de tripomastigota.

A - Extrato solúvel de amastigota.

H - Extrato solúvel de célula Hela.

*Cada barra representa a média aritmética de três partidas diferentes de animais.

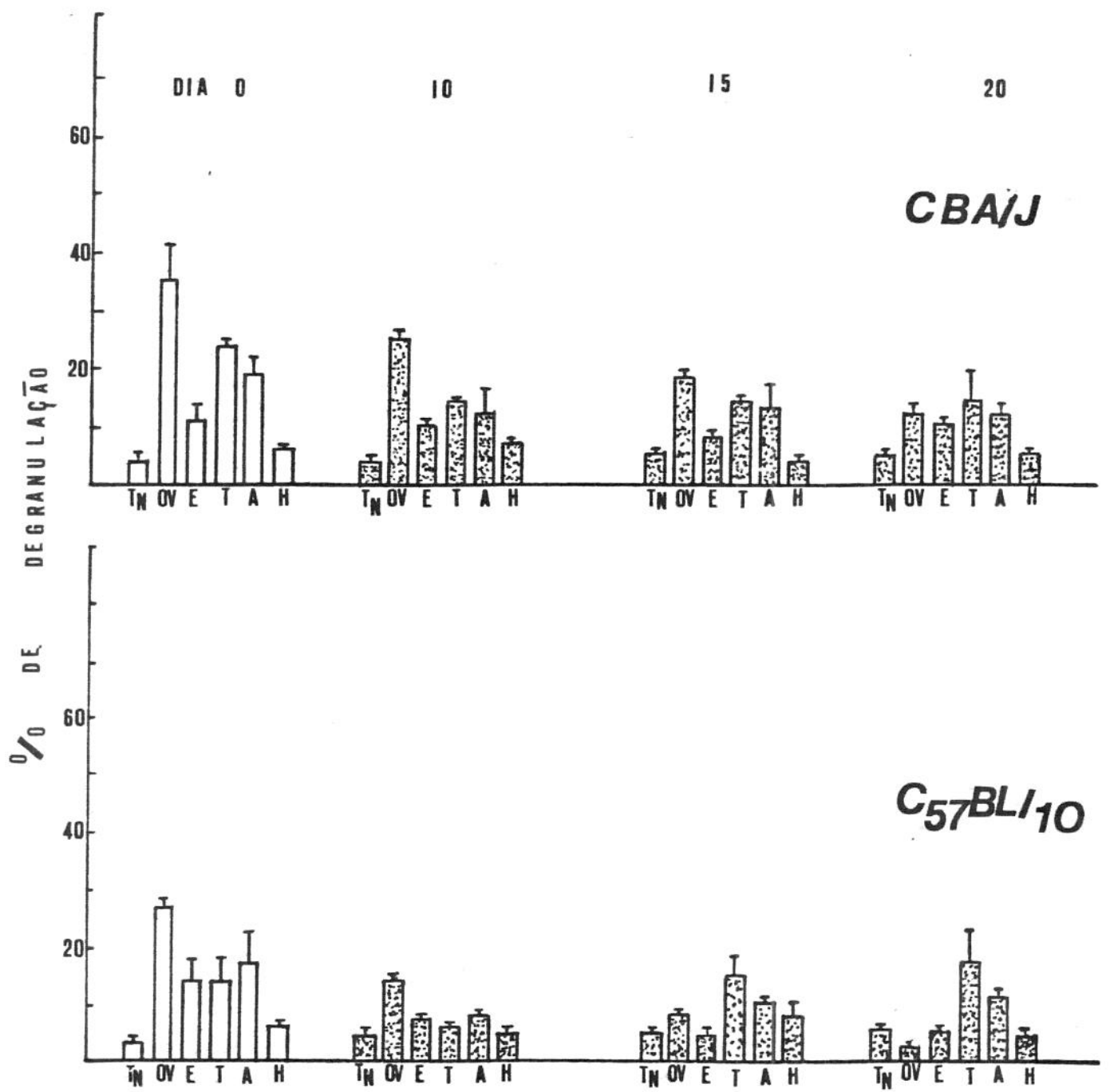


TABELA 3: Percentagem de degranulação de mastócitos de camundongos normais sensibilizados passivamente com IgE específica presente em soro de camundongos infectados por T.cruzi na fase aguda da infecção.

Soro de linh.Camu.	Dias de* (infec)	Test.Neg. (espont)	Test.Posit. (Ova-anti-Ova)	% de Degranulação				
				E E	E T	E A	E H	
CBA/J	0	4	35	11	24	19	6	
CBA/J	10	4	25	10	14	12	7	
CBA/J	15	5	18	8	14	13	4	
CBA/J	20	5	12	10	14	12	5	
C57B1/10	0	3	27	14	14	17	6	
C57B1/10	10	5	14	7	6	8	5	
C57B1/10	15	5	8	4	15	10	8	
C57B1/10	20	5	2	5	17	11	4	

* - Correspondente ao período da fase aguda da infecção.

a - Extrato solúvel epimastigota.

b - Extrato solúvel tripomastigota.

c - Extrato solúvel amastigota.

d - Extrato solúvel célula Hela.

Controles : Testemunhos negativo (espontâneo)

Testemunhos positivo (Sistema Ova-anti-Ova)

- Valores representativos da média aritmética de 12 animais, de três experimentos.

Esta exocitose foi em geral mais pronunciada no CBA/J em presença de soros normais, a qual diminuiu em presença de soros obtidos no 10º dia, mantendo entretanto este índice ao longo da infecção. Também, foi observado uma diminuição de exocitose nos demais dias de infecção na linhagem C57B1/10, principalmente para antígenos de epimastigota e amastigota. O C57B1/10 após o 15º dia de infecção apresentou uma exocitose aumentada frente a antígenos de tripomastigota indicando a possibilidade de haver uma resposta específica (TABELA 3).

Os índices de exocitose de mastócitos normais sensibilizados "in vitro" com soro de animais normais foram correlacionados com os índices de exocitose de mastócitos normais sensibilizados com soros de animais com diferentes dias de infecção. Análogamente foram correlacionadas as exocitoses entre as linhagens estudadas (TABELA 4 (I-II)).

A diminuição da exocitose para o sistema (Ova anti-ova) em presença de soros de animais infectados, apresentou-se significativa nas duas linhagens (TABELA 4-I). A significância do fenômeno da exocitose inespecífica de mastócitos normais em presença de antígenos de *T. cruzi*, foi em geral frequente nas duas linhagens. Entretanto, a linhagem do C57B1/10 frente a antígenos de tripomastigota apresentou uma diminuição desta exocitose no 10º dia, a qual passou a aumentar com a evolução da infecção. Foi também observado que a linhagem CBA/J não apresentou índices de exocitose inespecífica para antígenos de epimastigota.

Estes dados foram responsáveis pelas maiores diferenças entre as duas linhagens frente a antígenos de tripomastigota sendo que, em geral o CBA/J apresentou uma exocitose inespecífica maior que o C57B1/10 (TABELA 4-II).

TABELA 4: I- Dados comparativos da percentagem de degranulação de mastócitos normais sensibilizados com IgE presente em soros de camundongos normais versus soro de camundongos infectados com T. cruzi.

Soro de linh.* de camu.	% de Degranulação					
	Test. neg.	Test. posit. (Ova-anti-Ova)	E E	E T	E A	E H
CBAo - CBA10	7-4	(35-25)	11-10	(24-14)	(19-12)	6-7
CBAo - CBA15	7-5	(35-18)	11-8	(24-14)	19-13	6-4
CBAo - CBA20	7-5	(35-12)	11-10	(24-14)	(19-12)	6-5
C57B1o - C57B110	3-5	(27-14)	(14-7)	(14-6)	(17-6)	6-5
C57B1o - C57B115	3-5	(27-8)	(14-4)	14-15	(17-10)	6-8
C57B1o - C57B120	3-5	(27-2)	(14-5)	14-17	(17-11)	6-4

II- Dados comparativos de percentagem de degranulação de mastócitos normais, sensibilizados com IgE presente em soros de camundongos CBA/J versus soro C57B1/10 infectados com T. cruzi.

Soro de linh.* de camu.	% de Degranulação					
	Test. neg.	Test. posit. (Ova-anti-Ova)	E E	E T	E A	E H
CBAo - C57B1o	7-3	35-27	11-14	(24-14)	19-17	6-6
CBA10 - C57B110	4-5	(25-14)	10-7	(14-6)	12-6	7-5
CBA15 - C57B115	5-5	(18-8)	8-4	14-15	13-10	4-8
CBA20 - C57B120	5-5	(12-2)	(10-5)	14-17	12-11	5-4

() - Significativos para $p = 0,05$

* - Correspondente ao período da fase aguda da infecção.

a - Extrato solúvel epimastigota.

b - Extrato solúvel tripomastigota.

c - Extrato solúvel amastigota.

d - Extrato solúvel célula Hela.

Controles = Testemunho negativo (espontâneo)

Testemunho positivo (Sistema Ova-anti-Ova)

- Valores representativos da média aritmética de 12 animais, de três experimentos.

A sensível diminuição da exocitose ao longo da infecção no C57B1/10 frente a antígenos de epimastigota o induziu no 20º dia a uma diferença significativa quando comparado a CBA/J.

Também a tabela 4-II nos mostra que o fenômeno da diminuição a exocitose para o sistema (Ova-anti-Ova) teve uma diferença significativa entre as duas linhagens de camundongos no decorrer da infecção.

3 . Produção de IgG1 específica para antígenos de T.cruzi, ao nível de soro de animais infectados, e a sua comparação entre as linhagens de camundongos:


Com a finalidade de analisar a produção de IgG1 específica para antígenos de T.cruzi foram estudados, através da formação de complexo IgG1/Ags T.cruzi anafilaticamente ativos, os índices de degranulação de mastócitos normais obtidos através das reações anafiláticas passivas reversas "in vitro". Isto foi possível tendo em vista a demonstração prévia, que a intensidade de sensibilização dos mastócitos de camundongo pela IgG1 é maior quando feita diretamente através de Imune-Complexos.

Foram observados que os testemunhos negs (espont) apresentaram índices de exocitose abaixo dos padrões básicos de exocitose espontânea exigidos pela técnica (Figura 5, pg54).

Quando foram analisados os mastócitos de camundongos normais incubados com soro de animais infectados previamente complexados com os antígenos das formas evolutivas de T.cruzi, se observados uma exarcebada evolução da exocitose durante a infecção nas duas linhagens de camundongos estudadas, principalmente para antígenos de amastigota (Figura 5). Entretanto, as alterações de exocitose observadas ocorreram principalmente na linhagem C57B1/10, chegando a valores de 65% de exocitose. (Tabela 5) Surpreendentemente também foram constatados que o C57B1/10 apresentou um índice de exocitose específica mais precoce que o CBA/J, observando-se já no 10º dia de infecção uma resposta elevada para antígenos de amastigota. Entretanto, a maior exocitose apresentada na linhagem CBA/J foi para amastigota no 20º dia em um valor de 38%

Figura 5 - Reação anafilática passiva "in vitro" de mastócitos sensibilizados por imune-complexos (IgG1/antígenos de T.cruzi).

Legenda -

 - Soro de camundongo normal.

 - Soro de camundongo infectado.

TN - Testemunho negativo (espontâneo).

OV - Testemunho positivo (sistema Ova-anti-Ova).

E - Extrato solúvel de epimastigota.

T - Extrato solúvel de tripostigota.

A - Extrato solúvel de amastigota.

H - Extrato solúvel de célula Hela.

*Cada barra representa a média aritmética de três partidas diferentes de animais.

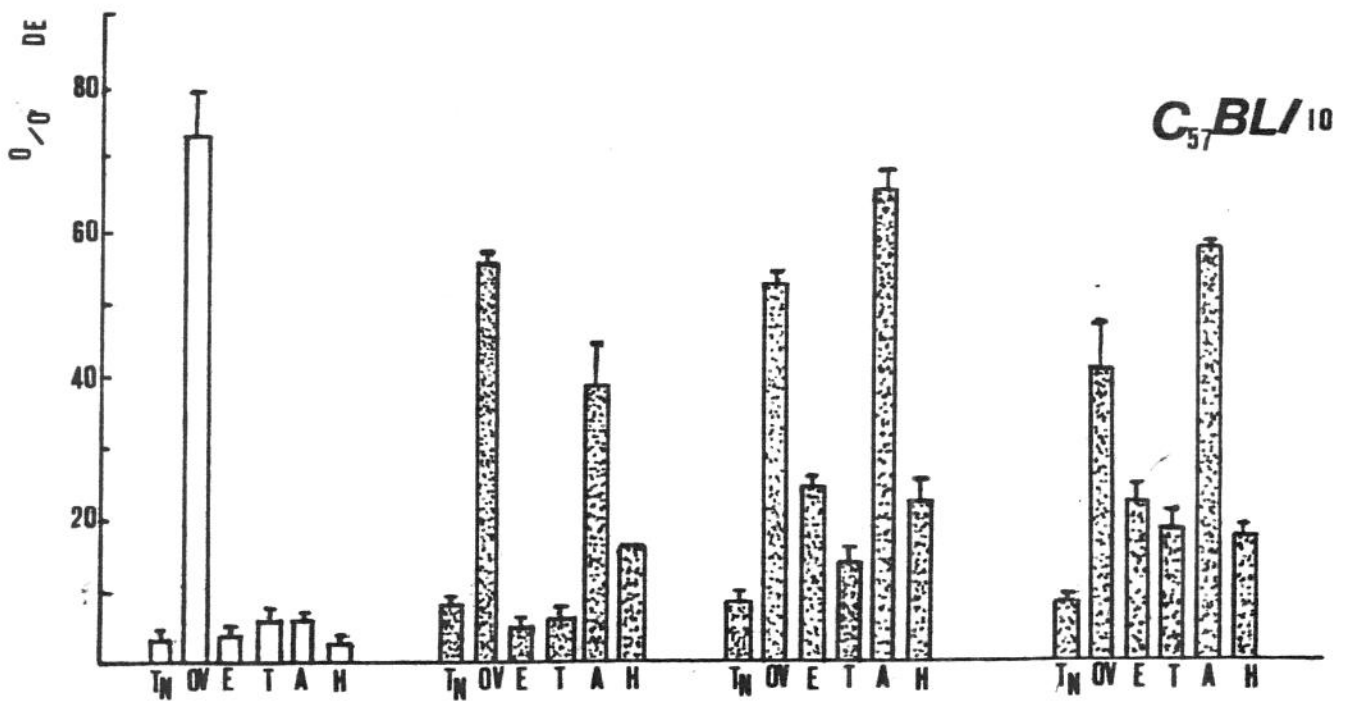
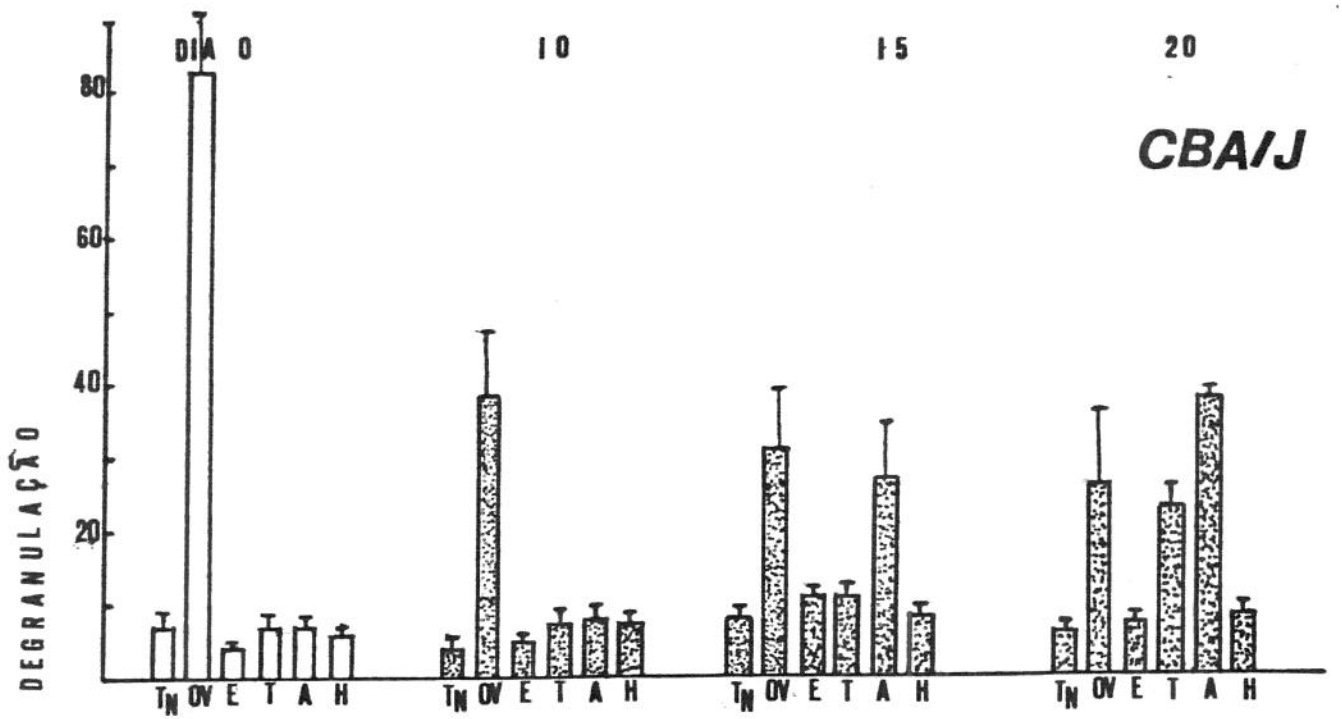


TABELA 5: Percentagem de degranulação de mastócitos de camundongos normais sensibilizados com complexos anafiláticos de IgG1/ antígenos de T.cruzi, de soro de camundongos infectados.

Soro de linhagens	* Caml	Dias de infec	+	% de Degranulação							
				Test neg negat(esp)	Test posit Ova-anti-Ova**	*	E E	E T	E A	E H	
CBA/J		0		7	83		4	7	7		6
CBA/J		10		4	38		5	7	8		7
CBA/J		15		8	31		11	11	27		8
CBA/J		20		6	26		7	23	38		8
C57B1/10		0		3	73		4	6	6		3
C57B1/10		10		8	55		5	6	38		16
C57B1/10		15		8	52		24	14	65		22
C57B1/10		20		8	40		22	18	57		17

+ - Correspondentes ao período da fase aguda da infecção.

* - Aquecidos previamente a 56° C (4hs).

** - Em presença de soro de animal normal (0) e soros infectados dos dias 10-15-20.

a - Extrato solúvel de epimastigota

b - Extrato solúvel de tripomastigota

c - Extrato solúvel de amastigota

d - Extrato solúvel de célula Hela.

Controles = Testemunho negativo (espontâneo)

Testemunho positivo (Sistema Ova-anti-Ova)

- Valores representativos da média aritmética de 12 animais, de três experimentos.

de degranulação. No CBA/J observou-se uma exocitose específica à partir do 15º dia de infecção com valores inferiores, quando comparados aos valores de C57B1/10.

Foi observado também que a linhagem C57B1/10 durante a infecção apresentou índices de exocitose alterados em presença de antígenos de célula Hela normal. (Figura 5)

Quando foram analisados os mastócitos tratados com sistema Ova-Anti-Ova, (testemunho positivo), foi verificado que com a evolução da infecção houve uma sensível diminuição da exocitose destas células. Esta diminuição foi mais pronunciada na linhagem CBA/J. (Figura 5)

Quando confrontados os valores de exocitose entre os animais normais e infectados houve portanto um número maior de diferenças significativas frente a antígenos de amastigota, relacionado certamente a exacerbação da exocitose específica a este antígeno. Também esta diferença ocorreu com mais frequência na linhagem C57B1/10, aparecendo desde o 10º dia de infecção. (Tabela 6-I) Por outro lado, a inibição da exocitose de mastócito para as reações do sistema (Ova-Anti-Ova) apresentaram uma diferença significativa durante a evolução da infecção nas duas linhagens, as quais foram também diferentes quando comparadas entre si. (Tabela 6-II)

Confrontadas portanto as duas linhagens foram observadas que as exocitose específicas para os antígenos de T. cruzi foram diferentes especialmente para amastigota.

As linhagens apresentaram uma diferença de resposta específica entre si para IgG1 a partir do 10º dia de infecção. Em relação aos antígenos de tripomastigota parece não haver diferenças de respostas entre as duas linhagens. Os resultados mostram que à partir do 15º dia houve diferenças significativas nas respostas para epimastigota, e para amas-

TABELA 6: I- Dados comparativos da percentagem de degranulação de mastócitos de camundongos normais, sensibilizados com complexos anafilíticos de IgG1/Ags de T.cruzi em camundongos normais versus camundongos infectados.

		% de Degranulação						
Soro de linhagens de camundongos	*	Test. neg. (esp)	Test.posit.** (Ova-anti-Ova)	E	E	E	E	E
				E	T	A		H
CBAo - CBA10		7-4	(83-38)	4-5	7-7	7-8		6-7
CBAo - CBA15		7-8	(83-31)	(4-11)	7-11	(7-27)		6-8
CBAo - CBA20		7-6	(83-26)	4-7	(7-23)	(7-38)		6-8
C57B1o - C57B110		(3-8)	(73-55)	4-5	6-6	(6-38)		(6-16)
C57B1o - C57B115		(3-8)	(73-52)	(4-24)	(6-14)	(6-65)		(3-22)
C57B1o - C57B120		(3-8)	(73-40)	(4-22)	(6-18)	(6-57)		(3-17)

II- Dados comparativos da percentagem de degranulação de mastócitos de camundongos normais sensibilizados com complexos anafilíticos IgG1/Ags de T.cruzi em camundongos CBA/J versus camundongos C57B1/10 normais e infectados.

		% de Degranulação						
Soro de linhagens de camundongos	*	Test. neg. (esp)	Testem.posit ** (Ova-anti-Ova)	E	E	E	E	E
				E	T	A		H
CBAo - C57B1o		7-3	(83-73)	4-4	7-6	7-6		6-3
CBA10 - C57B110		4-8	(38-55)	5-5	7-6	(8-38)		(7-16)
CBA15 - C57B115		8-8	(31-52)	(11-24)	11-14	(27-65)		(8-22)
CBA20 - C57B120		6-8	(26-40)	(7-22)	23-18	(38-57)		(8-17)

() - Significativos para $p = 0,05$

* - Aquecidos previamente a $56^{\circ}C$ (4hs).

** - Em presença de soro de animal normal (0) e soros infectados dos dias 10-15-20.

a - Extrato solúvel de epimastigota.

b - Extrato solúvel de tripomastigota.

c - Extrato solúvel de amastigota.

d - Extrato solúvel de cél. HELA.

Controles = Testemunho negativo (espontâneo)

Testemunho positivo (Sistema Ova-anti-Ova)

- Valores representativos da média aritmética de 12 animais, de três experimentos.

tigota à partir do 10º dia, devido a uma maior exocitose específica apresentada pelo C57B1/10 (Tabela 6-II).

A exocitose de mastócitos em presença de soro de animal infectado e antígenos de célula Hela apresentou-se diferente entre as duas linhagens em consequência da exocitose inespecífica na linhagem C57B1/10 (Tabela 6-II).

4 - Inibição da degranulação de mastócitos de camundongos infectados e mastócitos normais frente a soro de animais infectados, em presença de antígenos não relacionados a T.cruzi.

Quando os mastócitos peritoneais de animais infectados das linhagens CBA/J e C57B1/10 foram incubados com soro de rato anti-Fc γ de camundongo "in vitro", observou-se que no início da infecção, até o 10º dia não tinham praticamente diferenças de exocitose. Entretanto, à partir deste dia houve uma sensível diminuição da exocitose até o 15º dia de infecção em relação ao testemunho positivo, e mantendo-se dentro deste índice de exocitose até o 20º dia (Figura 6 - A). Esta inibição foi proporcional para as duas linhagens.

Nos mastócitos peritoneais de camundongos normais sensibilizados "in vitro" por IgE anti-ovalbumina, foram observados que quando os mesmos eram tratados pela Ovalbumina em presença de soro de camundongos infectados apresentaram uma inibição da exocitose sensivelmente marcante com a evolução da infecção. Esta inibição anafilática de exocitose do mastócito foi mais acentuada no C57B1/10 passando de 27% de exocitose, frente ao soro normal para 2% de exocitose, frente ao soro infectado do 20º dia. (Figura 6 - B)

Desta mesma maneira, se apresentaram os mastócitos de animais Swiss normais, quando sensibilizados passivamente por Imune-Complexos anafiláticos ativos IgG1/ovalbumina, frente a soro de CBA/J e C57B1/10 infectados por T.cruzi. (Figura 6 - C). O soro do animal CBA/J apresentou no início da infecção um intenso efeito inibitório da exocitose específica de mastócitos sendo que o índice de exocitose teve uma diminuição de 83% para 38%. Durante a evolução da infecção o soro do

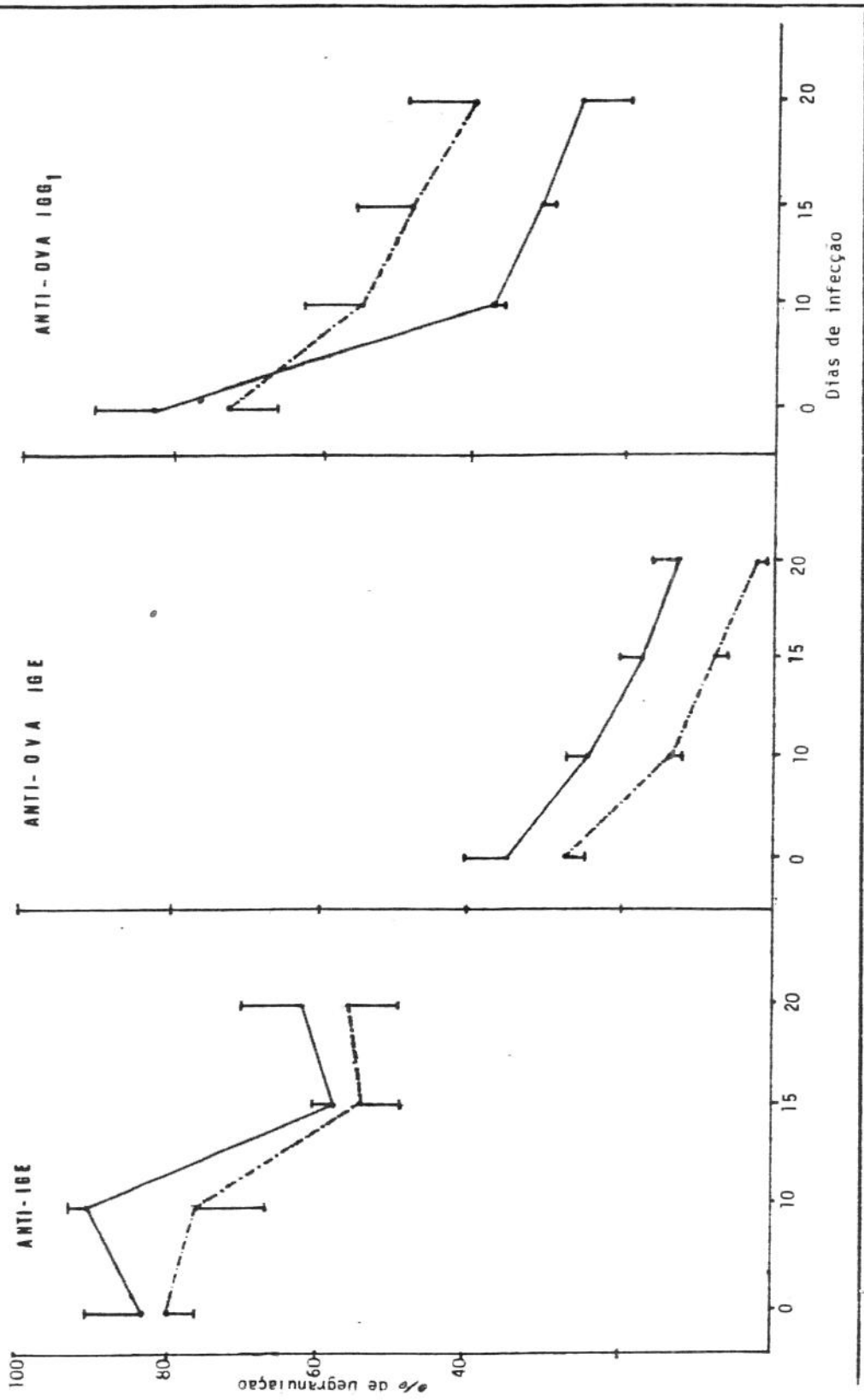
Figura 6 - Efeito da infecção de T.cruzi na exocitose de mastócitos em presença de antígenos não relacionados.

Legenda -

(—) - Células ou soro de CBA/J.

(--) - Células ou soro de C57B1/10.

* Os animais do dia zero correspondem aos animais normais*.



C57B1/10 inibiu a reação de exocitose para o valor de 40% no dia 20. O soro C57B1/10 apresentou uma acentuada inibição da exocitose até o 10º dia, a qual continuou a aumentar de uma forma paralela a inibição do CBA/J até o 20º dia de infecção.

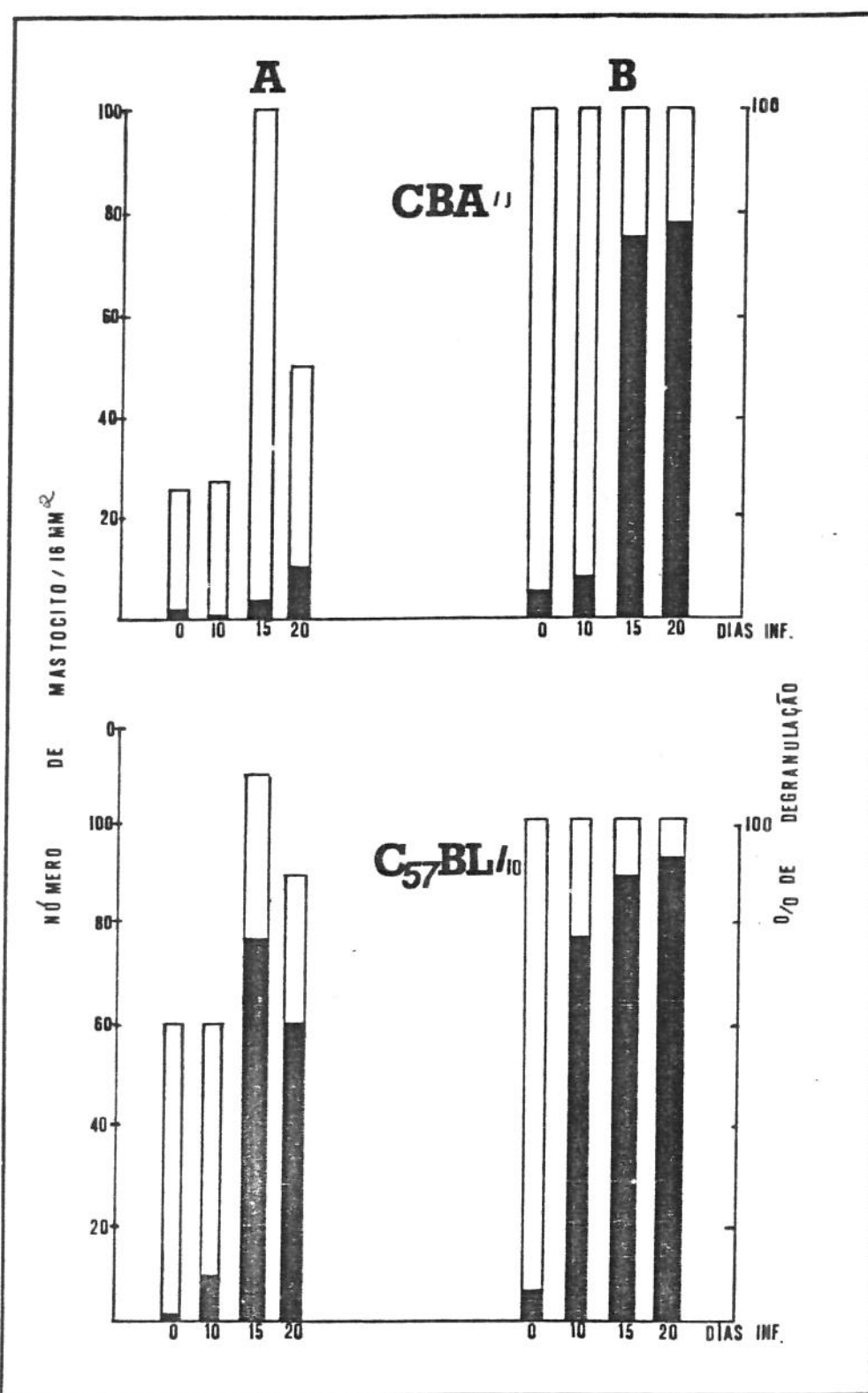
5 - Análise da variação do número e da degranulação de mastócitos de camundongos infectados *T.cruzi*, à nível do mesentério no tecido conectivo peri-vascular.

Durante os lavados peritoneais de camundongos infectados, foi verificado que se desenvolveram processos inflamatórios no mesentério das duas linhagens de camundongos utilizadas, com uma intensa alteração dos tecidos e presença de infiltrados celulares com grande número de mastócitos degranulados. (Figura 7 e 8). Com o objetivo de correlacionar a resposta humoral dos anticorpos anafiláticos, durante a evolução da infecção na fase aguda, com a participação dos mastócitos nos processos inflamatórios destes mesmos animais, foram feitas análises da variação do número e da degranulação destes mastócitos "in situ" nos tecidos do mesentério.

O exame do mesentério de camundongos da linhagem C57B1/10 normais mostrou, através da contagem do número de mastócitos no tecido peri-vascular ser esta linhagem normalmente possuidora de uma população de mastócitos duas vezes maior que a linhagem do CBA/J. (Figura 9 - A)

As análises do estudo do número total de mastócitos, mostraram que até o 10º dia de infecção não foi detectada uma diferença no número destes mastócitos nas duas linhagens de camundongo. Entretanto, o mesmo não ocorreu quanto ao índice de degranulação. O 10º dia de infecção o C57B1/10 apresentou um aumento na degranulação dos mastócitos, quando comparados com os animais normais, entretanto o CBA/J apresentou neste dia uma diminuição na degranulação, comparado ao CBA/J normal.

Com a evolução da infecção, foi observado que houve um aumento exacerbado do número de mastócitos totais nas duas linhagens, sendo



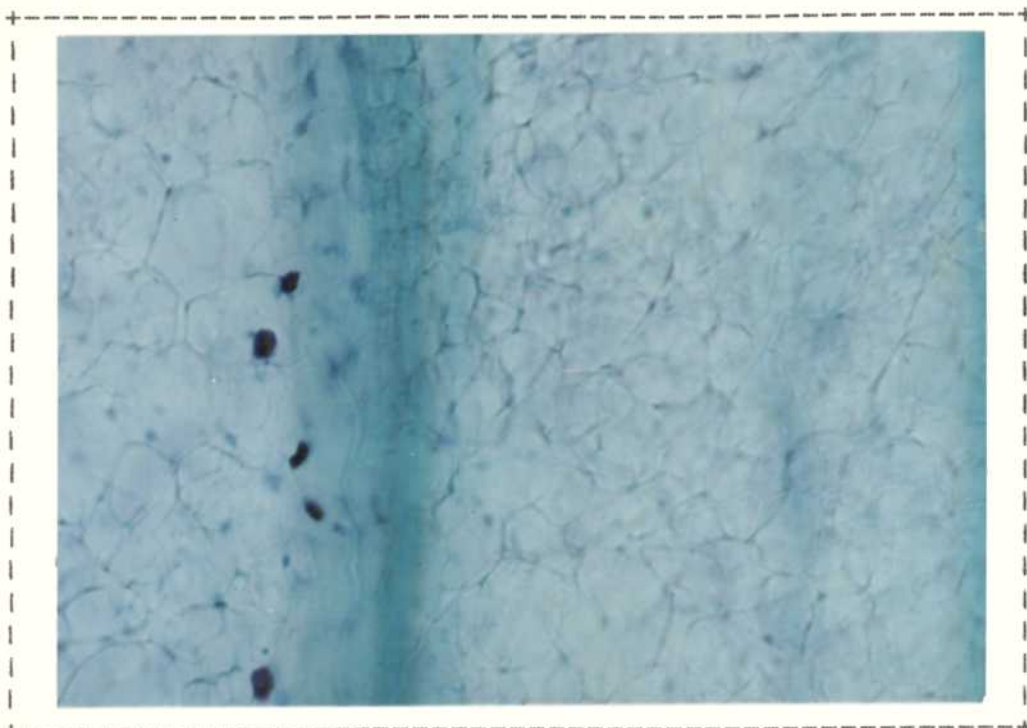


FIGURA 7: Mesentério de camundongo C57B1/10 normal. Tecido adiposo preservado e mastócitos também normais em torno ao eixo vascular-nervoso (260,0 x-aumentado) coloração: azul de Orto-toluidina.

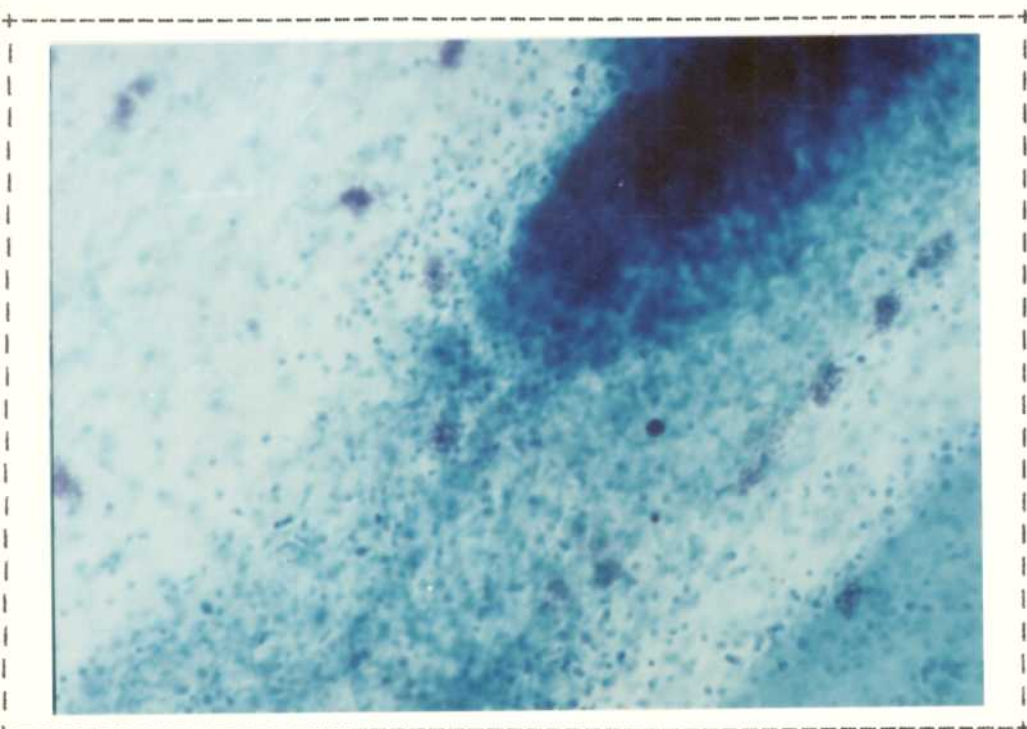


FIGURA 8: Mesentério de camundongo C57B1/10 infectado pelo I. cruzi e sacrificado no 20º dia de infecção. Celulite aguda focal com intenso exsudato de células mononucleares, com presença de mastócitos degranulados contornando um foco inflamatório. (260,0 x aumentado) Coloração: Azul de Orto-toluidina.

Figura 9 -

- A - Variação do número e da granulação de mastócitos/16mm², na evolução da fase aguda no tecido conectivo peri-vascular de camundongos infectados.
- B - Variação da degranulação de mastócitos na evolução da fase aguda no tecido conectivo inter-vascular de camundongos infectados.

Legenda -

- - Número total de mastócitos contados.
- - Número de mastócitos degranulados.

"Os animais do dia zero correspondem aos animais normais".

que o CBA/J apresentou uma média de 100 mastócitos/ 16mm^2 e o C57B1/10 com uma média de 120 mastócitos/ 16mm^2 no 15º dia de infecção. O índice de degranulação apresentou-se extremamente aumentado no C57B1/10 neste dia, enquanto praticamente não teve aumento no CBA/J, quando comparado com os mastócitos de animais normais. Após este período, com a evolução da fase aguda, houve uma diminuição do número total de mastócitos nas duas linhagens, sendo que no CBA/J esta diminuição apresentou-se maior que no C57B1/10. Entretanto, a cinética da degranulação foi bastante diferente entre as duas linhagens. O C57B1/10 apresentou um índice de degranulação menor no 20º dia, comparado ao 15º dia, enquanto para o CBA /J houve apenas um pequeno aumento.

No final da fase aguda da infecção os mastócitos da linhagem C57B1/10 apresentaram uma média de 60 mastócitos degranulados / 16mm^2 enquanto o CBA/J apresentou uma média de 10 mastócitos degranulados / 16mm^2 . Portanto, foi observado que durante a evolução da fase aguda os mastócitos da linhagem do C57B1/10 degranulam mais e mais cedo que os mastócitos da linhagem do CBA/J (Figura 9-A, pg61).

6 - Análise da variação da degranulação de mastócitos no mesentério de camundongos infectados por *T.cruzi*, à nível do tecido conectivo inter-vascular.

Dos 100 mastócitos contados no tecido conjuntivo inter-vascular, foram analisadas as percentagens de degranulação destas células durante a evolução da infecção por *T.cruzi* na fase aguda nas linhagens de camundongo CBA/J, susceptível à infecção e camundongo C57Bl/10 moderadamente resistente à infecção (Figura 10, pg64).

Foi observado que estas linhagens normalmente apresentam um índice basal de degranulação, em uma média de 5% de degranulação em animais não infectados, ou seja animais normais correspondentes ao dia zero de infecção (Figura 9-B, pg61).

Os mastócitos da linhagem C57Bl/10 mostraram uma exacerbado aumento da percentagem de degranulação à partir do 10º dia, enquanto o CBA/J apresentou este aumento sómente no 15º dia, sendo observado após um aumento progressivo no percentual desta degranulação. Entretanto, o camundongo CBA/J no final da fase aguda apresentou 77% de degranulação, enquanto o C57Bl/10 alcançou índices de 92% de degranulação neste período (Figura 9-B, pg61).

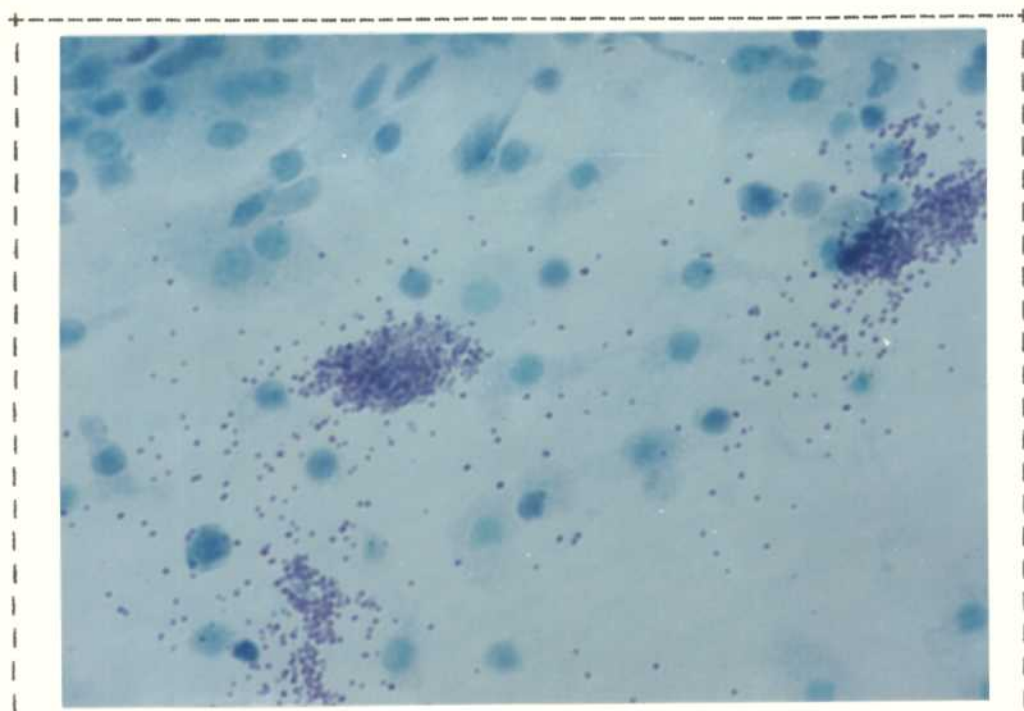


FIGURA 10: Mesentério de camundongo C57Bl/10 infectado com *I. cruzi* e sacrificado no 15º dia de infecção. Mastócitos degranulados (presença de grânulos dispersos na espessura do tecido conjuntivo) e células mononucleadas da exsudação (660,0 x aumentado). Coloração: Azul de Orto-toluidina.

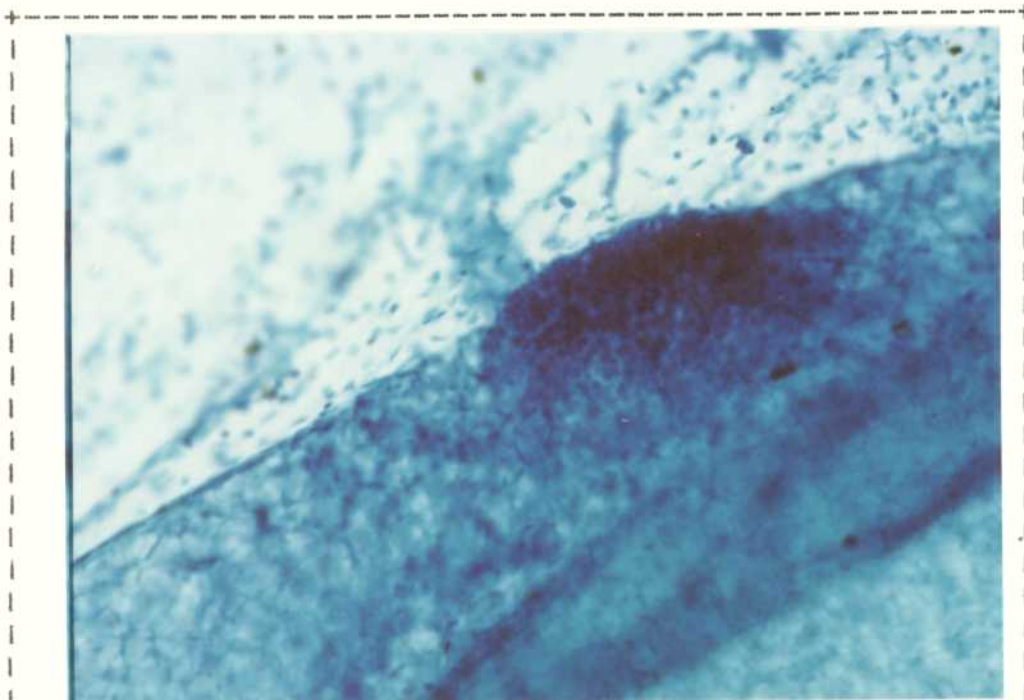


FIGURA 12: Mesentério de camundongo CBA/J infectado pelo *I. cruzi* e sacrificado no 10º dia de infecção. Celulite aguda focal predominantemente peri-vascular e com exsudação de células mononucleadas. (260,0 x aumentado). Coloração: Azul de Orto-toluidina.

7 - Análise do infiltrado inflamatório nos tecidos do mesentério de camundongos infectados:

Com o objetivo de correlacionar a participação do mastócito e a evolução do processo inflamatório desenvolvidos no mesentério das duas linhagens estudadas, durante a fase aguda da infecção, foram analisadas as cinéticas dos infiltrados inflamatórios nos tecidos peri-vascular e inter-vascular do mesentério de camundongos normais nos dias 10-15 e 20 após a infecção.

Quando foram analisados os mesentérios dos animais CBA/J e C57B1/10 normais, correspondentes ao dia zero, foi constatado que estes animais normalmente apresentam um índice basal (definido como moderado) de pequenos exsudatos de células de características linfocitárias, em regiões isoladas do tecido conjuntivo peri-vascular. Entretanto, o mesmo não foi observado nos tecidos conjuntivos inter-vascular das duas linhagens estudadas (Figura 11, pg66).

Com o início da infecção foram observados inícios de focos inflamatórios, em várias regiões ao longo do tecido peri-vascular (Figura 12, pg). Os exsudatos celulares nesse tecido, apresentaram-se inicialmente constituídos de células com características linfocitárias, sendo idênticos nas duas linhagens de camundongos. Esses focos inflamatórios se tornaram intensos com o aumento do exsudatos de células mononucleares (Figura 13, pg67).

Foi observado, que o infiltrado celular atingiu o máximo no 15º dia de infecção no tecido peri-vascular, nas duas linhagens estudadas. Entretanto a intensidade deste infiltrado celular foi mais exacerbada no CBA/J, do que no C57B1/10 atingindo um valor estimativo de (++++) e

Figura 11 - Variação da intensidade do infiltrado celular no processo inflamatório do mesentério, durante a fase aguda da infecção.

Legenda -

□ - Infiltrado celular do tecido peri-vascular.

■ - Infiltrado celular do tecido inter-vascular.

(-) - Ausente.

(+) - Moderado.

(++) - Alterado.

(+++)- Aumentado.

(++++)- Intenso.

"Cada barra representa a média aritmética dos resultados de 6 animais diferentes.

"Os animais do dia zero correspondem aos animais normais".

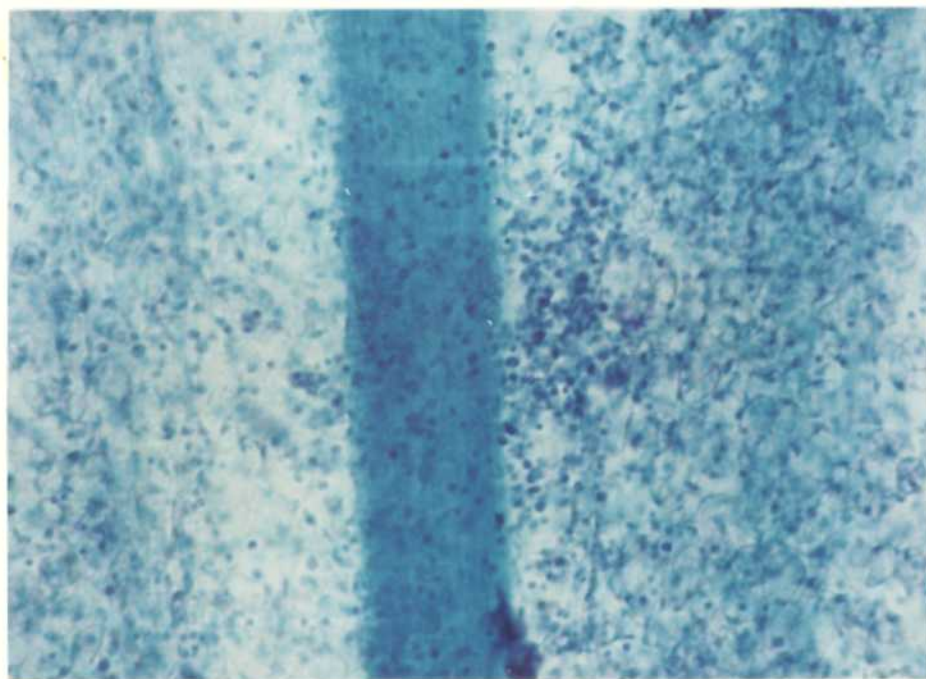


FIGURA 13: Mesentério de camundongo C57Bl/10 infectado pelo *I. cruzi* e sacrificado no 10º dia de infecção. Celulite aguda local com intenso exsudato justa-vascular de céls mononucleadas. (260,0 x aumentada). Coloração: Azul de Orto-toluidina.

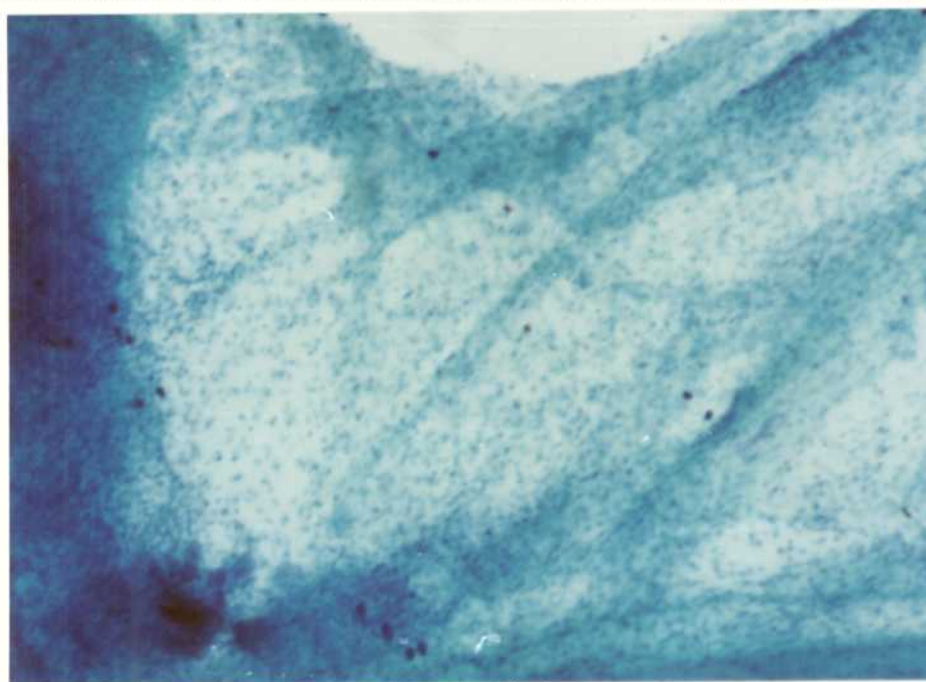


FIGURA 14: Mesentério de camundongo CBA/J, infectado com *I. cruzi* e sacrificado no 15º dia de infecção. Tecido conectivo inter-vascular com pronunciado aumento de mastócitos em relação ao controle. Não se observa o fenômeno de degranulação. Presença de infiltrado celular. (100,0 x aumentado). Coloração: Azul de Orto-toluidina.

(+++). respectivamente. O C57B1/10 apresentou neste período, um valor de infiltrado igual comparado ao CBA/J no tecido inter-vascular.

No 20º dia de infecção o CBA/J diminuiu um pouco a intensidade do infiltrado, mas ainda continuou aumentado em relação ao normal para os tecidos peri-vasculares. O C57B1/10 no final da infecção apresentou uma redução do exsudato celular nos dois tecidos estudados, tendo o tecido inter-vascular apresentado uma diminuição marcante do infiltrado inflamatório (Figura 11).

Foi observado que na linhagem CBA/J no 15º dia de infecção o aumento do infiltrado inflamatório do tecido peri-vascular era acompanhado pelo aumento do número de mastócitos, entretanto com um índice baixo de degranulação (Figura 14, pg 67). A linhagem C57B1/10 neste dia apresentou também um aumento do infiltrado no tecido peri-vascular, mas acompanhado de um índice elevado do número e da degranulação dos mastócitos.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Através da utilização da técnica reação anafilática ativa "in vitro", ou reação anafilática passiva "in vitro" (Prouvost-Danon et alii, 1966), com algumas modificações, nos propuzemos a reproduzir "in vitro" as manifestações do fenômeno de hipersensibilidade imediata, fundamentado sobre a observação da degranulação de mastócitos sensibilizados por imunoglobulinas do isotipo E e G1, as quais representam duas imunoglobulinas de atividade anafilática em camundongo. A reação anafilática "in vitro" é um fenômeno, onde ocorre exocitose dos grânulos citoplasmáticos de mastócitos, e conseqüentemente a liberação de mediadores da anafilaxia para o meio extra-celular. Dados obtidos por pesquisadores, utilizando este sistema em linhagens de camundongos, mostram que a liberação de mediadores farmacológicos como; histamina e serotonina está diretamente relacionado com a percentagem de degranulação de mastócitos (Mazingue et alii, 1978). Estes resultados representam evidências que as reações utilizadas neste trabalho estão de acordo com os modelos de detecção quantitativa das respostas anafiláticas.

Os mastócitos normais, não degranulados nestas reações, têm a sua superfície íntegra, lisa e regular, sem grânulos aparentes. Estes mastócitos se coram pelo Azul de Toluidina mais lentamente que os degranulados, devido a integridade das membranas. Por outro lado, os mastócitos degranulados têm a sua superfície irregular e os grânulos podem ter um aspecto intra ou peri-celular, corando-se rapidamente pelo corante (Figura 1 e 2). Este método é sensível, eficiente, sendo independente da heterogeneidade das populações de mastócitos.

A utilização dessa metodologia nos permitiu acompanhar a biossíntese dos anticorpos anafiláticos nas duas linhagens de camundongos utilizadas, e correlacioná-los à evolução da infecção experimental por *T.cruzi* em animais de variadas susceptibilidade. A inoculação de baixas dose da cepa Y do *T.cruzi* nos possibilitou caracterizar a fase aguda e crônica de ambas as linhagens utilizadas. Assim, conforme a literatura (Corsini et alii, 1980), pudemos verificar, dentro deste esquema, que a linhagem CBA/J é extremamente susceptível, morrendo após 20º dia de infecção, e o C57B1/10 é de moderarada susceptibilidade, desenvolvendo aspectos clínicos da infecção, mas que esta raramente fatal.

Baseado no conhecimento que a síntese de anticorpos anafiláticos está relacionada ao padrão genético de respostas do animal (Levine et alii, 1971), procuramos inicialmente estudar estes padrões de respostas para alergenos clássicos, nas duas linhagens de camundongos. Foi utilizado o sistema de imunização Ovalbumina-Al(OH)₃, variando-se a dose do antígeno. Os soros destas linhagens de camundongos, testados em pele homóloga, pela técnica de PCA; mostraram uma resposta fraca para o isotipo IgE nas duas linhagens estudadas, enquanto que a resposta para IgG₁ foi elevada. (Dados não apresentados). Dados semelhantes comprovados por pesquisadores, que utilizaram este sistema em linhagens de camundongos análogos (CBA/J e C57B1/6) (Levine et alii, 1971).

Um outro fator que está relacionado ao padrão genético de respostas dos animais é o reconhecimento pelo sistema imune da variabilidade antigênica de uma molécula. Assim a utilização neste trabalho de antígenos de três formas diferentes de *T.cruzi* teve como interesse ampliar as possibilidades de detectar antígenos desta cepa, que pudessem ser

alergênicos, e correlacionar a sua atividade biológica dentro da infecção experimental. Também existem sugestões que o desencadeamento "in vitro" das reações anafiláticas dependem muito mais da natureza dos antígenos do que do grau de sensibilização dos mastócitos (Vaz et al, 1969). Se por um lado os pesquisadores têm demonstrado existir uma grande variabilidade da composição antigênica entre diferentes cepas de *T.cruzi* (Andrade et alii, 1981), por outro é conhecido que as várias formas de evolução do parasita apresentam antígenos comuns (Rangel et alii, 1981). Entretanto estas mesmas formas apresentam uma variedade enorme de isoenzimas (Morel et alii, 1986)

Outro fator relevante nestas análises diz respeito a idade dos animais utilizados, pois em geral os anticorpos reagínicos estão presentes no soro de camundongos jovens e seu título varia com a idade (Prouvost-Danon et alii, 1970). Assim, foram escolhidos para a realização dos trabalhos, camundongos com idade de 3 a 4 meses, que correspondem ao camundongo adulto.

É conhecido que a presença de anticorpos reagínicos (IgE) no sangue circulante parece estar relacionada com o resultado de um equilíbrio entre a síntese desses anticorpos e a sua fixação sobre os tecidos e células, em particular os mastócitos. O número de moléculas IgE fixadas nas células "in vivo", varia de um indivíduo a outro, mas existe uma correlação entre a taxa de IgE sérica e o número destes anticorpos fixadas sobre os basófilos (Ishizaka et alii, 1973), assim como existe uma correlação entre a taxa de IgE sérica e o número de receptores da célula (Sirois, 1978).

Baseados nestes conceitos a avaliação das IgE presentes na superfície dos mastócitos da cavidade peritoneal nos permitiu analisar a

síntese de IgE total e específica à antígenos de *T.cruzi* em camundongos infectados.

Com a utilização desta metodologia, de um modo geral não foi observado um aumento de síntese de IgE específica a antígenos das formas de *T.cruzi* na linhagem CBA/J, com exceção no 20º dia da infecção, frente a antígenos de amastigota. Entretanto, os resultados do aumentados de exocitose na linhagem C57B1/10 são discutíveis, necessitando de uma investigação mais ampla no que diz respeito às proporções ideais da relação antígeno/anticorpo.

Sabe-se, que uma concentração ótima do antígeno para a reação de degranulação "in vitro" dos mastócitos sensibilizados por anticorpos anafiláticos, em geral liberam somente parte significativa de suas aminas, já que as degranulações não são totais. Assim, existe um equilíbrio ideal de proporção Ag/Ac (Prouvost-Danon, 1972), além de dados como a intensidade das interações, afinidade dos anticorpos pelo antígeno e etc. Outros dados ligados à natureza dos antígenos são também extremamente importantes, como o número e a disposição dos epítopos na molécula antigênica ou uma simples presença de materiais inertes na molécula.

Enquanto outros métodos de análise estão sujeitos a uma variabilidade do teor de mediadores farmacológicos, em decorrência aos diversos níveis de maturidade dos mastócitos, dentro de uma mesma população, contrariamente as reações anafiláticas mediadas por IgE não são afetadas pelos diferentes níveis de maturação da célula. Os mastócitos em diversos níveis de maturação são capazes de se sensibilizarem e promoverem uma reação anafilática.

A ação da anti-IgE sobre os mastócitos de animais infectados por *T.cruzi* foi em geral menor que a ação da anti-IgE nos mastócitos de animais normais. Contrariamente a este dado, sabe-se que a ação da anti-IgE é mais intensa sobre os mastócitos sensibilizados, do que sobre os mastócitos normais, indicando que a concentração da IgE total na superfície desta célula está aumentada após sensibilização (Prouvost-Danon, 1972). A diminuição de exocitose frente a anti-IgE, na evolução da infecção, poderia estar relacionada com as conhecidas supressões das respostas de anticorpos durante a infecção (Corsini et alii, 1981), o mesmo ocorrendo com a IgE, provocando um processo de diminuição da exocitose dos mastócitos cujos mecanismos serão analisados posteriormente.

Em relação aos animais normais, a média aritmética da exocitose dos mastócitos coletados nos dias 10, 15 e 20 correspondente aos dias de coleta dos animais infectados e tratados com anti-IgE (Figura 1), foi igual nas duas linhagens, indicando existir um mesmo nível de população de IgE nestes animais.

A diferença verificada nos estudos comparativos entre a exocitose das linhagens, Tabela 2-II para a resposta de IgE específica a antígenos de *T.cruzi* em animais infectados foi mais frequente no 15º dia, isto provavelmente devido a uma maior resposta de IgE específica a antígenos do parasito na linhagem do C57B1/10. A diferença entre as exocitose de mastócitos das linhagens não infectadas, talvez esteja relacionada a pequena atividade inespecífica dos antígenos de *T.cruzi* sobre os mastócitos da linhagem CBA/J especialmente no 15º dia (Ubirajara-Garcia et alii, 1986).

É conhecido que o fenômeno da sensibilização dos mastócitos por IgE, tanto "in vitro", quanto "in vivo" está associado ao padrão genético do animal, variando a afinidade dos receptores pelos domínios Fc da molécula IgE, como também determinando as maiores ou menores expressões dos receptores desta célula.

As sensibilizações passivas por IgE sérica "in vitro" são de difícil execução devido a variados fatores que podem interferir no fenômeno. Por esta razão utilizaram-se recursos técnicos como cultura curta de mastócitos, a qual mantém estas células por um período de em torno de 12 horas em contato com os soros imunes, propiciando a sensibilização destas células por IgE. Entretanto, foi necessário uma redução do tempo de sensibilização neste trabalho, devido as contaminações constantes das reações em cultura. O trabalho com um índice menor de sensibilização dos mastócitos, entretanto nos proporcionou condições de estudar as respostas que foram satisfatórias aos interesses das análises. (Diante do esquema técnico de trabalho utilizado, os testemunhos negativos não desenvolveram exocitose inespecíficas em presença de soros normais, ou quando acrescidos de antígenos de célula Hela.

A análise dos mastócitos de camundongos Swiss normais, em presença de soro normal das linhagens estudadas, adicionados de antígenos das três formas de *T.cruzi* indicou a ocorrência de uma exocitose inespecífica. As respostas inespecíficas mais frequentes em soro de CBA/J ocorreram com as formas tripo e amastigota e, na linhagem C57Bl/10 foram mais frequente para os antígenos de epimastigota e amastigota, sugerindo que os antígenos das três formas de *T.cruzi* poderiam estar interagindo com agrupamentos glicoprotéicos pertencentes as estruturas das imunoglobulinas IgE, fixadas na superfície dos mastócitos, ocasio-

nando uma ligação tipo lectina através, de uma interação com duas moléculas de imunoglobulinas adjacentes, e estas interações promoveriam a exocitose da célula. Tem sido analisado em outros modelos que as lectina (Provost-Danon et alii, 1984; Lima et alii, 1985), disparam exocitoses em mastócitos, funcionando como uma anti-IgE, dentro de um estímulo de certa forma imunológico, pois se faz com a participação de imunoglobulinas ao mesmo pode interagir com a imunoglobulina e a um receptor específico do mastócito (Lagunoff et al, 1983). Estes efeitos tem sido assunto polêmico nas infecções alérgicas, onde vários autores demonstraram que bactérias podem induzir liberação de histamina em basófilos "in vitro", em crianças asmáticas ou indivíduos normais, através de interações dependentes de IgE (Norn et alii, 1983). Assim, a liberação de histamina no pulmão de pacientes pode provocar uma invasão da bactéria no tecido pulmonar, através da sua atuação na barreira de defesa pulmonar.

Além do mecanismo imunológico, mediado principalmente por IgE nestas exocitoses no tecido, poderia participar um outro mecanismo não imunológico, consistindo de uma interação direta com moléculas na superfície da célula. O mecanismo imunológico sugere, que existam inúmeras reações tipo lectina bacteriana, que podem ser inibidas com diferentes carboidratos (Norn et alii, 1983). A concanavalina A (lectina mitogênica) pode induzir liberação de histamina em mastócitos (Keller, 1973), através de mecanismos de interação com sítios da membrana independentes das interações da membrana com IgE (Magro et alii, 1977), ou pode induzir a liberação de histamina nestas células pela interação com IgE ligada a receptores de mastócitos (Magro et alii, 1974).

Em geral os mecanismos de interação de lectinas com mastócitos e basófilos indicam que vários fatores são determinantes críticos como agentes nestes fenômenos. Entretanto, já é claro que a atividade de liberação de histamina pela Con-A em mastócitos de rato e basófilos humanos não se trata de um processo citotóxico, ocorrendo exocitose dependente de temperatura, concentração adequada de Ca^{2+} , e que é inibida por monossacarídeos. Existe uma grande evidência que estes fenômenos ocorrem através de uma interação com grupos sacarídeos localizados na porção intermediária da Fc , e é postulado que há uma interação cruzada com as moléculas adjacentes na superfície celular. Também, é possível que a Con-A induza liberação de histamina, através de interações com grupos sacarídeos situados na superfície da célula (Sullivan et alii, 1975).

Esses dados reforçam a hipótese que o fenômeno observado neste trabalho, de exocitose inespecífica em mastócitos normais, frente a antígenos de *T.cruzi* seja equivalente aos fenômenos expostos acima. Um efeito análogo foi observado "in vivo" por autores que observaram um aumento da permeabilidade vascular dos tecidos decorrido da inoculação de extratos de *T.cruzi* na pele de cobaias (Belluci, 1979). Possivelmente nossos dados poderiam estar sujeitos aos mesmos mecanismos observados neste trabalho realizado "in vivo". Assim pode existir uma interação do parasita (ou moléculas deste), com os mastócitos da pele, por mecanismo imunológicos, com a participação de IgE e antígenos de *T.cruzi*, ou através de mecanismos semi-imunológicos, com a participação do IgE com outras especificidades em interações tipo lectinas, ou não-imunológicos interagindo diretamente com grupamentos moleculares da superfície da célula. Estes fenômenos levariam portanto também a

um aumento da permeabilidade vascular permitindo ao parasita uma maior invasão aos tecidos.

A inibição destas exocitoses inespecíficas nas duas linhagens estudadas foi observada no 10º dia de infecção. (Tabela 3), sendo esta diferença de exocitose mais frequente para antígenos de epimastigota e amastigota. Os antígenos de epimastigota em presença de soro do C57B1/10 tiveram uma atividade de exocitose inespecífica for muito baixa durante a evolução da infecção, (Tabela 4-II) indicando que a atividade de exocitose inespecífica nas duas linhagens foi igual frente a antígenos de amastigota, enquanto o tripomastigota apresentou-se mais importante atividade para as duas linhagens. Observando a tabela 4 em geral, diante do fenômeno da exocitose inespecífica ficou difícil detectar uma resposta específica de exocitose, pois foi verificado que o soro das duas linhagens também inibiam a exocitose de mastócitos normais, frente a outro sistema (Sistem.Ovalbumina). Podemos entender que o fenômeno de exocitose inespecífica também é inibido em presença de soros, durante a evolução da infecção. Talvez, poderia ser inibido, levando a índices menores de exocitose, entretanto isto não ocorreu e sugere-se que ao mesmo tempo houve uma exocitose específica, ou seja uma resposta humoral de IgE específica aos antígenos de T.cruzi, na evolução da infecção. Assim, os mastócitos frente ao soro de C57B1/10 no sistema ovalbulmina passam de 27% a 2% de exocitose, enquanto estes mastócitos frente ao sistema T.cruzi passam de uma exocitose de 14% para 17% no final da infecção.

Ao que se sabe, a IgG monomérica possui fraca afinidade em mastócito de rato (Halpes et al, 1976), e em mastócito de camundongo (Prouvost-Danon, 1966) diferentemente da IgE monomérica, que tem uma forte afinidade pelo receptor de mastócito, não se liberando da superfície, após lavagens desta célula (Prouvost-Danon et al, 1966).

A presença de receptores de IgG foram descritos em mastócitos de rato (PM70.000), entretanto o seu modo de ação ainda é desconhecido. O pouco que se sabe dos receptores para IgG1 em camundongos, é que são funcionalmente independentes dos receptores envolvidos nas reações induzidas por IgE "in vitro" (Daeron et alii, 1980).

Nas infecções chagásicas, a detecção de concentrações baixas de IgG1 anti-T.cruzi não tem sido bem compreendidas, pois espera-se contudo que esta sub-classe de imunoglobulina, dentro de um estímulo antigênico complexo, seja a mais representativa nas infecções parasitárias em camundongos.

Entretanto, os nossos resultados mostraram dentro de uma metodologia especial, que há uma síntese aumentada de IgG1 específica a antígenos de T.cruzi, durante a evolução da infecção. Principalmente, a linhagem C57B1/10 no 15º dia apresentou uma exocitose específica aumentada, quando em presença de imune-complexos anafiláticos de antígenos amastigota/IgG1 (Tabela 5). Neste sistema pudemos notar que a linhagem C57B1/10 (animal resistente), responde especificamente mais cedo que a linhagem do CBA/J (susceptível), a qual só no 15º dia apresentou uma resposta para formas amastigota. Aliás, esta forma de T. cruzi teve uma atividade alergênica maior que as demais.

Ficou evidente diante da exocitose, que a linhagem resistente foi capaz de apresentar uma maior resposta com IgG1 específica mais precocemente do que os animais susceptíveis, conforme a figura 3, pg 39 (Ubi-

rajara-Garcia et alii, 1987).

Entretanto, também nas reações para IgG1 foi verificado novamente o fenômeno da inibição da exocitose, semelhante aquele encontrado nos dados anteriores, para sistema (Ovalbumina-anti-Ovalbumina), frente a soros das duas linhagens de camundongos. Assim, pode se supor que este fenômeno estaria contribuindo para diminuição das exocitose inespecífica dos mastócitos para complexos Ags/anti-T.cruzi. Talvez fossem encontrados valores de exocitose maiores, na ausência do fenômeno de inibição.

A verificação de uma exocitose de mastócitos em presença dos complexos anafiláticos de antígenos de célula Hela/anti-T.cruzi, poderia ser explicada pela presença de imunoglobulinas nos soros com especificidade a antígenos comuns a estas células. Outra possibilidade seria uma reação cruzada ocasionada por uma grande heterogeneidade de IgG1 no soro do camundongo C57B1/10, com presença de variada especificidade a um complexo antigênico indutor. Estas reações cruzadas em Chagas tem sido investigadas dentro dos processos de auto-imunidade (Hudson, 1985).

O conjunto dos nossos dados em relação a IgG e IgE mostram que ambas as imunoglobulinas participam na indução das respostas anafiláticas durante o período estudado da infecção, entretanto nota-se que o nível da participação da IgG1 foi muito maior do que a IgE. Embora esta diferença de atuação destas imunoglobulinas tenha sido estudada em diversos modelos, a regulação destes isotipos em geral é ainda parcialmente compreendida. Sabe-se que as células T auxiliar e T supressora isotipo-específicos, estão implicadas na regulação da síntese destas imunoglobulinas, sendo demonstrada em experimentos em camundongos maus respondedores para IgE, que quando depletados de T supressora

tornam-se bons respondedores para IgE (Chiorazzi et alii, 1977).

Em vista da evidência do papel das células T supressoras nas respostas para IgE poderíamos supor que o período de supressão na infecção chagásica, dentro da fase aguda, poderia estar regulado por um sistema de ativação análogo ao das células T supressoras para o isotipo de IgE, e conseqüentemente as repostas humorais para esta imunoglobulina seria baixa neste período. Por outro lado recentemente foi descrito um índice aumentado de IgE em pacientes chagásicos na fase aguda e crônica, sendo significativa a detecção de IgE específica principalmente na fase aguda (Martin et alii, 1986).

As análises da síntese de IgE e IgG1, durante um período mais longo da infecção da doença de Chagas, poderiam esclarecer alguns fenômenos nos quais elas participam, tendo em vista alguns autores terem demonstrado que nas células esplênicas de animais infectados, a síntese de IgE é timo-dependente ao contrário da IgG1 (D'Império-Lima et alii, 1985). Estes dados vêm confirmar aspectos dos nossos resultados, que indicam uma diferença entre as sínteses destas duas imunoglobulinas.

Os sistemas de reação de degranulação para antígenos não relacionados a *T. cruzi*, (IgE-anti-IgE e Ova.anti-Ova), apresentou um fenômeno de inibição da exocitose ao longo da infecção (Ubirajara-Garcia et alii, 1987-b). Diante deste fenômeno, o referencial dos padrões controles positivos com soro ou células de animais, apresentaram-se alternados em relação ao controle de soro e células de animais normais, influenciando na leitura dos controles das reações. (Tabela 1,3,5).

A observação da exocitose de mastócitos peritoneais dos camundongos susceptíveis e resistentes à infecção por anti-IgE total, a qual foi consideravelmente inibida no 15º dia de infecção, poderia estar

relacionada inicialmente com um mecanismo de supressão da síntese de IgE total. Entretanto, a mesma observação verificada na sistema ovalbumina em presença de soro imune anti-T.cruzi, indica a possibilidade de um mecanismo mais direcionado para a inibição.

Tanto a exocitose da IgE sérica, como dos imune-complexos anafiláticos de IgG1 apresentaram sensíveis aumentos de inibição ao longo da infecção (Figura 4). Em geral, este fenômeno de inibição parece ter a mesma atividade efetora nas duas linhagens utilizadas, com uma pequena diferença em sistemas dos imune-complexos de IgG1 onde o CBA/J induz uma mais sensível inibição, quando comparado ao C57Bl/10 (Figura 4).

O estudo dos fenômenos de inibição da exocitose surgiu com os trabalhos de Austen e Brocklehurst(1960), onde ficou demonstrada uma inibição da liberação de mediadores de mastócitos pulmonares de cobaias, utilizando substratos enzimáticos. À partir desta data tem sido reportado diferentes inibidores para exocitose de mastócitos e basófilos, com uma grande variedade de mecanismos.

Recentemente, foi descrito um bloqueador no soro de rato, o qual inibia a liberação de histamina em mastócito "in vitro" e "in vivo"(Theobald et al,1983). Também foi identificado no soro humano a transferrina, como responsável pela mesma atividade bloqueante da exocitose (Grab-Weege et alii,1986). Estes achados vieram sugerir que estas substancias seriam importantes na regulação da liberação de histamina, durante o processo alérgico e nas reações inflamatórias.

Assim, o processo de inibição observado neste trabalho durante a infecção, poderia ser devido a presença de fator(ou fatores) originado do próprio hospedeiro como regulador dos fenômenos anafiláticos, que por sua vez inibiria certamente a penetração do parasita na pele ou tecido. Este fator(s) poderia também inibir a exocitose inespecífica

em mastócitos, pelos antígenos de *T.cruzi*, como observamos na tabela 1 e 3. Na literatura tem sido descrito fenômenos de inibição das interações da molécula de IgE ao receptor da célula (Schrick et alii, 1984; Ishizaka et alii, 1985), como também bloqueios das interações IgE-antígeno, ou relacionados a mecanismos não imunológicos como tipo Ca^{2+} Iônicos (Theobaldo et al, 1983).

O fenômeno da inibição tem sido analisado nos processos alérgicos, e principalmente nas helmintoses. É conhecido o fato que produtos de incubação do *S.mansoni* têm a propriedade de inibir "in vitro", e "in vivo", a degranulação de mastócitos em sistemas anafiláticos ou frente a compostos químicos ativos na membrana da célula (Mazique et alii, 1980). Estes autores sugerem que a inibição esteja envolvida com a modulação do AMP-cíclico da célula, pode comprometendo o fenômeno de citotoxicidade ao Schistosomula, mediada pelo eosinófilo. O efeito inibidor observado em nosso trabalho pode representar como na esquistosomose um dos mecanismos, de escape do parasita a citotoxicidade dependente de anticorpo, se considerarmos que esse fator (ou fatores) seja liberado pelo próprio parasita, como também poderia diminuir a atuação dos mastócitos na amplificação do processo inflamatório.

Tem sido atribuído um papel biológico a determinadas enzimas proteolíticas isoladas de extratos lisados do *T.cruzi* (Araújo, 1979). Sabe-se que a proteinase de cepas deste parasita, tem atividade enzimática sobre anticorpos IgM, IgG e IgA (Gomes, 1984), podendo anular diversos fenômenos biológicos em que participariam estas imunoglobulinas. Esta mesma atividade enzimática poderia estar ocorrendo sobre os anticorpos anafiláticos, quando em presença do antígeno, não ocorrendo mais a interação, ou também poderia bloquear as interações dos antígenos de *T.cruzi* na indução de uma exocitose inespecíficas (Tabela 3).

Outros autores têm demonstrado uma supressão nas respostas para sistemas Ovalbumina/anti-ovalbumina em animais infectados por *T. cruzi* ao longo da infecção (Mendes et alii, 1979), podendo talvez esta não detecção de resposta estar também relacionada a uma inibição da exocitose em sistema de PCA.

Outra hipótese levantada seria que a exocitose observada neste trabalho poderia ser bloqueada pela supressão idiotípica, uma vez que as IgE, assim como outros isotipos são sensíveis a esta supressão (Gazzinelli et alii, 1987).

Um outro fator a ser analisado é a influência de populações heterogêneas de IgE presentes no meio, as quais poderiam comprometer o mecanismo de sensibilização dos mastócitos, bem como as suas possíveis interações com os antígenos, já que a probabilidade das interações específicas estão possivelmente diminuídas.

As pesquisas de processos imunológicos envolvidos na defesa dos hospedeiros contra os parasitas tem sido reconhecido a mais de um século, e o papel dos anticorpos anafiláticos e dos mastócitos tem sido relacionados aos mecanismos de defesa, e nas profilaxias das reinfecções (Lee et alii, 1986). Em geral, a imunidade é insuficiente dentro das infecções parasitárias, possibilitando ao parasita atravessar a fase aguda e passar para uma fase crônica persistindo neste período. Assim, apesar de uma resposta humoral específica desenvolvidas nas infecções chagásicas a patogenecidade que se desenvolve no hospedeiro é um reflexo das interações hospedeiro-parasita em todos os períodos da infecção.

Os estudos da patogenia em Chagas tem mostrado que a intensidade da inflamação está associada a diferentes cepas do parasita (Tafuri et al, 1967), e recentemente autores verificaram que a heterogeneidade

dentro de cada cepa também tem sido responsável por aspectos patogênicos distintos (Morel et alii, 1986). Este aspecto também está associado aos diferentes tropismos das cepas para os tecidos, e em particular a cepa Y, apresenta um tropismo para o intestino entre o 9º ao 11º dia de infecção, quando inoculada intra-peritonealmente em camundongos albinos (Melo et al, 1978). A distribuição do T.cruzi nos tecidos tem um importante reflexo na patogenia, entretanto os diferentes tropismos verificados experimentalmente ainda não estão correlacionados à patogenia humana.

Os camundongos das linhagens suscetíveis e resistentes infectados com T.cruzi, conforme a metodologia utilizada em nosso trabalho, desenvolveram processos inflamatórios no mesentério, que evoluiu com a infecção, apesar de não ter sido verificado a presença de parasitas em cortes corados especificamente, durante as análises.

Nos cortes histológicos do mesentério dos animais infectados, foi observado que havia uma progressão do infiltrado celular, o qual se iniciava no tecido peri-vascular nos dias subsequentes à infecção e se estendiam para o tecido inter-vascular.

Entretanto, os animais normais já apresentavam um moderado número de exsudato celular comum às duas linhagens, e que naturalmente poderia estar associado a um período de digestão alimentar destes animais (Alcântara, 1987, comunicação pessoal).

Os animais normais pertencentes as duas linhagens estudadas apresentaram sempre um tecido adiposo denso, contornando a regiões dos vasos, enquanto os animais infectados, durante a evolução da infecção, perdiam a estrutura deste tecido, dando lugar a um infiltrado celular intenso no final da fase aguda (Figura 7-8, pg60). Entretanto, o CBA/J diferentemente do C57B1/10 evoluía para uma lesão dos tecidos com indícios de processos necróticos no período final, não recuperando mais o tecido adiposo.

A diminuição do tecido adiposo detectadas nas infecções experimentais chagásicas, ainda é uma questão em aberto já que não foi encontrado presença do parasita nas células adiposas (Tafuri, 1987, comunicação pessoal).

Nos animais normais também foi verificado que o número basal de mastócitos do tecido peri-vascular da linhagem resistente é duas vezes maior que o número basal destas células na linhagem susceptível (Figura 9, pg64).

O número de mastócitos nas linhagens infectadas é sensivelmente aumentada no 15º dia, diminuindo mais intensamente nos animais CBA/J no 20º dia, quando comparado ao C57B1/10.

O processo de degranulação foi mais intenso e mais precoce no C57B1/10, apresentando no 15º e 20º dia de infecção valores discrepante dos obtidos pelo CBA/J. Esta degranulação, principalmente observada contornando os focos inflamatórios ou dispersos no tecido inter-vascular, com intensa metacromasia e dispersão dos grânulos, sugere uma associação com estes infiltrados (Figura 13-10, pg674). A degranulação dos mastócitos no tecido inter-vascular no final da infecção da linhagem susceptível, caracterizada pela perda da integridade do núcleo e dimi-

nuição da metacromasia, foi interpretada como consequência do processo necrótico instalado nos tecidos.

Em paralelo aos resultados da degranulação dos mastócitos, os processos inflamatórios no mesentério, nos mostraram que a intensidade dos infiltrados celulares foi maior no mesmo período que se obteve um máximo de mastocitose e exocitose, tanto na linhagem resistente como na susceptível. Entretanto, o C57B1/10 após este período diminuiu o infiltrado celular, dando início a reposição do tecido adiposo, enquanto o CBA/J aumentou sobremodo este infiltrado no tecido inter-vascular (Figura 11, pg 66), provavelmente sendo responsável pela evolução da infecção, distinta nas duas linhagens.

A cinética de degranulação dos mastócitos "in situ", e o aumento do infiltrado inflamatório, foi concomitante à resposta humoral de IgG1 e provavelmente de IgE. Este fato leva a supor que o processo inflamatório detectado nestes tecidos, têm seus mecanismos fundamentados também nas reações anafiláticas. A resposta tardia da síntese mais efetiva dos anticorpos anafiláticos específicos a *T. cruzi* na linhagem susceptível, levou os mastócitos "in situ" a retardarem o fenômeno de degranulação. Isto poderia consequentemente ser responsável pela não participação dos mecanismos disparados após a exocitose do mastócito, os quais representam um papel essencial na inflamação, possibilitando assim um menor controle da infecção pelo hospedeiro. Quando este animal inicia a resposta humoral, o processo inflamatório já está acompanhado por um quadro patogênico de difícil controle e possivelmente irreversível. Por outro lado a linhagem resistente se manifesta no início do processo infeccioso acompanhada por uma resposta humoral eficiente, com elevado índices de degranulação retomando rapidamente a homeostasia dos tecidos.

Dentre os inúmeros fenômenos biológicos mediados pela IgE, nos processos anafiláticos foi proposto pelo casal Ishizaka(1957), que esta imunoglobulina tera uma função como anticorpo "guardião", já que as substâncias liberadas pelas reações mediadas por ela aumentam a permeabilidade vascular, permitindo a translocação de anticorpos específicos do soro, pertencentes a outras classes de imunoglobulinas para os sítios onde seus acessos são limitados (Steinberg et alii,1974). Estes mecanismos são constantemente estudados nas infecções helmínticas e estão relacionados com os sistemas de defesa nas reinfecções (Alizadeh et alii,1986).

Neste trabalho, sugerimos que a degranulação dos mastócitos "in situ" seja principalmente consequência da formação de complexos anafiláticos IgG1/Ags do parasita, como também IgE, as quais em concentrações mínimas poderiam ser eficientes a nível de tecido.

Além dos fenômenos anafiláticos responsáveis pela degranulação dos mastócitos "in situ", ainda poderiam estar operando o processo inibitório, detectado "in vitro", o qual bloquearia a resposta do mastócito no tecido. Entretanto, é pródigo aceitar esta atuação sómente parcial, já que as respostas de exocitose são fiéis aos níveis de anticorpos anafiláticos.

Eventualmente poderia estar atuando na degranulação destes mastócitos os antígenos do parasita induzindo exocitose inespecífica nestas células, ampliando assim o fenômeno da inflamação. Todo um conjunto de fenômenos estaria atuando em uma dinâmica de interação no sentido de invasão e de defesa, a qual poderia ser iniciados com a participação ativa dos mastócitos, amplificando as respostas inflamatórias com a variedade de seus compostos farmacológicos. Seriam desencadeados fenô-

menos de imunoregulação e recuperação dos tecidos lesados, os quais são responsáveis pelos sintomas clínicos nas infecções. Ademais estes fenômenos poderiam se repetir em outros tecidos, durante a infecção crônica da doença de Chagas, provocando miocardites, ou participando ativamente nas síndromes dos megas (Menezes et al, 1965; Tafuri et al, 1967; Tafuri et al, 1971). As respostas obtidas neste trabalho mostraram fenômenos distintos nas duas linhagens de camundongos de diferentes susceptibilidades, sugerindo que estas respostas representam mais um mecanismo de defesa, e estejam relacionadas com a sobrevivência do animal na infecção experimental chagásica.

RESUMO E CONCLUSÕES

RESUMO E CONCLUSÕES

Na doença de Chagas tem sido pouco estudada a participação dos anticorpos anafiláticos e as suas interações com os mastócitos, certamente pelo fato de que em geral nas infecções por protozoários não há um aumento da síntese de IgE, como acontece nas helmintoses. Também, foram desenvolvidas poucas pesquisas de outros anticorpos anafiláticos além da IgE, que poderiam ter um papel efetivo em geral nas infecções.

Neste trabalho nos propusemos investigar o papel da anafilaxia na infecção a *T. cruzi*, durante a fase aguda, utilizando duas linhagens de camundongos diferentes: O CBA/J (susceptível) e o C57B1/10 (moderadamente resistente). Foram estudadas a cinética e a função biológica dos anticorpos anafiláticos (IgE e IgG1), como também suas interações com os mastócitos, participando de um processo inflamatório nos tecidos do mesentério.

Com a utilização de uma metodologia apropriada nas análises das infecções, foi observado que durante a evolução da infecção chagásica há indícios de uma síntese de IgE específica a antígenos de *T. cruzi*, principalmente na linhagem resistente.

Em nosso trabalho há evidência entretanto, de um fator (fatores), cujas características ainda não foram identificadas, e que durante a infecção é liberado na circulação, produzindo uma inibição da excitose dos mastócitos. Esta excitose foi induzida por antígenos não relacionados a *T. cruzi*, mediada ou não por IgE ou IgG1, como também foi inibida a excitose inespecífica, mediada ou não por IgE ou IgG1.

Durante as análises humorais foi verificado que há uma síntese de anticorpos anafiláticos IgG1 específicos a diversos antígenos de *T.*

T. cruzi, principalmente de formas amastigotas onde este anticorpos mostraram capacidade de induzir importante exocitose, em 65% dos mastócitos normais, mesmo em presença do fator inibidor presente no soro.

Um outro fenômeno verificado durante a reação dos antígenos de *T. cruzi* na superfície de mastócitos de animais normais, se refere a uma atividade de exocitose inespecífica quando em presença de soro normal, principalmente na linhagem CBA/J para antígenos de formas amastigota.

A cinética destes fenômenos estudados nas duas linhagens de camundongos não indica diferenças marcantes entre a inibição das reações mediadas por IgE e IgG1. Entretanto, a formação dos anticorpos anafiláticos IgG1 específicos a antígenos de formas evolutivas de *T. cruzi* aparece mais elevada e mais precocemente na linhagem resistente do que na linhagem susceptível, analisada pela sua capacidade de induzir exocitose de mastócitos peritoneais.

Os processos inflamatórios observados a nível do tecido conectivo peri-vascular e inter-vascular do mesentério durante a evolução da fase aguda, sugerem um possível papel dos mastócitos e de seus mediadores farmacológicos no fenômeno de defesa contra o parasita, acionando sistemas de imunoregulação e fibrilopoiese, como também a restauração de tecidos no decorrer da fase aguda da infecção. Estes fenômenos estão associados ao grande número de mastócitos, que acompanham a intensificação do processo inflamatório e o aumento da degranulação "in situ", no tecido peri-vascular na linhagem resistente, enquanto que o mesmo não é verificado na linhagem susceptível. Esta linhagem atinge um máximo de degranulação talvez em consequência aos processos lesivos que ocorrem nesta fase.

A exocitose "in situ" dos mastócitos dos tecidos do mesentério mostrou uma cinética paralela ao aparecimento dos anticorpos anafiláticos, principalmente IgG1 específicos a T.cruzi na circulação nas duas linhagens de camundongo, a qual poderia ser explicada pela formação de complexos IgG1/ Ags de T.cruzi anafilaticamente ativos, produzindo degranulação de mastócitos.

Entretanto, a síntese dos anticorpos anafiláticos IgE específicos contra antígenos de T.cruzi, durante a fase aguda da infecção foi pouco significativa, talvez porque a nível de tecido haja uma concentração efetiva desta imunoglobulina. Também, as linhagens de camundongos utilizados são más respondedoras para IgE, além da possível influência do fator inibidor presente na infecção.

Este trabalho representa mais uma contribuição para composição dos mecanismos, que poderão participar ativamente na resistência e sobrevivência dos hospedeiros, já que são distintos os fenômenos anafiláticos em linhagens susceptíveis e resistentes, durante a fase aguda da infecção experimental de Chagas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamsohn, I.A., Blotta, M.H.S.L. & Curatto, M.A. Specific cutaneous hypersensitivity responses in mice infected or immunized with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite.Immunol.*, 5 : 237-48 , 1983
- Alizadeli, H., Urban, J.F.Sur., Katana, IM & Finkelman F.D. Cells containing IgE in the intestinal mucosa of mice infected with the nematode parasite *Trichinella spiralis* are predominantly of a mast cell lineage. *J.Immunol.*, 137 (8) : 2555-60, 1986
- Almeida, H.O., Lima-Pereira, F.E. & Tafuri W.L. Estudo quantitativo dos mastócitos na cardiopatia chagásica crônica. *Rev.Inst.Med.Trop.S. Paulo.* 17 : 15-9, 1975
- Almeida Prado, A. Aspectos patológicos gerais da doença de Chagas - In: Congresso internacional sobre Doenças de Chagas, Rio de Janeiro, 1959
- Andrade, S.G., Andrade, V., Rocha Filho, F.D. & Barral Netto, M. Análise antigênica de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev.Inst.Med. Trop.S.Paulo*, 23: 245-50, 1981
- Andrade, Z.A. In : *Cytopathology of Parasitic Disease*. London, Pitman, 1983. p.214-233 (Ciba-Foundation Symposium 99),
- Araújo, P.M.F. Isolamento e caracterização de uma proteinose dos lisados de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), Campinas, 1979. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Inst. Biologia.
- Askenase, P.W, & Loveren, H.V. Delayed-Type Hypersensitivity : Activation mast cells by antigen - specific. T- cell factors initiates the

cascade of celular interations. *Immunol.Today*, 4 (9): 259-64, 1983

Austen, K.F. & Brochlehurst, W.E. Anaphylaxis in chopped guinea pig lung. Effect of peptidase substrates and inhibitors. *J. Exp. Med.*, 113 :521-39, 1960

Belluci, S.B.B. Investigaçãõ sobre a atividade biolõgica de uma fraçãõ solúvel de lisados de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909)-Campinas, 1979. Tese (mestrado). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

Brener, Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv.Parasitol.*, 18 : 247-91, 1980

Brener, Z. Why vaccines do not work in Chagas Disease. *Parasitol. Today*, 2: 196-7, 1986.

Carvalho, T.V., Souto-Padron, T. & Souza, W. *Trypanosoma cruzi*: surface charge and freeze fracture of amastigotas. *Exp. Parasitol.*, 59 : 12-23, 1985.

Chagas, C. Nova Trypanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen.sp. agente etiolõgico de nova entidade mórvida do homem. *Mem. inst. Oswaldo Cruz*, 1:159-219, 1909

Chagas, C. Estado atual da Trypanosomiase Americana. *Rev. Biol. Hyg.*, 5: 58-64, 1934

- Clark, R.A.I., Sandler, J.A., Gallin, J.I. & Kaplan, A.P. Histamine modulation of eosinophil migration, *J. Immunol.*, 118 (1): ,1977
- Chiorazzi, N., Fox,D.A. & Kats, D.H. Hapten-specific IgE antibody responses in mice VII. Conversion of IgE "Non Responder" Strains to IgE "Responder" by elimination of suppressor T cell activity. *J Immunol.* 118, (1): 48-54, 1977
- 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. S.Paulo.*, 22 (4): 192-6, 1980
- Corsini,A.C.& Costa, M.G. Immunosuppression in mice infected with *I. cruzi*: II Trypomastigotes crude extract (TCE) suppress the humoral immune response in mice. *Rev. Inst. med. Trop. S.Paulo* , 23: 122-6, 1981
- Daeron, M., Prouvost-Danon, A.& Vaison, G.A. Mast cell membrane antigen and Fc receptors in Anaphylaxis II. Functionally distinct receptors for IgG and IgE on mouse mast cells. *Cells.Immunol.*, 49: 178-89, 1980
- David, B.In: Hypersensibilite Immediate: Le phenomene anaphylactique. Cours D'Immunologie Generale. Paris, 1985 (Institut Pasteur-Apostila)

- Denburg, J., Davison, M. & Bienenstoch, J. Basophil production. *J. Clin. Invest.*, 65: 390-9, 1980
- Dessaint, J.P.L., Bout, D. Wattré, P. & Capron, A. Quantitative determination of specific IgE antibodies to *Echinococcus granulosus* and IgE levels in sera from patients with hydatid disease. *Immunology*, 29: 813-24, 1975
- Dessaint, J.P. Anaphylactic antibodies and their significance. In: Capron, A.R.G. *Clinics in immunology and allergy*. London, Saunders, 1982. v.2, cap.7, p.621-637.
- Dias E. Molestia de Carlos Chagas. *Estudios Hematológicos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 4: 1-7, 1912
- Gazzinelli, R., Morato, M.J., Nunes, R.M.B., Cancado, J.R. & Gazzinelli, G. Immunoregulação idiopática em Doença de Chagas II. Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental., 1987.
- Gomes, L. Ação da Proteinase de *Trypanosoma cruzi* sobre as imunoglobulinas IgE, Ig A e IgM-Humanas. Campinas, 1984 - Tese (mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- Grab-Weege, W., Theobald, K. & König, W. Inhibition of histamine release from rat peritoneal mast cells by a factor from human serum identification as transferrin. *Agents Actions*, 19, 1/2: 10-7 1986.

- Halper, J. & Metzger, H. The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells-VI inhibition by IgG immune complexes. *Immunochemistry*, 13 : 907-13 , 1976
- Hartree, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48 : 422-7 , 1972
- Hudson, L. & Ribeiro dos Santos, R. In: Lersof, M.H., ed. *Immunology for cardiovascular disease* New York, Decker, 1982. p.141-55
- Hudson, L. Autoimmune phenomena in Chronic Chagasic cardiopathy. *Parasitol. Today*, 1 (1) : 6-9, 1985
- Império-Lima, M.R., Joskowicz, M., Coutinho, A., Kipnis, T. & Eisen, H. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque - forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Immunol*, 15 : 201-203, 1985
- Ishizaka, K., Ishizaka, T., Sugahara, T. & Maruyama, S. Studies on the relationship between toxin anaphylaxis and antitoxic immunity. *Jap. J. med Sci. Biol*, 10 : 343- , 1957
- Ishizaka, T., Ishizaka, K., Orang, R.P. & Auten, K.F. The capacity of human immunoglobulin E to mediate the release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) from monkey lung. *J. Immunol.*, 104 (2) : 335-43 , 1970

- Ishizaka, T., Soto, C. & Ishizaka, K. Mechanisms of passive sensitization. III Number of IgE molecules and their receptor sites on human basophil granulocytes. *J. Immunol.*, 111 : 500-11, 1973.
- Ishizaka, T; Adachi, T; Chang, T.S. & Ishizaka, K. Development of mast cells "in vitro". II Biologic function of cultured mast cells. *J. Immunol*, 118 (1) : 211 - 17, 1977
- Ishizaka, K. Twenty years with IgE : From the identification of IgE to regulatory factors for the IgE response. *J. Immunol*, 135 (1) : 492 - 501, 1985
- Ishizaka, T., Sterl, A.R., Daeron, M., Becher, E.L. & Ishizaka, K. Biochemical analysis of desensitization of mouse mast cells. *J. Immunol.*, 135 : 492-501, 1985
- Kaliner, A.M. Is a mast cell a mast cell a mast cell? *J. Allergy and Clin. Immunol.*, 66 (1) : 1-4, 1980
- Kay, A.B. & Austen, K.F. The IgE - mediated release of an eosinophil leukocyte chemotactic factor from human lung. *J. Immunol.*, 107 : 899- 902, 1971
- Keller, R. Concanavalin A, as model "antigen" for the "in vitro" detection of cell-bound reaginic antibody in the rat. *Clin exp. Immunol.*, 13 (1) : 139 - 47, 1973

- Kierszenbaum, F., Knecht, E., Budzko, D.B. & Pizzementi, M.C. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*, *J. Immunol.*, 112 (5): 1839- 44, 1974
- Kierszenbaum, F.& Howard, J.G. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: The importance of antibodies and antibody-forming capacity in the "Biozzi" High and low responder mice. *J. Immunol.*, 116 (5) : 1208-11, 1976
- Kierszenbaum, F. Antibody - dependent killing of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* by human peripheral blood leukocytes. *Am. J. trop. med. Hyg.*, 28 : 965-8, 1979
- Kierszenbaum, F. & Hayes, M.M. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Requirements for cellular destruction of circulating forms of *T. cruzi* in human and murine "in vitro" systems. *Immunolog*, 40 : 61-6, 1980.
- Kierszenbaum, F. Autoimmunity in Chagas Disease: Cause or Symptom? *Parasitol. Today*, 1 (1) : 4 - 6, 1985.
- Kierszenbaum, F. Autoimmunity in Chagas Disease: The debate goes on. *Parasitol Today*, 2 (1) : 22-3, 1986.
- Kierszenbaum, F., Villalta, F. Tai, P.C. Role of inflammatory cells in Chagas disease III-Kinetics of human eosinophil activation upon interaction with parasite *T.cruzi*. *J.Immunol*, 136 (2): 662-6, 1986.

- Kipnis, T.C., James, S.L., Scher, A & David, J.R. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi* II - Antibody - dependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils. *Am. J. trop. med. Hyg.*, 30 (1), 47-53, 1981.
- Kitamura, Y.; Yokoyama, M.; Matsuda, H.; Ohno, T. & Mori, K. Splenic colony-forming cell as common precursor for Tissue Mast cells and granulocytes. *Nature*, 291 : 159-60, 1981.
- Krettli, A.U. & Brener, Z.. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol*, 116 : 755-60, 1976.
- Krettli, A.U. Resposta Imune humoral na doença de Chagas-[Rev]. *In terciência*, 8 (6): 374 - 82 1983.
- Lagunoff, D. & Martin, T.W. Agents that release histamine from mast cells. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 23:331-54, 1983.
- Lee, T.D.G., Swieter, M., Bienenstack, J. & Befus, A.D. Heterogeneity in mast cell populations.[Rev] *Clin., Immunol. Rev.*, 4 (2): 143-99, 1985.
- Lee, T.D.G., Swieter, M. & Befus, A.D. Mast cell responses to Helminth infection.[Rev]. *Parasitol. Today*, 2 (7): 186-91, 1986.
- Levine, B.B. Genetic factor in reagin production in mice. In *Biochemistry of Acute Allergic Reactions*, K.F. Austen and E.L. Becker. eds Backwell, Oxford P.I., 1971.

- Lima, M.S., Oliveira, M.C.; Moreira, R.A. & Prouvost-Danon, A. Metabolic energy dependent exocytosis of mouse mast cells by leetin of *Dioclea grandiflora* (Mast). *Biochem, Pharmacol*, 34 (23):4169-70, 1985.
- Lison, L. Statistique apliquée à la biologie experimentale. La planification de l'experience et l'analyse des résultats. Paris, Gauthier Villars, - 1958. 346 p.
- Liu, F.T., Bohn, J.W., Gerry, E.L., Yamamoto, H, Molinaro, C.A., Scherman, A, Klinman, N.R. & Katz, D.H. Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody : preparation, isolation, and characterization. *J. Immunol*, 124: 2728-37; 1980.
- Lopez, A.F., Ribeiro dos Santos, R & Sanderson C.J. Antibody-dependent cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi* antigen-coated cell lines by eosinophils and neutrophils. *Parasite Immunol.*, 5 :77-84, 1983.
- Lumbreras, V.H., Flores, W. und Escallón, A. Allergische Reaktionen auf stiche von reduviiden und ilvie Bedentrung bei der Chagaskrankheit- *Z. Tropenmed. Parasitol.* 10 : 6-19, 1959.
- Magarinos, C.B. Patogenia de la miocarditis cronica em "la enfermedad de Chagas": V- Reunión de la sociedad Argentina de Patologia Regional del Norte 2 : 902-16, 1929.
- Magro, A.M. Evidence for IgE involvement in Con A induced histamine release from human basophils "in vitro"- *Nature* 249 , 512 , 1974.

- Magro, A.M. & Bennich, H. Concanavalin, A induced histamine release from human basophils "in vitro". *Immunology*, 33 (1) : 51-8, 1977.
- Martin, U.O, Afchain, D., Cesbron, J.Y., Arias, E., Capron, A. Immunoglobulina E Y enfermedad de Chagas. *Medicina*, B.Aires, 46 : 262-66 , 1986.
- Mazingue, C., Dessaint, J.P., & Capron, A. H3- serotonin release: an improved method to measure mast cell degranulations *J.Immunol Meth.*, 21 : 65, 1978.
- Mazingue, C., Camus, D., Dessaint, J.P., Capron, M. & Capron A. "in vitro" and "in vivo" inhibition of mast cell degranulation by a factor from *Shistosoma mansoni*. *Int.Archs Allergy appl. Immunol.*, 63 : 178-189 , 1980.
- Mazza, S., Romaña, C. & Parma, B. Caso agudo de E. de Chagas con lesion cutánea de inoculación. *Mis Est. Pat. Reg.Arg.Nr.*, 30:29 , 1936.
- Mazza, S. y col. Naturaleza histopatológicas de reacciones alérgicas cutáneas provocadas en Chagásicos con lisados de cultivos de *S. cruzi*, *Mis.Est.Pat.Reg.Arg.*, Nr. 64, 3 , 1943.
- McCamesh, J. A heat-labile skin sensitizing activity of mouse serum. *Nature* 214 : 1228-9 , 1967.

- Melo, R.C. & Brener, Z. Tissue Tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J.Parasitol*, 64 (3):475-82 , 1978.
- Mendes, R.P., Takehara, H.A., & Mota, I. *Trypanosoma cruzi* : Homocytotropic antibody response in mice Immunized with unrelated antigens. *Exp.parasitol*, 48: 345-51, 1979.
- Menezes, H. & Alcanta, F.G- Os mastócitos da pele de camundongos infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi* -O Hospital (R.de Janeiro), 68 :187-90 ,1965.
- Morel, C.M.; Deane, M.P. & Gonçalves, A.M. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitol Today*, 2 (4) : 97-101), 1986.
- Mota, I & Peixoto J.M. Asken-sensitizing and thermolabile antibody in the mouse. *Life Sciences*, 5 , 1723-8 , 1966.
- Mota, I. & Wong, D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci.*, 8 :813- 20, 1969.
- Muniz, J. & Azevedo, A.P. Novo conceito da patogenia da Doença de Chagas (*Trypanosomiasis americana*). "O Hospital" (R. de Janeiro), 32 (2):51-52 , 1947.
- Norn, P.; Stahlkov, P.; Jensen, C.; Koch, C.H.R.; Permin, H.; Bog-Hansen, T.C.; Lowenstein, H. & Hoiby N. Histamine and Immunology Intrinsic

asthma and bacterial histamine release via lectin effect. *Agents Actions*, 13 : 2/3, 1983.

Nussensweig, R.S.; Merryman, C. & Benacerraf, B. Electrophoretic separation and properties of mouse anti-hapten antibodies involved in passive cutaneous anaphylaxis and passive hemolysis. *J. Exp. Med.* 120: 315-28, 1964.

Oppenheim, J.J.; Rosenstreich, D.L. & Potter, M. in: *Cellular Functions in Immunity and Inflammation*. Cap. 9 Immunity and inflammation, pg 1, Elsevier North Holland, Inc., 1981.

Ottesen, E.A.; Poindexter, R.W. & Hussain, R. Detection, quantitation and specificity of antiparasite IgE in Human Schistosomiasis mansoni. *Am. J. trop. Med Hyg.*, 30: 1225-37, 1981.

Ovary, Z. Cutaneous anaphylaxis in the albinos rat. *Inst. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 3 : 292- 89 1952.

Pearce, F.L. On the heterogeneity of mast cells. [Rev]. ; *Pharmacology Basel*, 32 (2), :61-71, 1986.

Pereira da Silva, L.H. & Nussensweig, V. Sobre uma cepa T.cruzi altamente virulenta para a camundongo branco. *Folia.clin.Biol. S.P.*, 20: 191-201 ,1953.

Pereira, F.E.L. Estudo quantitativo dos mastócitos na musculatura do esôfago de Chagásicos crônicos. [Rev]. *Inst.Med Trop. S.Paulo*, 14

:30-32, 1972.

Piras,R.; Piras,M.M. & Henriquez, D. Trypanosoma cruzi fibroblastic cells interactions necessary for celular invasion. In: **Cytopathology of Parasitic Disease**, - Pitman, 1983. Ciba Foundation Symposium, n - 99.

Pretlow,T.G., Cassady,I.M. Separation of mast cells in sucessive stages of differentiation using programmed gradient separation. **Am. J. Pathol.**, 61 : 323- 30, 1970.

Prouvost-Danon,A.; Silva Lima,M, & Queiroz-Javierre,M. Active anaphylactic reation in mouse peritoneal mast cells "in vitro". **Life Sci**, 5: 289 - 97, 1966.

Prouvost-Danon,A., Peixoto,J.M. & Queiroz-Javierre,M. Reagin like antibody mediated passive anaphylactic reation in mouse peritoneal mast cells "in vitro". **Life Sci**, 6 : 1793-1801, 1967.

Prouvost-Danon,A.,Peixoto,J.M. & Queiroz-Javierre,M. Antigen-Induced histamine release from peritoneal mast cells of mice producing reagin-like antibody. **Immunology**, 15 : 271-86, 1968.

Prouvost-Danon,A. Mechanisms of antibody mediated histamine release from mouse mast cells.In : Austen and Becker **CIOMS - Symposium on the Biochemistry of the acute allergie reactions**, Oxford, Blackwell, 1968. p.175 - 188.

Prouvost-Danon, A. & Binaghi, R. Reaginic antibody in adult and young mice. *Int archives of allergy and applied. Immunology*, 38 : 648-656, 1970.

Prouvost-Danon, A. Anticorps reaginiques de la souris. Production et propriétés physicochimiques, immunochimiques & biologiques. Paris 1972. These (doctorat) Université Paris VII.

Prouvost-Danon, A.; Silva Lima, M.; Pusztai, A & Bassot, S.A. Mast cell degranulation induced by lectins of *Phaseolus vulgaris*, C.V. processor: effect of IgE sensitization. In: *Endogenous Lectins. Colloque internationale INSERM-CNRS, Aussois, 1984. B13.*

Radermecler, M.; Bekhti, A.; Poncelet, E. & Salmon, J. Serum IgE levels in Protozoal and Helminthic infections. *Int. Archs. allergy applied Immunol.*, 47 : 285- 95, 1974

Rangel, H.A.; Araújo, P.M.F.; Camargo, I.J.B.; Bonfitto, M.; Repka, D.; Sakurada, J.K. & ATTA, A.M. Detecion of a proteinase common to epimastigate, trypomastigote and amastigote of different strain of *Trypanosoma cruzi*. *Tropenmed. Parasit.*, 32 : 87-91, 1981.

Reed, S.G. Adaptive transfer of resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection with T-lymphocyte enriched spleen cells. *Infect. Immun.*, 28 (2) : 404-10, 1980.

Repka, D.; Rangel, H.A.; Otta, A. M.; Gavino, V.A. & Piedraduena, A. Experimental Chagas disease in mice infected with one LD50 of parasi-

te. Rev. Bras. biol., 45 (3) : 309-16, 1985.

Ribeiro dos Santos, R & Ricardo, A.R. Immunologia. IN: Cançado, J.R. e Chuster, M. Cardiopatia Chagásica - B. Horizonte, I - Oficial cap.2, p.10-2, 1985.

Rousseaux-Prevost, R.; Capron, M.; Bazin, H & Capron, A. IgE in experimental Schistosomiasis. II. Quantitative determination of specific IgE antibodies against *S.mansoni*: a follow-up study of two strains of infected rats. Correlation with protective immunity. Immunology, 35 (1) : 33- 9, 1978.

Rowland, E.C. & Sibley, S.M. Eosinophil levels in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Fed. Proc 42: 858, 1983.

Sanderson, C.J. & Lopez, A.F. & Moreno, M.M.B. Eosinophils and not lymphoid k cells kill *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Nature, 268:340-1, 1977.

Santos-Buch, C.A., & Pereira, A.R.L. The immunology of experimental Chagas disease III. Rejection of allogenic heart cells "in vitro". J. Exp. med., 140 : 38-53, 1974.

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.

- Schiks, B.; Austen, K, & Schwartz, L. Activation of rat serosal mast cells by chymase, an endogenous secretory granule protease. *J. Immunol.* 132 : 2571, 1984.
- Sirois, P. Estructural similarities between slow - reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) and arachidonic acid *Clin. Res.*, 26 : 881-5 1978.
- Steinberg, P.; Ishizaka, K & Norman, P.S. Possible role of IgE-mediated reaction in immunity *J. Allergy Clin. Immunol.*, 54 (6) : 359-66, 1974.
- Sullivan, T.J.; Greene, W.C. & Parker, C.W. Concanavalin A - induced histamine release from normal rat mast cells. *J. Immunol.*, 115 : 278-82, 1975.
- Szarfman, A.; Terranova, V.P.; Rennard, S.I.; Foidart, S.M.; Lima, M.F.; Scheimman, I.J. & Martin, G.R. Antibodies to laminine in Chagas 'disease. *J. Exp. Med.*, 155 : 116-71, 1982.
- Tafuri, W.L. & Brener, Z. Lesões dos plexos Meissner e de Auerbaks do intestino do camungondo albino na fase crônica da Trypanosomiase cruzi experimental. *Rev. Inst. Med Trop. S.Paulo* , 9 : 149-54, 1967.
- Tafuri, W.L.; Maria, T.A. & Lopes, E.R. Lesões do plexo mientérico do esôfago, do jejuno e do cólon de Chagasicos crônicos. Estudo no miocárdio Meletiónico. *Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo* , 13 : 76-91, 1971.

- Tafuri, W.L.; Lopez, E.R.; Chapadeiro, E.; Miziara, H.L. & Santos B.G., Raso, P. Miocardite Chagásica aguda humana : provável agressão à célula cardíaca pelo granulócito eosinófilo. *Rev. Soc. bras. Med. Trop.*, 16 : 122-4, 1983.
- Tafuri, W.L., Patogênese da cardiopatia Chagásica In : Cançado J.R. e Chuster, M. *Cardiopatia Chagásica*. Belo Horizonte, I - Oficial, 1985.
- Tafuri, W.L. Patogenia da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 29: 194-9, 1987.
- Takehara, H.A.; Perini, A.; da Silva, M.H. & Mota, I. *Trypanosoma cruzi* : Role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exp. Parasito* 52 : 137-46, 1981.
- Teixeira, A.R.L.; Teixeira, M.L. & Santos-Buch, C.A. The immunology of experimental Chagas disease IV. Production of lesions in rabbits similar to those of Chronic Chagas disease in man. *Am J. Pathol.*, 80 : 163- 78, 1975.
- Teixeira, A.R.L.; Teixeira, G.; Macêdo, V. & Prata, A. *Trypanosoma cruzi*-sensitized T. Lymphocyte mediated 51 CR release from human heart cells in Chagas' disease *Am. J. Trop. Med Hyg.* 27 : 1097-1107, 1978.

Vaz, N.M. & Prouvost-Danon, A. Behaviour of mouse mast cells during anaphylaxis "in vitro". *Progr. Allergy*, 13 : 111-73, 1969.

Vianna, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Carlos Chagas. (Esquizotripanoze humana ou Tiroidite parasitária. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 3 : 276-293, 1911.

Wirth, D.M. & Kierszenbaum, F. Variations in expression of markers by populations of adherent cells from *Trypanosoma cruzi*. infected mice. *J. Protozool.*, 31 (1) : 147-51, 1984.