

Prof.
1513

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO
IMUNOQUÍMICO DAS FORMAS DE CULTIVO
DO TRYPANOSOMA CRUZI
D. Repka

Chagás, 1909

Daria Repka

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO
IMUNOQUÍMICO DAS FORMAS DE CULTIVO
DO TRYPANOSOMA CRUZI

Tese de Doutorado
apresentada ao Institut
to de Biologia

Orientador: H. A. Rangel

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas
Campinas, 1973



Vivemos em um sistema dinâmico em que idéias, experiências e realizações se sucedem na tentativa constante, do aperfeiçoamento através do ensino que é transmitido de uns a outros. Nenhum trabalho é realizado sem uma finalidade, sem um estímulo ou sem a cooperação mútua.

A apresentação deste trabalho, portanto, representa também o acúmulo de conhecimentos que nos foram transmitidos através da família, amigos, professores e impressos. Longa seria a lista de nomes e entidades que permitiram direta ou indiretamente a realização deste trabalho. No entanto, sem minimizar o apoio recebido dos demais, gostaríamos de salientar três nomes que marcaram definitivamente uma carreira: Prof. Dr. João Xavier Vianna e Profa. Dra. Irene Mikoszevska, da Universidade Federal do Paraná, a quem devemos as primeiras orientações dentro da Microbiologia e Imunologia e o grande estímulo para a carreira Universitária, sem o qual não teríamos tido a oportunidade de conhecer o Prof. Dr. Humberto de A. Rangel, que vem nos ensinando, através de uma orientação amiga.

Este trabalho foi desenvolvido com o auxílio fornecido pelas seguintes Instituições:

UNICAMP Auxílio ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia

FAPESP Auxílio ao Programa de Imunologia das Doenças Parasitárias

CNPq Auxílios aos Programas de Pesquisas do Departamento de Microbiologia e Imunologia

O.M.S. - Divisão de Imunologia - Auxílio para aquisição de periódicos

BIREME Fornecimento de cópias xerográficas

A Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e o autor, externam os seus agradecimentos às Instituições acima e aos Departamentos de Histologia, Farmacologia, Genética Médica, Bioquímica e Microbiologia, pela colaboração durante a execução deste trabalho.

Í N D I C E

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	6
RESULTADOS	
1. Estudos realizados com os sedimentos	13
1.1. Exame microscópico	13
1.2. Extração de lípidos	13
1.3. Antigenicidade do sedimento	16
2. Estudos realizados com os extratos brutos	19
2.1. Análise química	19
2.2. Análise eletroforética	20
2.3. Antigenicidade dos extratos brutos	22
3. Fracionamento dos extratos brutos	28
3.1. Fracionamento da membrana filtrante	28
3.2. Fracionamento por cromatografia de exclusão ..	33
3.3. Fracionamento pela precipitação no ponto iso- elétrico	38
4. Comparação entre as frações A obtidas por cromato- grafia em coluna de Sephadex e as frações (PS) ob- tidas por precipitação no ponto isoelétrico	41
DISCUSSÃO	46
RESUMO E CONCLUSÕES	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

INTRODUÇÃO

"L'étude de l'antigénicité montre, que nous deverons maintenant faire appel à la biologie moléculaire du parasite pour accéder à la comprehension des mécanismes que régissent les relations hôte-parasite et nous permettre une approche rationnelle des phénomènes immunitaires et des moyens de les susciter". (Capron, 1970)

"Identification of antigens crucially involved in host parasite relationships would undoubtedly provide the greatest advances in the study of immunity to parasites" (Ogilvie, 1970).

tência por vezes extremamente longa (Laranja et al., 1956; Salgado et al., 1962). A eliminação completa do parasito ou a morte do hospedeiro parece refletir a ocorrência de acidentes circunstanciais.

Numerosas teorias têm sido elaboradas para explicar esse possível equilíbrio. Pertencentes ao mesmo Phylum o hospedeiro e o parasito, poderiam ter uma comunidade de determinantes antigênicos (Dineen, 1963a, 1963b; Damian, 1964; Capron et al., 1968; Smither et al., 1969), que minimizaria a resposta imunitária. Por outro lado uma evolução filogenética paralela (regras parasitofiléticas) poderia permitir a adaptação mais estrita por dupla modificação parasito-hospedeiro devido à seleção natural (Sprent, 1959; 1969) conduzindo ao estabelecimento de estados de imunotolerância incompetência imunológica (Jenkin, 1963; Schad, 1966; Damian, 1967) ou de imunossupressão (Adler, 1958; Fisher, 1963).

A despeito da existência de várias observações em favor dessas teorias, tais como a existência de antígenos comuns a parasito e ao hospedeiro (Kagan et al., 1963; Damian, 1964, 1967) ou a ocorrência de fenômenos de facilitação imunológica (Capron et al., 1969, 1970), o mecanismo de interação parasito-hospedeiro ainda não foi elucidado.

A complexidade do parasito é um dos fatores que dificultam esse estudo. Contrastando com as bactérias, os parasitos exibem um ciclo vital que envolve, via de regra, obrigatoriamente, diferentes hospedeiros. Profundas alterações morfológicas e fisiológicas são observadas em cada fase do ciclo (Deane, 1968), permitindo a adaptação do parasito a hospedeiros filogeneticamente bastante afastados entre si. Sem sombra de dúvida essas alterações incidem também na composição antigênica do parasito conforme o comprovam os trabalhos sobre Hemonchus contortus, Schistosoma mansoni, Trichinellas spirallis (OMS, 1965).

Além de possuir um ciclo vital complexo, algumas observações indicam que o parasito tem a capacidade de adaptar-se às defesas orgânicas do hospedeiro, quer por fenôme-

nos aproximados à facilitação imunológica quer por uma modificação dos determinantes antigênicos de superfície. Os estudos de amostras de Trypanosoma brucei colhidos durante surtos de parasitemia que ocorrem num mesmo indivíduo, mostra a existência de diferenças antigênicas entre essas amostras (Franke, 1905; Ritz, 1914; Lourie and O'Conner, 1937; Osaki, 1959; Gray, 1962) que no entanto, tendem a reverter a um tipo antigênico primitivo, se repetidamente passados pela Glossina (Broom and Brown, 1940; Gray, 1962, 1965; Miller, 1965; Vickerman, 1968). Este fato pode ser aproximado da verificação "in vitro" de que o Paramecium aurelia exhibe alterações reversíveis na sua composição antigênica, quando submetido a pressão seletiva, gradualmente crescente, de anticorpos específicos (Beale, 1957; Beisson and Sonnebain, 1965).

A análise crítica dos exemplos coligidos sobre a biologia do parasito e do mecanismo de interação entre este e os seus hospedeiros evidencia que os estudos sobre esta interação não poderão progredir sem uma análise prévia dos constituintes antigênicos e de sua função (Soulsby, 1963; Brown, 1967). A falta dessa análise, tem sido reconhecida como um fator decisivo no progresso dos nossos conhecimentos sobre o mecanismo de interação (Kagan, 1967; Roy and Rittz, 1970). As recomendações de grupos de peritos, (OMS, 1965) e várias declarações de especialistas no assunto, (Capron, 1970; Desowitz, 1970; Ogilvie, 1970) insistem na necessidade da investigação ao nível molecular dos constituintes antigênicos dos parasitos.

A carência de informações sobre os antígenos de Trypanosoma cruzi tem sido considerada como um óbice de fundamental importância na interpretação do mecanismo de interação deste parasito com os seus hospedeiros (Kagan, 1967; OMS, 1965). Vários aspectos destas interações permanecem desconhecidos a despeito da numerosa bibliografia acumulada (v. g. IBBD; Miles and Rouse, 1970) a partir da descoberta do T. cruzi (Chagas, 1909).

Numerosos dados sugerem que os constituintes an-

tigênicos do parasito e os anticorpos específicos possam ter um papel relevante na patogenia dessa doença (Vianna, 1911; Torres, 1917; Okumura et al, 1960; Pizzi, 1963; Tarrant et al, 1965). Contudo, a comprovação dessa hipótese depende de um estudo prévio dos constituintes antigênicos, a respeito dos quais dispomos de apenas escassas informações.

Os estudos sobre os antígenos T. cruzi, iniciados por Guerreiro Machado (1913), têm sido orientados, na maioria das vezes no sentido de estabelecer técnicas diagnósticas para a doença de Chagas. Muniz e Freitas (1944), isolaram uma fração polissacarídica capaz de precipitar com os soros de pacientes chagásicos. Fife e Kent (1960), separaram dos extratos brutos de T. cruzi uma fração protéica e uma polissacarídica. As reações dessas frações com soros de pacientes foram investigadas pelas técnicas de fixação do complemento. Tarrant e col. (1965), demonstraram a presença no meio de cultivo de um componente não dialisável considerado como exoantígeno, capaz de fixar complemento frente a soros de pacientes de doenças de Chagas. Esse exoantígeno, provavelmente de natureza glicoprotéica, é capaz de produzir anticorpos quando inoculado em coelhos.

Alguns autores utilizaram técnicas imunoquímicas para o estudo das relações antigênicas entre diferentes amostras de T. cruzi (Nussenzweig et al, 1962, 1963; Cappa e Kagan, 1969) ou relações antigênicas entre T. cruzi e diferentes espécies de tripanossomos (Dupouey e Marechal, 1966).

A falta de um estudo sistemático dos antígenos do T. cruzi e a diversidade de técnicas empregadas tornam difícil a comparação dos resultados obtidos por diferentes autores.

Visando contribuir para um melhor conhecimento da interação deste parasito com seus hospedeiros, iniciamos um programa de trabalho que tem por finalidade um estudo dos constituintes antigênicos das diferentes formas do ciclo vital do T. cruzi. O presente trabalho apresenta parte dos

resultados obtidos na investigação dos constituintes antigênicos das formas de cultivo deste parasito.

M A T E R I A L E M É T O D O S

Amostra de T. cruzi: A amostra de T. cruzi utilizada neste trabalho nos foi cedida pelo Prof. Mario Camargo, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Meio de cultura: O meio de Yaeger (LIT) preparado de acordo com as indicações de Fernandes e Castellani (1966) foi utilizado para o cultivo do T. cruzi. Porções de 5 ml de inóculo eram semeados em 20 ml de meio de cultura e mantidos em estufa a 28° durante uma semana.

Suspensão de tripanossomos: Cultura de 7 dias em meio de Yaeger, eram lavadas 3 vezes com solução NaCl 0,15 M em centrífuga refrigerada a 50, a 1.700 g durante 15 minutos. O sedimento era ressuspenso em solução salina fisiológica em um volume correspondente a 1:10 do volume original da cultura. O número de tripanossomos dessa suspensão era então determinado espectrofotometricamente.

Determinação do número de tripanossomos. Amostras da suspensão de tripanossomos, convenientemente diluídas em solução salina formolada foram utilizadas para a determinação do número de microorganismos. A solução salina formolada era preparada com formol neutralizado, diluído em NaCl 0,15 M de modo a se obter a concentração final de 0,5%. O número de tripanossomos por ml das diferentes diluições de uma mesma suspensão de germes foi inicialmente determinado em câmara de Neubauer, realizando-se contagens em triplicata. A densidade ótica dessas suspensões foi determinada em espectrofotômetro Colemann Júnior $\lambda=550$ em cubetas 12x75, estabelecendo-se deste modo uma curva de referência relacionando

densidade ótica e número de tripanossomos. As determinações de rotina do número de germes das suspensões eram feitas espectrofotometricamente, utilizando-se a curva de referência abaixo indicada.

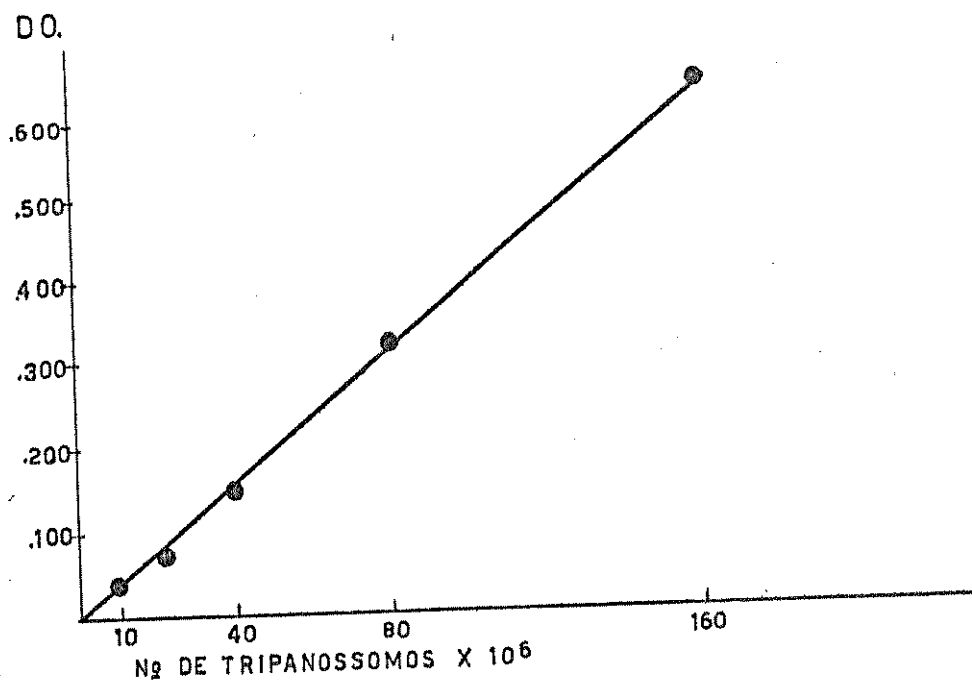


Figura 1. Relação entre número de tripanossomos e densidade ótica.

Suspensão padronizada de tripanossomos. Suspensões padronizadas foram preparadas diluindo-se convenientemente as suspensões de tripanossomos de modo a se obter 26×10^6 microorganismos/ml. Essas diluições eram feitas em solução fisiológica e mantidas em banho de gelo até o momento de uso.

Imune-soros. Os imune-soros anti T. cruzi foram obtidos em coelhos, imunizando-se, inicialmente, com tripanossomos mortos pela ação do formol, e a seguir, com tripanossomos vivos. As suspensões de tripanossomos mortos foram preparadas em solução salina formolada de modo a se obter 26×10^6 microorganismos por ml. Essas suspensões eram mantidas a 0° por 10 minutos. A seguir os tripanossomos eram lavados 3 vezes,

em solução salina fisiológica, a 5° e ressuspensos nesta solução de modo a se obter uma concentração igual a 26×10^6 tripanossomos por ml.

Os animais foram inoculados inicialmente no coxim plantar de cada pata com 0,5 ml da mistura em partes iguais de adjuvante incompleto de Freund e suspensão de tripanossomos mortos. Quinze dias após, os animais receberam, durante 3 semanas consecutivas, uma injeção endovenosa de 5 ml da suspensão de tripanossomos mortos. Uma semana após a última inoculação era feita a sangria de prova. Os animais que apresentavam anticorpos, foram inoculados por via endovenosa, uma vez por semana, durante 3 meses com 5 ml de suspensão de tripanossomos vivos. Uma semana após a última inoculação, os animais eram sangrados a branco. Os soros obtidos eram inativados à 56° durante 30 minutos e conservados a -20° até o momento de uso.

Absorção de soros. Quando necessário, os imune-soros foram absorvidos com formas de cultivo do T. cruzi. Porções de 10 ml de suspensão de germes, preparadas como acima indicado, eram centrifugadas a 5°, 1.700 g, 15 minutos. O sedimento obtido era ressuspense em 1 ml do imune-soro e a suspensão conservada à temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, a suspensão era centrifugada a 5°, 1700 g, durante 15 minutos e o soro separado do sedimento. Este processo era repetido até não se observar mais aglutinação das formas de cultivo.

Extração dos antígenos. Os antígenos foram extraídos utilizando-se dois diferentes processos: 1- Pela ação do congelamento e descongelamento sucessivos; 2- Pela ação do desoxicolato de sódio.

1- Ação do congelamento e descongelamento sucessivos. Suspensões contendo 56×10^7 tripanossomos foram congelados a -20° e descongeladas à 37° por três vezes consecutivas. O material era então centrifugado à 5°, 3020 g, durante 15 mi

nutos para separar o sedimento (SC) da fração solúvel que será doravante denominada de extrato bruto (EBC). Quando necessário SC e EBC eram conservados a -20° até o momento de uso.

2- Ação do desoxicolato de sódio. Experiências preliminares foram realizadas visando determinar a menor quantidade de desoxicolato de sódio capaz de lisar completamente todos os organismos de uma suspensão padronizada de tripanossomos. Em vista dos resultados obtidos, a seguinte técnica foi utilizada para a extração dos antígenos. Aliquotas de 10 ml das suspensões contendo 56×10^7 tripanossomos/ml eram centrifugadas à 1.700 g , durante 15 minutos à 5° . O sedimento, ressuspenso em 10 ml de uma solução aquosa de desoxicolato de sódio a 0,1% recentemente preparada, era incubado em banho de gelo durante 10 minutos. A seguir, as suspensões eram dialisadas durante uma hora, com agitação constante em banho de gelo, contra um litro de solução salina fisiológica, renovando-se o líquido de diálise após 30 minutos. O material era então centrifugado a 5° , 3020 g , durante 15 minutos. O sedimento SD e o sobrenadante EBC eram separados e quando necessário conservados a -20° até o momento de uso.

Concentração de antígenos. Os antígenos extraídos das formas de cultivo do T. cruzi, foram concentrados, quando necessário, por liofilização ou através de membranas filtrantes. Tanto os antígenos quanto o material concentrado eram conservados a -20° até o momento de uso.

Solventes orgânicos. A acetona, foi redestilada a 56° no laboratório. O éter, desembaraçado de peróxido por lavagens sucessivas com solução saturada de sulfato ferroso e livre de álcoois e água pela adição de sódio metálico, era destilado a 35° em presença de sulfato ferroso seco e conservado a -20° até o momento de uso.

Cromatografia em Sephadex. As recomendações de Flodin, (1962)

foram seguidas durante a execução das experiências de cromatografia em Sephadex G 200 (Pharmacia Upsala). Colunas de 42cm x 2cm, contendo este material equilibrado com solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH 7,2, foram utilizadas para analisar porções de 5 ml de antígeno concentrado.

Cromatografia em camada delgada. Foram seguidas as instruções Kirchner, (1967), na execução das técnicas de cromatografia em camada delgada, segundo Stahl. Como eluente, foi utilizada a mistura: éter de petróleo, 80 ml; acetato de etila, 20 ml; ácido acético, 0,5 ml.

Como reveladores foram utilizadas as seguintes soluções, preparadas segundo as indicações do Departamento de Histologia da UNICAMP: solução saturada de sudan black em etanol a 60%; solução de ácido fosfórico a 20% em água; solução de ácido fosfomolibílico a 10% em etanol; oxidação pelo cloro nascente 30 minutos e aspersão de solução de Toluídina saturada em ácido acético 2%.

Spot test. A técnica do "spot test" foi realizada segundo as indicações de Lison, (1960).

A pesquisa de polissacarídes foi feita utilizando-se o reativo de Schiff, P.A.S. antrona, preparadas segundo as indicações de Lison, (1960).

Eletroforese. As eletroforeses em gel de agar foram realizadas segundo as indicações de Grabar e Burtin, (1964) em placas de 9 x 4 com uma camada de 3 mm de espessura de agar em tampão veronal pH 8.4 $\mu=0,025M$ com gradiente de potencial de 10 volts/cm em tempo de uma hora e 10 minutos.

Colorações. As colorações em gel de agar para a pesquisa de carboidratos, lípidos e proteínas, foram realizadas segundo as indicações de Uriel, (1971). As colorações de Gram, Giemsa, foram realizadas segundo as indicações de Wadsworth (1943).

Reação de aglutinação. Porções de 0,1 ml de imune-soro previamente inativado e convenientemente diluído eram misturadas a 0,1 ml de solução fisiológica e 0,2 ml da suspensão de tripanossomos (26×10^6). Esta mistura, feita em tubos 12x120, era deixada à temperatura ambiente durante uma hora. Após esse período o título aglutinante do imune-soro era determinado.

Reações de inibição da aglutinação. As experiências de inibição da aglutinação foram realizadas utilizando-se titulações em bloco em que diferentes diluições do soro eram testadas contra diferentes concentrações de antígenos.

Porções de 0,1 ml de imune-soro e 0,1 ml de antígeno eram misturados e deixados à temperatura ambiente uma hora. Após este período, 0,2 ml da suspensão padronizada de tripanossomos vivos eram adicionados. Após um novo período de incubação de uma hora à temperatura ambiente, a leitura era realizada.

Precipitação em meio gelificado. As técnicas de imuno-difusão foram realizadas em gel de agar a 1% em meio salino isotônico de pH 7.2, 7.3 segundo Ouchterlony, (1967). As imunoeletroforeses foram realizadas conforme as indicações de Grabar e Burtin, (1964) em placas de vidro de 12x8 cm, contendo uma camada de 3 mm de espessura de agar a 1% em tampão veronal, pH 8.4 $\mu=0,025$ ~~K~~ gradiente de potencial 10 volts/cm, tempo de uma hora e 10 minutos.

Reação de fixação do complemento. As reações de fixação de complemento eram executadas conforme as instruções de Mayer et al. (1948), utilizando-se os seguintes volumes de reagentes: 1 ml de antígeno, 1 ml de imune-soro, 1 ml de uma diluição de C contendo 5CH₅₀/ml, 1 ml de solução tampão e 1 ml de hemácias sensibilizadas com amboceptor.

Reações de floculação. As reações de floculação foram realizadas utilizando-se a técnica de Kahn, segundo as indica-

ções de Oliveira Lima e Dias da Silva, (1970).

Dosagem de Proteínas. As proteínas totais foram dosadas utilizando-se a técnica do biureto segundo Weichselbaun, (1946).

Dosagem do N total. O N total foi determinado utilizando-se a técnica do microkjeldahl segundo indicações de Kabat e Mayer, (1961).

Dosagem de polissacárides. Os polissacárides foram dosados utilizando-se a técnica de Dubois et al., (1956).

R E S U L T A D O S

As suspensões de T. cruzi, submetidas aos processos de extração dos antígenos, forneceram uma fração solúvel (EBC ou EBD) e um sedimento (SC ou SD). Os sedimentos e as frações solúveis foram estudados conforme indicado a seguir.

1. Estudos realizados com os sedimentos. Os sedimentos SC e SD obtidos pelas técnicas indicadas em material e métodos, foram lavados três vezes com salina fisiológica gelada e submetidos às seguintes experiências:

1.1. Exame microscópico. Esfregaços dos SC e SD foram preparados e submetidos às colorações de Gram, Giemsa, sudan black, amido schwartz e às reações para pesquisa de ácidos nucleicos (Feulgen) e polissacárides (NADI).

O exame microscópico dos SC e SD, após colorações pelos métodos acima indicados, mostrou a presença de elementos aproximadamente esféricos em meio a um abundante material amorfo. Este material amorfo apresentou-se levemente acodófilo ao Giemsa, não fixou o complexo iodo-pararosanilina, fixou o sudan black e o amido schwartz e deu reação positiva à pesquisa de polissacárides. Os elementos aproximadamente esféricos eram Gram positivos, comportaram-se como elementos basófilos na coloração de Giemsa, fixaram o sudan black e o amido schwartz e deram resultados positivos à pesquisa de polissacárides e ácidos nucleicos.

1.2. Extração de lípidos de SC e SD. Os SC e SD obtidos de porções de 10 ml de suspensão de tripanossomos, foram delipídidos a -20° utilizando-se a seguinte técnica: O sedimento

era suspenso em 5 ml de acetona a -20° . Após um repouso de 15 minutos, o sobrenadante era decantado e recolhido. Esta operação era repetida, usando-se os seguintes solventes: 5 ml de acetona, 5 ml de uma mistura em partes iguais de acetona e éter e 5 ml de éter (duas vezes). Após a extração com os solventes, o sedimento delipidado era secado a vácuo e armazenado em dessecadores, na geladeira.

1.2.1. Pesquisa de lípidos. Os sobrenadantes obtidos conforme indicado no item anterior foram misturados, filtrados em papel Whatmann nº 1 e evaporados a 56° . O resíduo obtido foi dissolvido em éter. Esta solução foi filtrada em papel Whatmann nº 1 e, após evaporação do éter, a fração lipídica obtida foi conservada ao abrigo da luz, à temperatura ambiente.

A pesquisa realizada em porções de 5 mg de diferentes partidas da fração lipídica de SC ou SD não revelou a presença de N. A pesquisa para polissacarídeos, utilizando-se a técnica de "spot test" e os reativos de PAS, Schiff, antrona e 2,4,dinitrofenilhidrazina, deu resultados negativos.

A análise cromatográfica, em camada fina de sílica gel, utilizando-se como reveladores luz ultra violeta, vapores de iodo, solução de sudan black, ácido fosfórico, ácido fosfomolibdico e Cl-o-toluidina, mostrou que a fração lipídica é constituída pelo menos por seis componentes, conforme indicado na tabela 1. Um desses componentes apresentou R_f e reações semelhantes às apresentadas pelo colesterol.

1.2.2. Pesquisa de proteínas e polissacarídeos nos SC e SD delipidados. Tentativas de solubilização desse sedimento com NaOH 0,1N a frio, foram realizadas. Contudo, as soluções obtidas eram opalescentes, o que impedia as estimativas espectrofotométricas de proteínas pelo método do biureto. Por esta razão, o teor de proteínas foi estimado através da determinação do N total.

Os resultados apresentados na tabela 2 mostram

TABELA 1

Resultados da análise cromatográfica da fração lipídica proveniente de SD

Componentes	Rf	Reveladores						
		V	U	I	S	F	M	T
1	0	-	-	+	-	-	-	-
2	0,03	-	-	-	-	±	-	-
3	0,3	-	-	-	-	++	++	-
4	0,4	-	++	±	-	-	+	-
5	0,57	-	+	±	-	-	-	-
6	0,91	-	-	±	+	±	++	-
Coolesterol	0,3	-	-	+	+	+++	++++	-

V = luz visível
U = luz ultra violeta
I = Vapores de Iodo
S = Sudan Black

F = Ácido Fosfórico
M = Ácido Fosfomolibdico
T = Cl-O-Toluidina

TABELA 2

Resultados obtidos nas dosagens de polissacárides e N total dos SC e SD delipidados

Amostra	N Total/mg	Polissacárides/mg
SD 02	0,061	0,044
SD 03	0,060	0,050
SD 04	0,050	0,0473
SD 05	0,055	0,050
SC 06	0,058	0,049
SC 07	0,050	0,043
SC 08	0,066	0,044
SC 10	0,060	0,050

que não houve diferenças apreciáveis entre os resultados obtidos para os SC e SD.

1.3. Antigenicidade do sedimento. A antigenicidade dos sedimentos obtidos foi pesquisada utilizando-se os métodos indicados a seguir.

1.3.1. Reação de precipitação. O pó obtido dos SC e SD delipidados era ressuspenso em solução fisiológica (1 mg/ml) e deixado a 4° durante 24 horas, com agitação ocasional. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 5°, 3020 g, por 15 minutos. Com o sobrenadante foram realizadas reações de precipitação, utilizando-se a técnica de "ring test".

Após 15 a 20 minutos de contacto com os diferentes imune-soros, obtivemos reações fracamente positivas com todas as amostras testadas.

1.3.2. Reação da inibição da aglutinação. A presença, nos sedimentos delipidados e não delipidados, de antígenos capazes de inibir a reação de aglutinação das formas vivas de cultivo, foi investigada como a seguir.

Porções de 1 ml de imune-soro anti formas de cultivo do T. cruzi foram misturadas a 5 mg de sedimento delipidado. Essas misturas foram incubadas a 37°, durante 1 hora e posteriormente, em banho de gelo, a 4° por duas horas. Os sobrenadantes obtidos após centrifugação das misturas a 5°, 3020 g, durante 15 minutos foram testados em experiências de aglutinação.

Os SC e SD não delipidados, provenientes da lise de porções de 10 ml da emulsão de tripanossomos, foram lavados 3 vezes em salina fisiológica gelada. Esses sedimentos lavados foram utilizados para absorver porções de 1 ml de imune-soro, de acordo com a técnica acima indicada.

Os resultados obtidos nas reações de aglutinação mostraram que ambas as frações absorvem anticorpos aglutinantes. Um dos resultados obtidos acha-se exemplificado

na tabela 3.

TABELA 3								
Reação de aglutinação das formas vivas do cultivo do <i>T. oxoni</i> com o imune-soro nº 3 absorvido com SC e SD delipidado e não delipidado								
Imune-soro nº 3	Diluição do imune-soro							Controle
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	
Absorvido com SD delipidado	+	+	+	+	-	-	-	-
Absorvido com SC delipidado	+	+	+	+	-	-	-	-
Absorvido com SD não delipidado	+	+	+	-	-	-	-	-
Absorvido com SC não delipidado	+	+	+	±	-	-	-	-
Não absorvido	+	+	+	+	+	±	-	-

1.3.3. Reação de floculação. Com a fração lipídica obtida a partir dos SC e SD, foram realizadas reações de floculação. Os lípides foram dissolvidos em álcool absoluto (1 mg de lípide para 1 ml de álcool) e emulsionados com 1,5 ml de salina fisiológica. Esta emulsão foi testada com diferentes imune-soros, tendo como controle, soros de coelhos normais e salina fisiológica.

Alguns dos resultados obtidos acham-se apresentados na tabela 4, onde se pode verificar que todos os imune-soros ensaiados reagiram com a fração lipídica. Estudos realizados com diferentes preparações da fração lipídica mostraram que a intensidade da reação variava com a amostra de lípide utilizada. Não foram observadas diferenças apreciáveis entre as frações provenientes do SC e SD.

Pode-se verificar também que o soro de coelho normal número 1, utilizado como controle, deu reação fracamente positiva. Reações semelhantes foram observadas entre

TABELA 4
Reação de floculação com a fração lipídica do SD e diferen-
tes soros

Soros	ml de antígeno		
	0,05	0,025	0,0125
Imune-soro nº 1	+	+	+
Imune-soro nº 2	++	++	++
Imune-soro nº 3	++	++	++
Imune-soro nº 4	+	+	+
Imune-soro nº 5	+	+	+
Soro normal de coelho nº 1	+	+	+
Soro normal de coelho nº 2	-	-	-
Controle	-	-	-

este soro e diferentes preparações da fração lipídica. Contudo, a investigação, utilizando-se os soros de 9 diferentes coelhos normais, deu resultados sistematicamente negativos.

1.3.4. Reação de fixação do complemento. Diferentes preparações da fração lipídica de SC e SD foram ensaiadas em reações de fixação do complemento.

A suspensão lipídica usada como antígeno foi preparada de maneira idêntica à descrita em 1.3.3. Diferentes concentrações deste antígeno foram testadas em titulações em bloco, contra diferentes diluições de um imune-soro. As misturas foram incubadas a 37°, durante 30 minutos, na presença de 5 CH₅₀. Após esse período, hemácias sensibilizadas eram adicionadas ao sistema. As leituras eram realizadas após 45 minutos de incubação a 37°.

A tabela 5 apresenta os resultados obtidos em

TABELA 5

Reação de fixação do complemento com a fração lipídica do SD e o imune-soro nº 4
(resultados expressos em % de lise)

Diluição do imune-soro nº 4	Microgramas de antígeno/ml de soro						Controle
	100	50	25	12,5	6,25	3,12	
1:1	0	0	0	0	0	0	66,2
1:2	0	0	0	0	0	0	62,5
1:4	0	0	0	0	11,2	21,2	100
1:8	32,5	32,5	57,5	65	67,5	67,5	100
1:16	92,5	95	100	100	100	100	100
Controle	100	100	100	100	100	100	100

uma das experiências realizadas. Os resultados apresentados nesta tabela mostram que a fração lipídica testada era capaz de fixar o complemento frente ao imune-soro testado.

Algumas amostras da fração lipídica do SC e do SD, no entanto, mostraram-se fortemente anticomplementares, não permitindo a verificação da ocorrência de reação antígeno anticorpo por esta técnica de reação.

2. Estudos realizados com os extratos brutos (EBC EBD). Os EBC e EBD obtidos foram analisados como indicado a seguir. Quando necessário, estes extratos eram concentrados por ultra-filtração.

2.1. Análise química. O teor de proteínas e polissacárides, de diferentes amostras de EBC e EBD foi determinado utilizando-se as técnicas descritas em material e métodos.

Os dados apresentados na tabela 6, representam a média de duplicatas cuja variação era igual ou inferior a 10%. Os resultados apresentados nesta tabela mostram que não houve diferenças apreciáveis entre os resultados encontrados nas dosagens dos EBC e EBD.

Amostra	Tripanossomas x 10 ⁶ /ml	mg Prot/ml	mg Polis/ml	Relação Prot/Polis
EBD 01	35,9	1,9	0,160	11,8
EBD 02	39,4	1,6	0,140	11,4
EBD 03	39,8	1,7	0,160	10,6
EBD 04	40,7	2,0	0,180	11,1
EBD 05	44,0	2,0	0,200	10,0
EBC 06	35,0	1,1	0,118	9,3
EBC 07	35,9	1,5	0,148	10,1
EBC 08	37,2	1,1	0,118	9,3
EBC 09	39,5	1,7	0,160	10,6
EBC 10	40,5	1,8	0,180	10,0

2.2. Análise eletroforética dos EBC e EBD. Diferentes concentrações de EBC e EBD foram submetidas a eletroforese em gel de agar. A pesquisa de lípidos, proteínas e polissacáridos, após eletroforese, foi realizada segundo as instruções de Uriel, (1971).

As figuras 2, 3 e 4 apresentam alguns dos resultados obtidos. Pode-se observar que EBC e EBD contêm pelo menos três componentes coráveis pelo amido schwartz. Contudo, existem diferenças entre o padrão eletroforético de EBC e o de EBD. Pode-se igualmente constatar a existência de diferenças entre os padrões eletroforéticos dos componentes lipídicos e polissacarídicos do EBC e os do EBD.

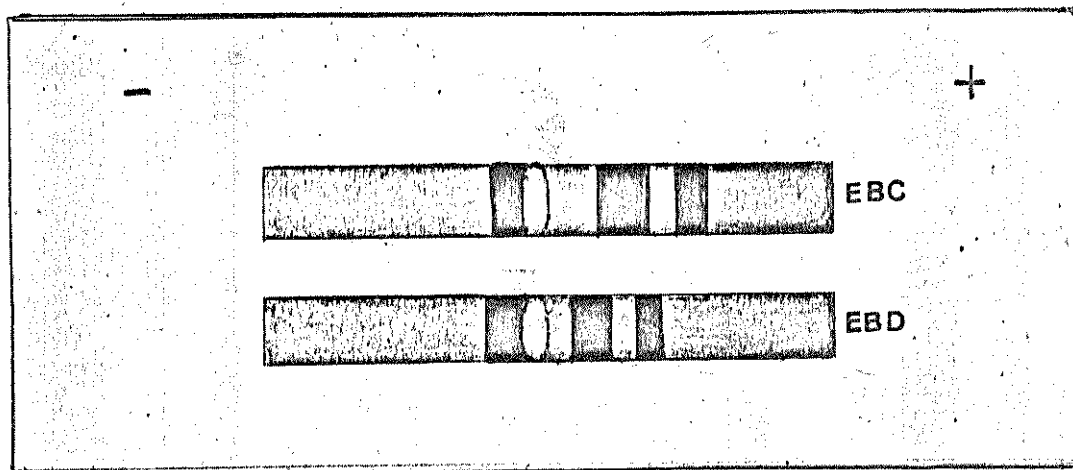


Figura 2. Eletroforese dos EBC e EBD com 5 mg prot/ml e corados pelo amido schwartz

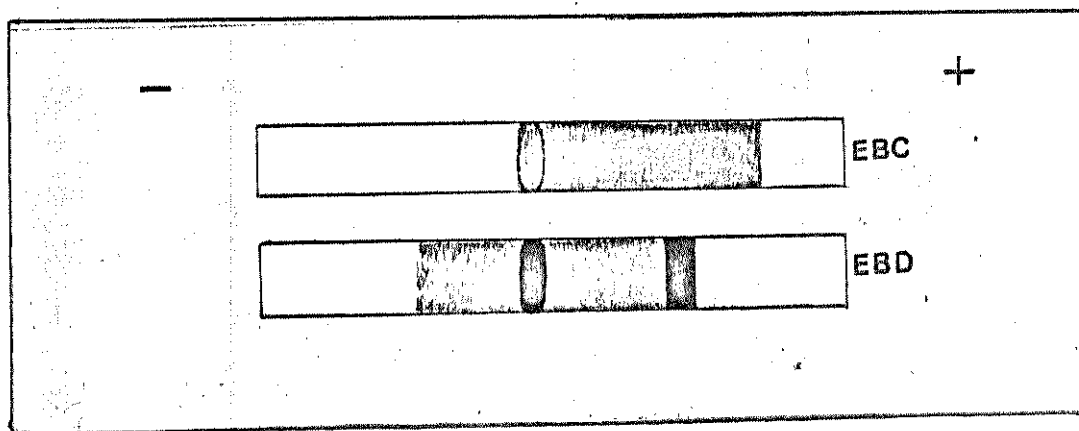


Figura 3. Eletroforese dos EBC e EBD com 5mg prot/ml corados pelo sudan black.

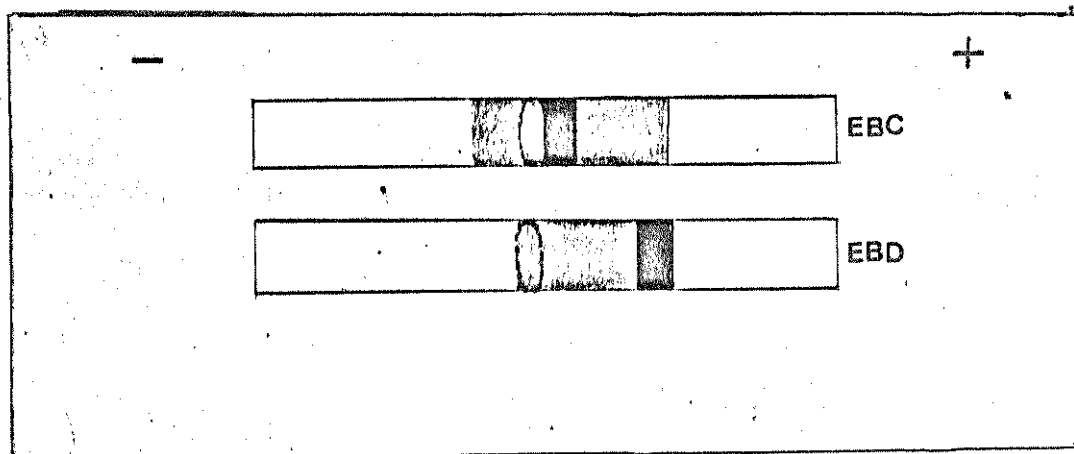


Figura 4. Eletroforese dos EBC e EBD com 5 mg prot/ml corados pelo reativo de NADI.

2.3. Antigenicidade dos extratos brutos (EBC e EBD). A pesquisa de antígenos nos EBC e EBD foi realizada estudando-se as reações de precipitação em meio gelificado (teste de Ouchterlony, imunoeletroforese) e as reações de inibição da aglutinação.

2.3.1. Reação de precipitação em meio gelificado. Diferentes preparações de EBC e EBD foram testadas, em concentrações variáveis, com os imune-soros anti T. cruzi, utilizando-se a técnica de dupla difusão (teste de Ouchterlony). Controles foram realizados testando-se concomitantemente soros de coelhos normais contra os EBC e EBD e imune-soros contra o meio de cultura ou seus constituintes.

Os soros normais examinados não reagiram com os extratos testados (EBC ou EBD), enquanto que todos os imune soros disponíveis precipitaram quando testados com EBC e EBD.

Nas diferentes experiências realizadas observou-se que o número de sistemas precipitantes variou de acordo com o imune-soro e a concentração de antígenos.

Pode-se observar, na figura 5, que um padrão de identidade resultou sempre que EBC e EBD foram comparados.

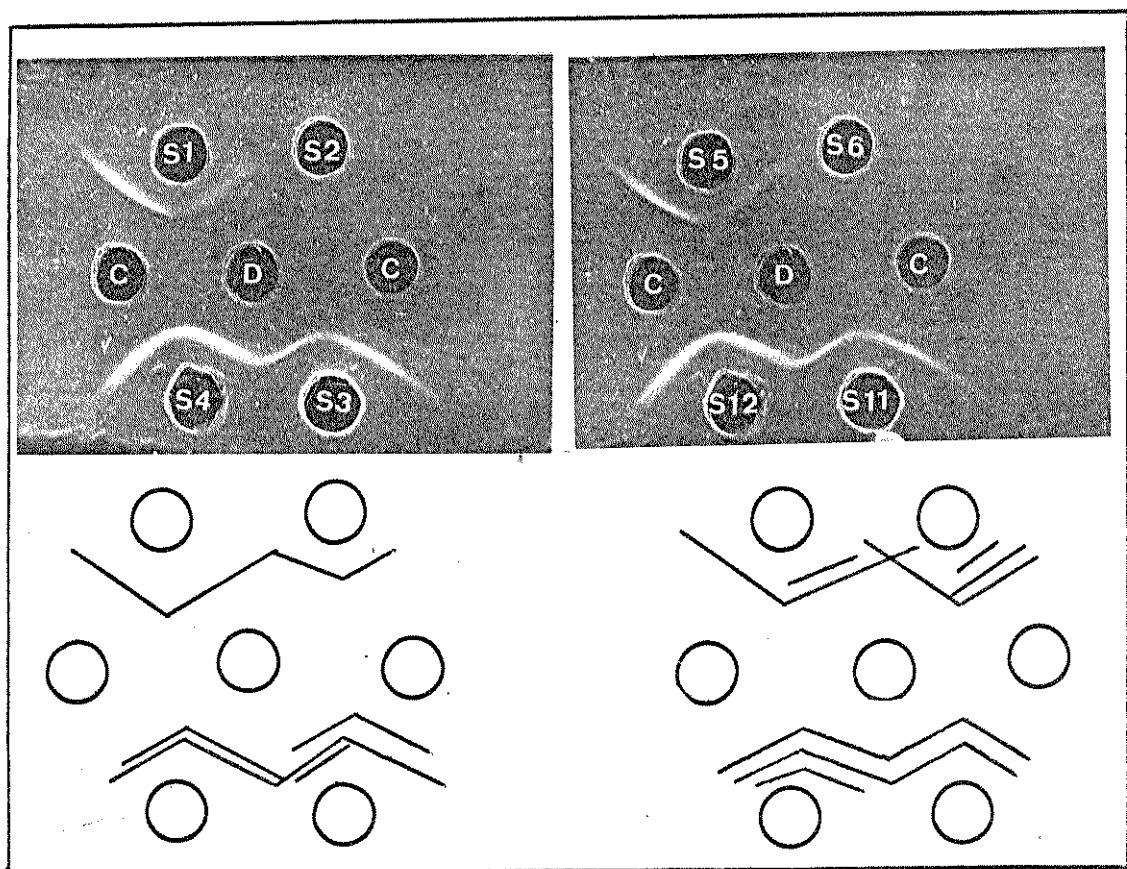


Figura 5. Teste de Ouchterlony com EBC e EBD frente aos diferentes soros (S1 a S12).

D = EBD; (3 mg prot/ml)

C = EBC; (3 mg prot/ml)

Nas experiências realizadas, em que os imune-soros foram testados contra o meio de cultura ou seus constituintes (meio básico, hemoglobina e o soro de vitelo), verificou-se a ocorrência de linhas de precipitação apenas quando o meio completo ou o soro de vitelo eram testados. A figura 6 apresenta um dos resultados obtidos.

Os diferentes imune-soros foram submetidos à absorção com soro de vitelo, misturando-se partes iguais de soro de vitelo e imune-soro. Após 1 hora de incubação a 37°

as misturas eram centrifugadas a 3020 g, por 15 minutos. Com o sobrenadante foram realizadas reações de precipitação pela técnica de Ouchterlony. Alguns dos resultados obtidos, acham-se apresentados na figura 7. Pode-se verificar que a absorção eliminou as reações com o soro de vitelo. Observa-se também que alguns dos soros não absorvidos quando diluídos a 1:2 não mais precipitaram com o soro de vitelo (S1 a S5). Os imune-soros 6, 8 e 12 após a absorção reagem fracamente com EBC ou EBD.

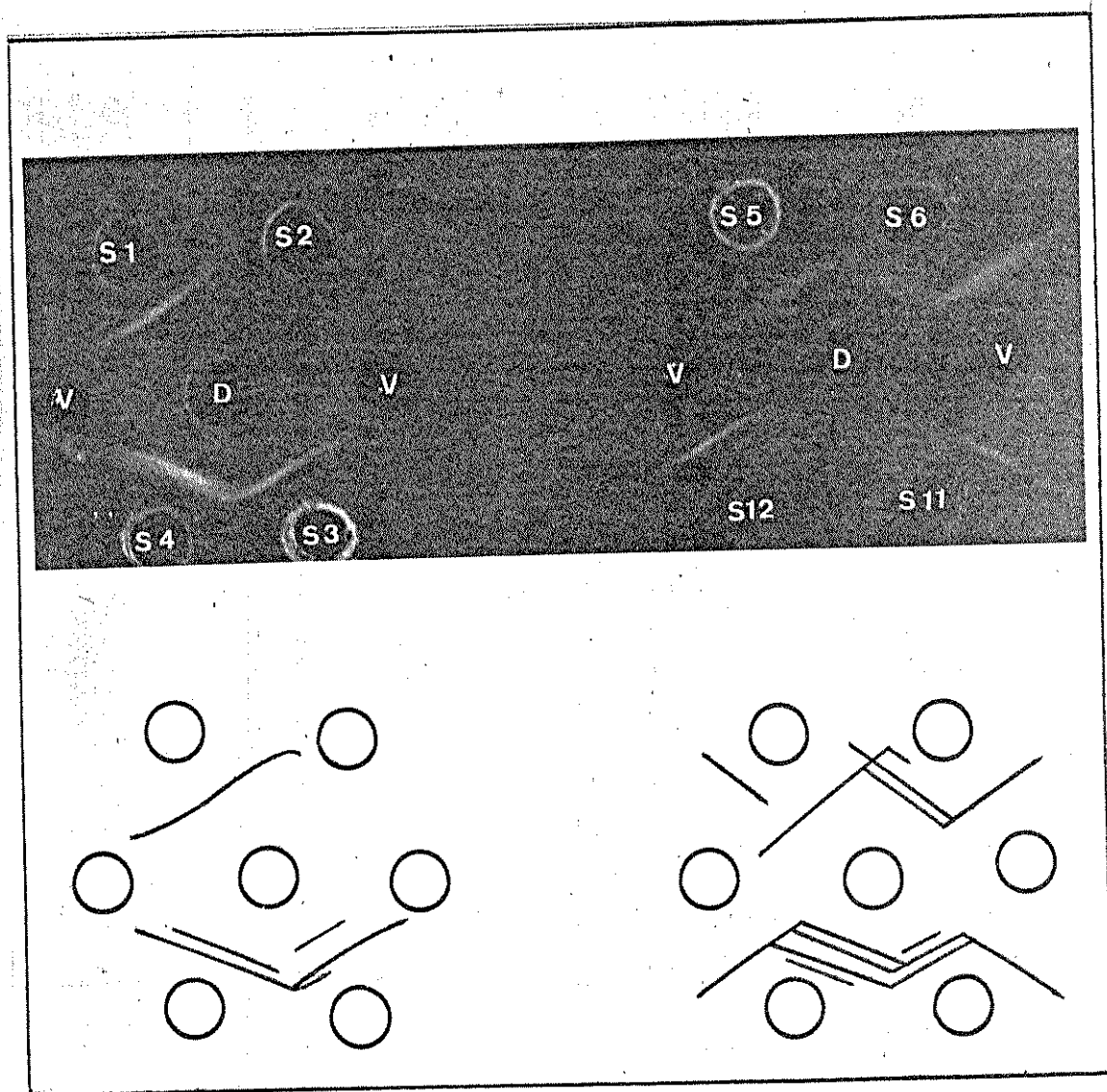


Figura 6. Teste de Ouchterlony com EBD(D), soro de vitelo (V) e os diferentes imune-soros (S1 a S12).

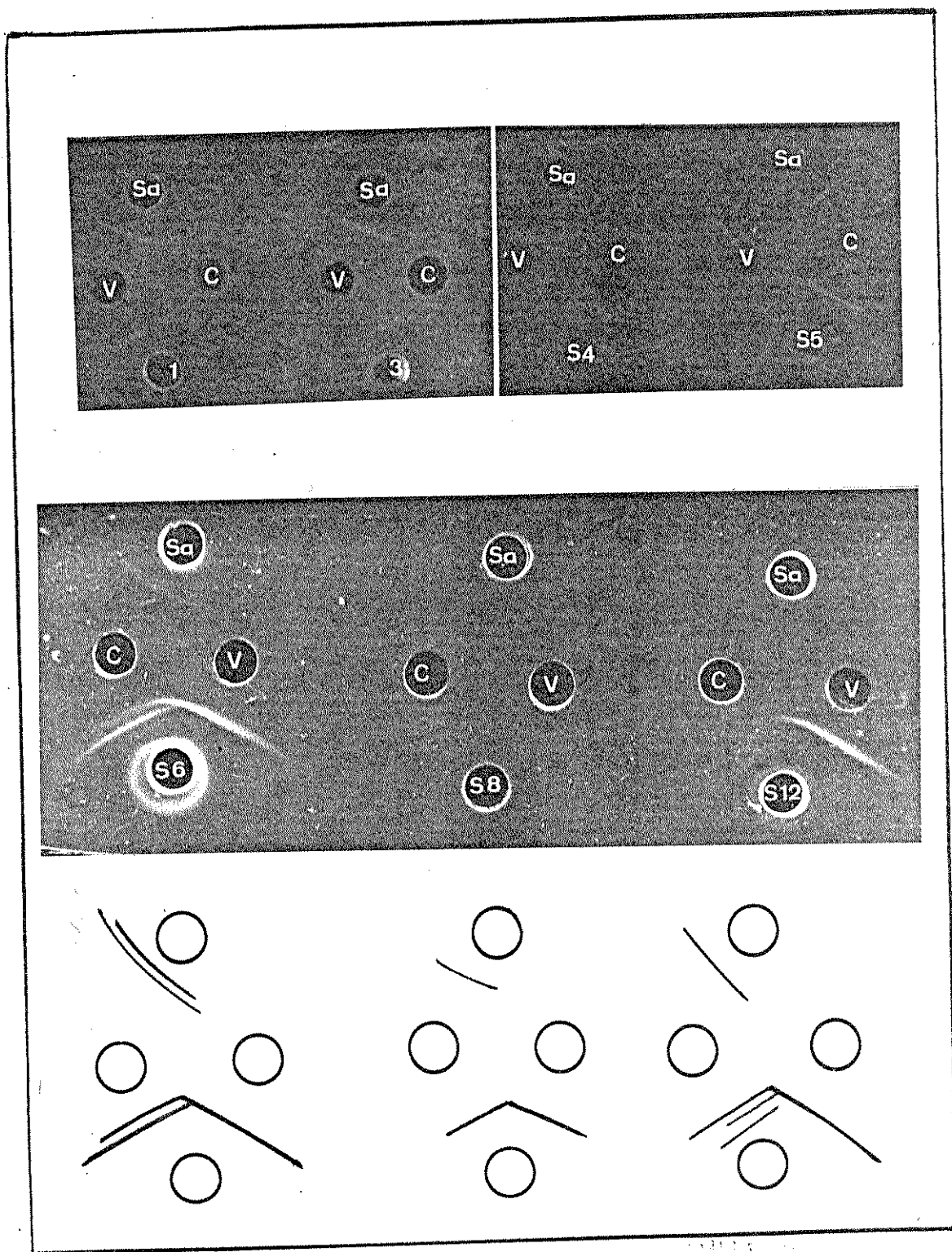


Figura 7. Teste de Ouchterlony com EBC(C), soro de vitelo (V) e diferentes imune-soros (S1 a S12) absorvidos com soro de vitelo (Sa) e não absorvidos (S).

2.3.2. Análise imunoeletroforética. Diferentes preparações de EBC e EBD, contendo teor variável de proteínas, foram submetidas a análise imunoeletroforética.

Nas figuras 8 e 9 acham-se apresentados alguns dos resultados obtidos.

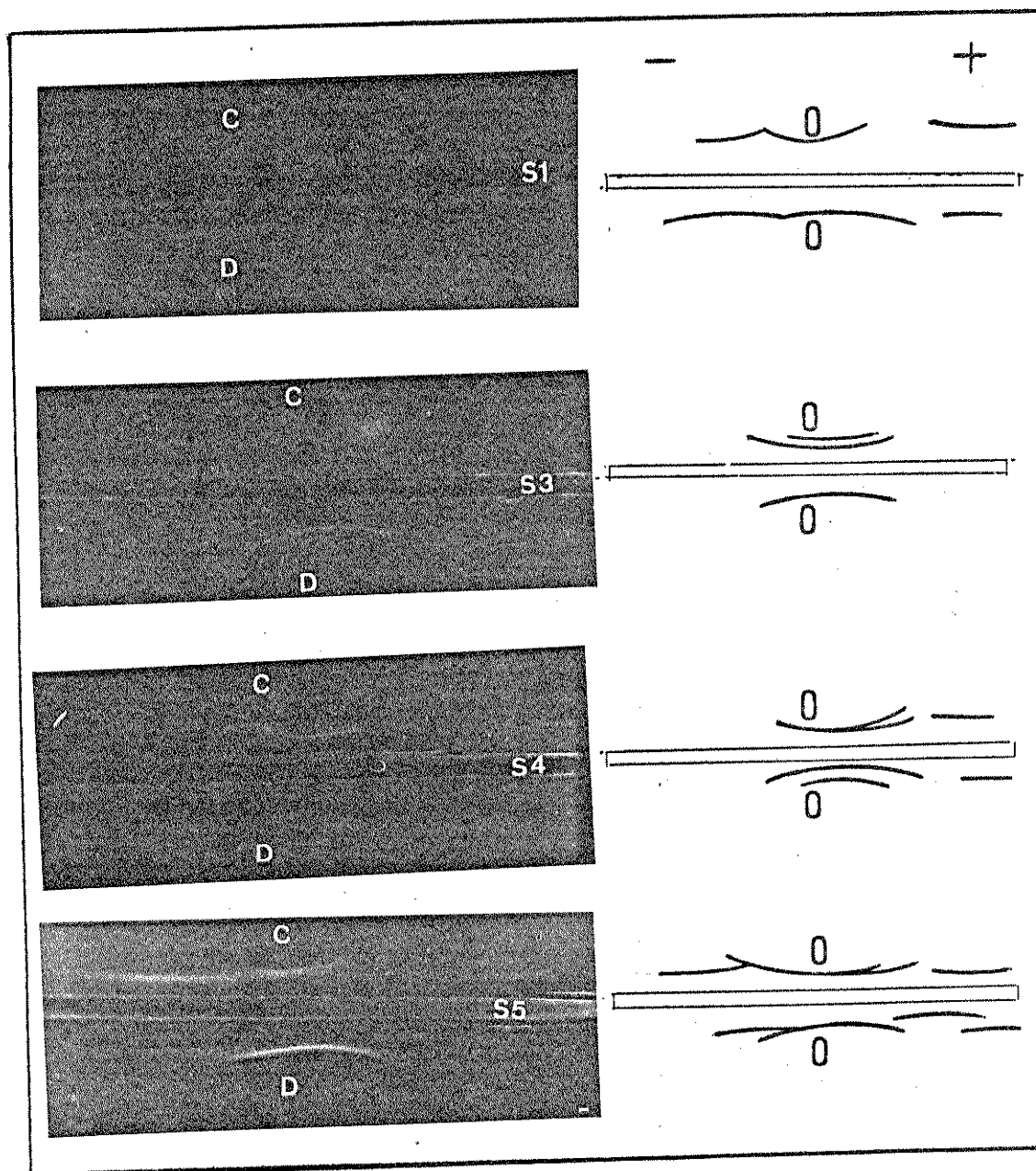


Figura 8. Imunoeletroforese de EBC e EBD, com 1,5 mg/prot/ml e os imune-soros 1, 3, 4.e5.

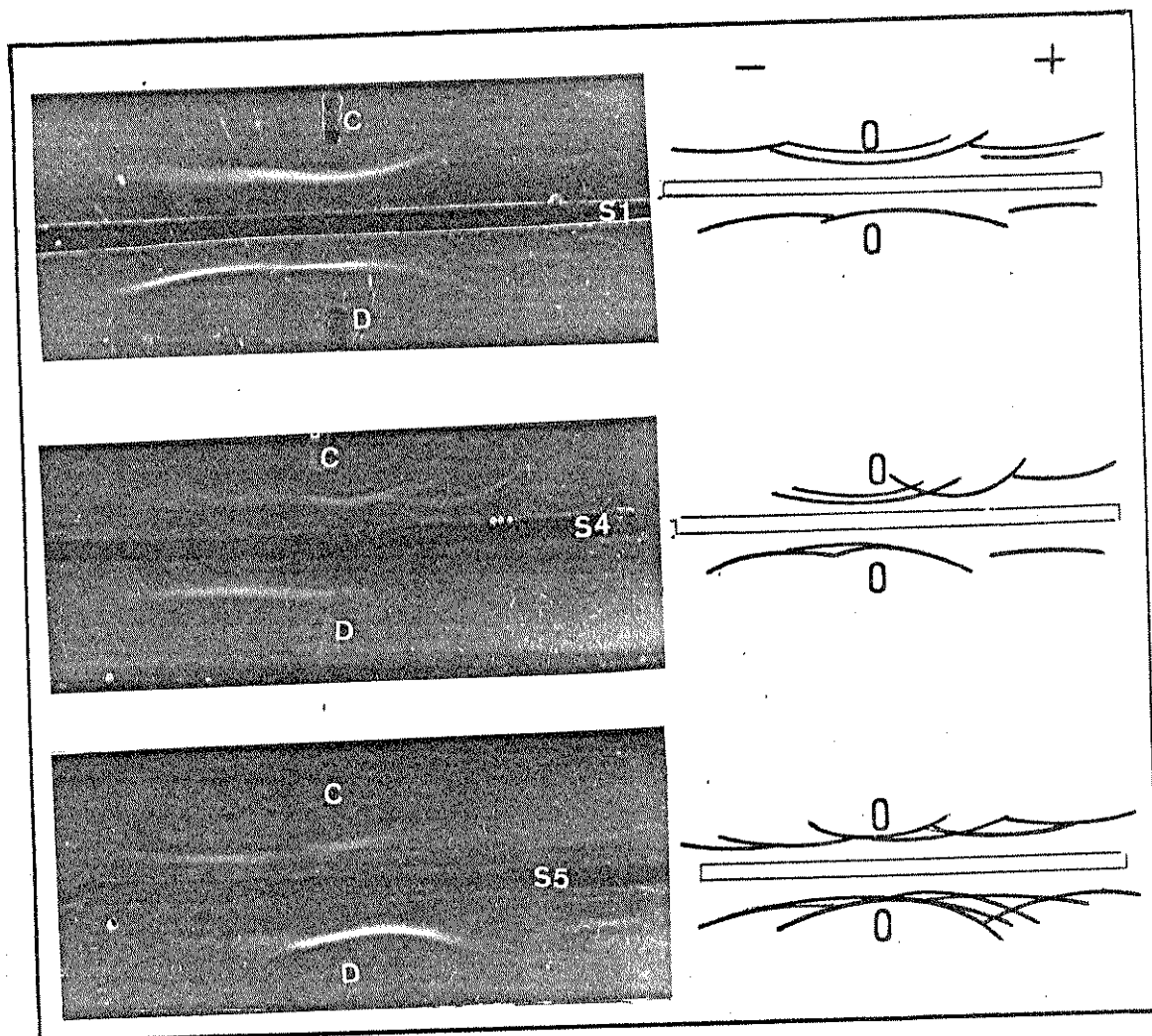


Figura 9. Imunoeletroforese de EBC e EBD com 3 mg/prot/ml e os imune-soros 1, 4 e 5.

A análise dos resultados obtidos nestas experiências, revelou algumas diferenças nos sistemas precipitantes dos EBC e EBD. Contudo, os soros absorvidos por EBC ou EBD não mais precipitavam qualquer dos sistemas.

O número de antígenos detectados nestas experiências variou com os diferentes imune-soros utilizados e a concentração dos antígenos.

2.3.3. Inibição da aglutinação. Reações de inibição da aglutinação. foram realizadas, utilizando-se diferentes concen-

trações de EBC e EBD, em titulações em bloco contra diferentes diluições de imune-soros.

Pode-se observar na tabela 7, onde se acham exemplificados alguns dos resultados obtidos, que os EBC e EBD inibem especificamente a aglutinação das formas vivas de cultivo do T. cruzi. Resultados similares foram obtidos com diferentes preparações de EBC e EBD frente aos diferentes imune-soros.

TABELA 7

Reação de inibição da aglutinação com EBD e o imune soro nº 3

µg de Proteína de Antígeno	Diluição do imune soro nº 3								Controle
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	
200	+	+	-	-	-	-	-	-	-
100	+	+	+	-	-	-	-	-	-
50	+	+	+	+	-	-	-	-	-
25	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Controle	+	+	+	+	+	+	+	-	-

3. Fracionamento dos extratos brutos. Experiências de fracionamento dos EBC e EBD foram realizadas utilizando-se as técnicas de ultrafiltração, cromatografia de exclusão em Sephadex e precipitação no ponto iso-elétrico.

3.1. Fracionamento em membranas ultrafiltrantes. Diferentes amostras de EBC e EBD foram filtradas em membranas ultrafiltrantes tipo PM 10 (Amicon Corporation), sob atmosfera de nitrogênio e em banho de gelo.

A aplicação deste método permitiu separar duas frações: uma retida pela membrana (F1) e outra filtravel (F2). Essas frações foram submetidas a estudos de composição química e antigênica.

3.1.1. Análise química das frações F1 e F2. Dosagens de proteínas e polissacárides nestas frações foram realizadas utilizando-se as técnicas indicadas em material e métodos. Alguns dos resultados obtidos acham-se exemplificados na tabela 8 onde os dados referentes a uma das experiências acham-se apresentados. Pode-se verificar que não foram observadas diferenças significativas entre EBC e EBD e que a soma da quantidade total de proteínas das frações F1 e F2 correspondeu ao total de proteínas do EBC e EBD antes do fracionamento.

TABELA 8				
Análise química das frações F1 e F2 provenientes de EBC e EBD				
Amostra	Volume	Prot mg/ml	Polis mg/ml	Relação Prot/Polis
EBC	40	1,4	0,123	11,3
F1	9	4	0,352	12,0
F2	26	0,6	0,046	13,0
EBD	46	1,4	0,135	10,3
F1	10	5	0,450	11,1
F2	30	0,4	0,039	10,2

3.1.2. Análise antigênica das frações F1 e F2. As frações F1 e F2 obtidas de diferentes amostras de EBC e EBD foram comparadas empregando-se o teste de Ouchterlony, imunoele-

troforese e a reação de inibição da aglutinação conforme descrito a seguir.

3.1.2.1. Teste de Ouchterlony. Diferentes concentrações de F1 e F2 foram comparadas utilizando-se diferentes imune-soros. Nas experiências em que foram comparadas as F1 com EBC ou EBD foram observadas sempre uma figura de identidade. As F2 testadas em diferentes concentrações, variando entre 0,65 a 6,5 mg prot/ml não exibiram reação de precipitação. Alguns dos resultados obtidos estão na figura 10.

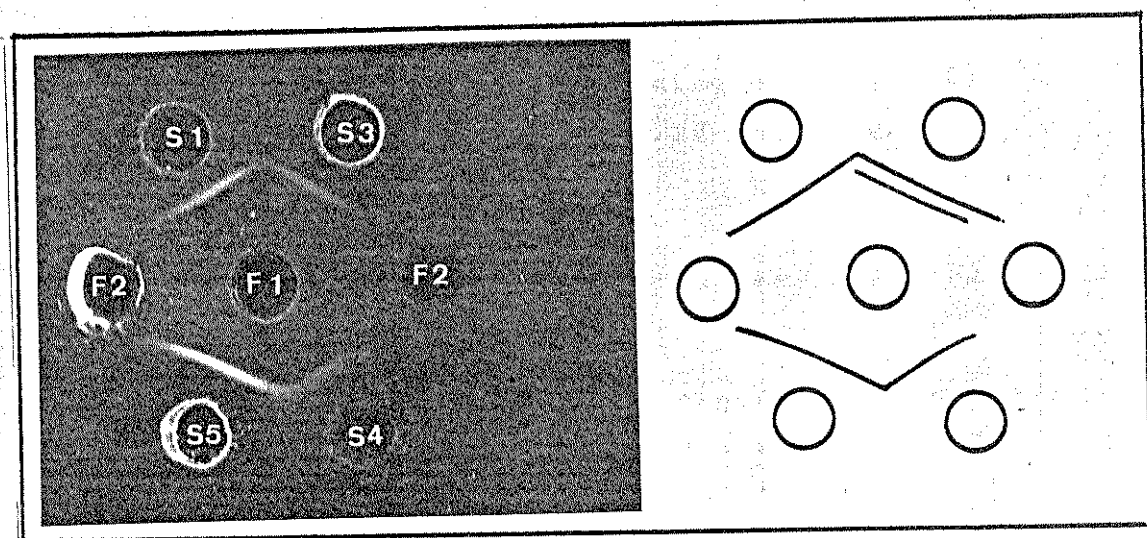


Figura 10. Teste de Ouchterlony com as F1 e F2 provenientes de EBC (3 mg prot/ml).

Experiências tendentes a verificar se a F2 era capaz de combinar com os imune-soros, foram realizadas. Diferentes concentrações de F2 provenientes de EBC e EBD foram misturadas a 0,2 ml de diferentes imune-soros e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora. Essas misturas foram testadas pela reação de precipitação em meio gelificado conforme indicado na figura 11. Pode-se observar que F2 não inibiu a reação de precipitação de F1.

3.1.2.2. Reações de inibição da aglutinação. As F1 e F2 foram comparadas a EBC e EBD pelas reações de inibição

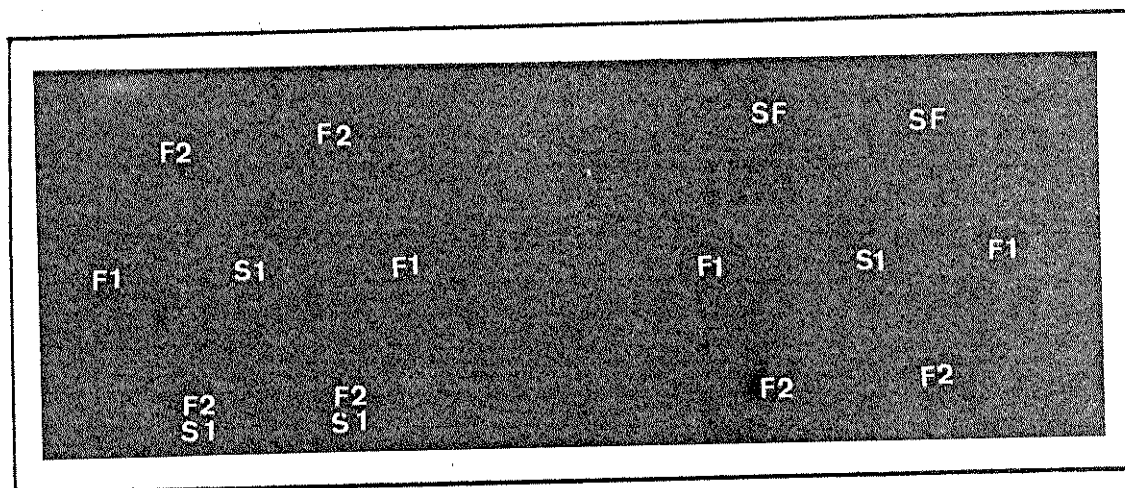


Figura 11. Teste de inibição da precipitação em meio gelificado. F1 e F2 provenientes de EBC, (SF) salina fisiológica, (F2 + S1). F2 mais imune-soro nº 1.

da aglutinação. Diferentes concentrações de F1, F2 e EBC ou EBD foram testadas com os diferentes imune-soros.

O resultado de uma das experiências acha-se apresentado na tabela 9 onde se pode observar que EBD e F1 proveniente de EBD apresentaram o mesmo título de inibição e que a F2 apresentou menor poder de inibição do que a F1.

TABELA 9
Resultados da reação de inibição da aglutinação por EBD, F1 e F2

Antígeno	µg de Proteína	Diluição do imune soro nº 3						Controle
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	
EBD	200	+	+	-	-	-	-	-
EBD	100	+	+	+	-	-	-	-
EBD	50	+	+	+	+	+	-	-
F1	200	+	+	-	-	-	-	-
F1	100	+	+	+	-	-	-	-
F1	50	+	+	+	+	+	-	-
F2	200	+	+	+	-	-	-	-
F2	100	+	+	+	+	-	-	-
F2	50	+	+	+	+	+	-	-
F1 + F2	100 + 65	+	+	-	-	-	-	-
Controle	0	+	+	+	+	+	+	-

3.1.2.3. Análise imunoeletroforética das Fl. Diferentes amostras de Fl provenientes de EBC e EBD, contendo teor variável de proteínas, foram submetidas a análise imunoeletroforética.

O resultado obtido em uma das experiências acha-se apresentado na figura 12 onde se pode observar que o número de sistemas precipitantes variou com o imune-soro utilizado. Algumas diferenças foram observadas entre as Fl provenientes de EBC e EBD quando reveladas por determinados soros. Contudo, experiências controles de imunodifusão pela técnica de Ouchterlony, utilizando esses soros, revelou sistematicamente um padrão de identidade.

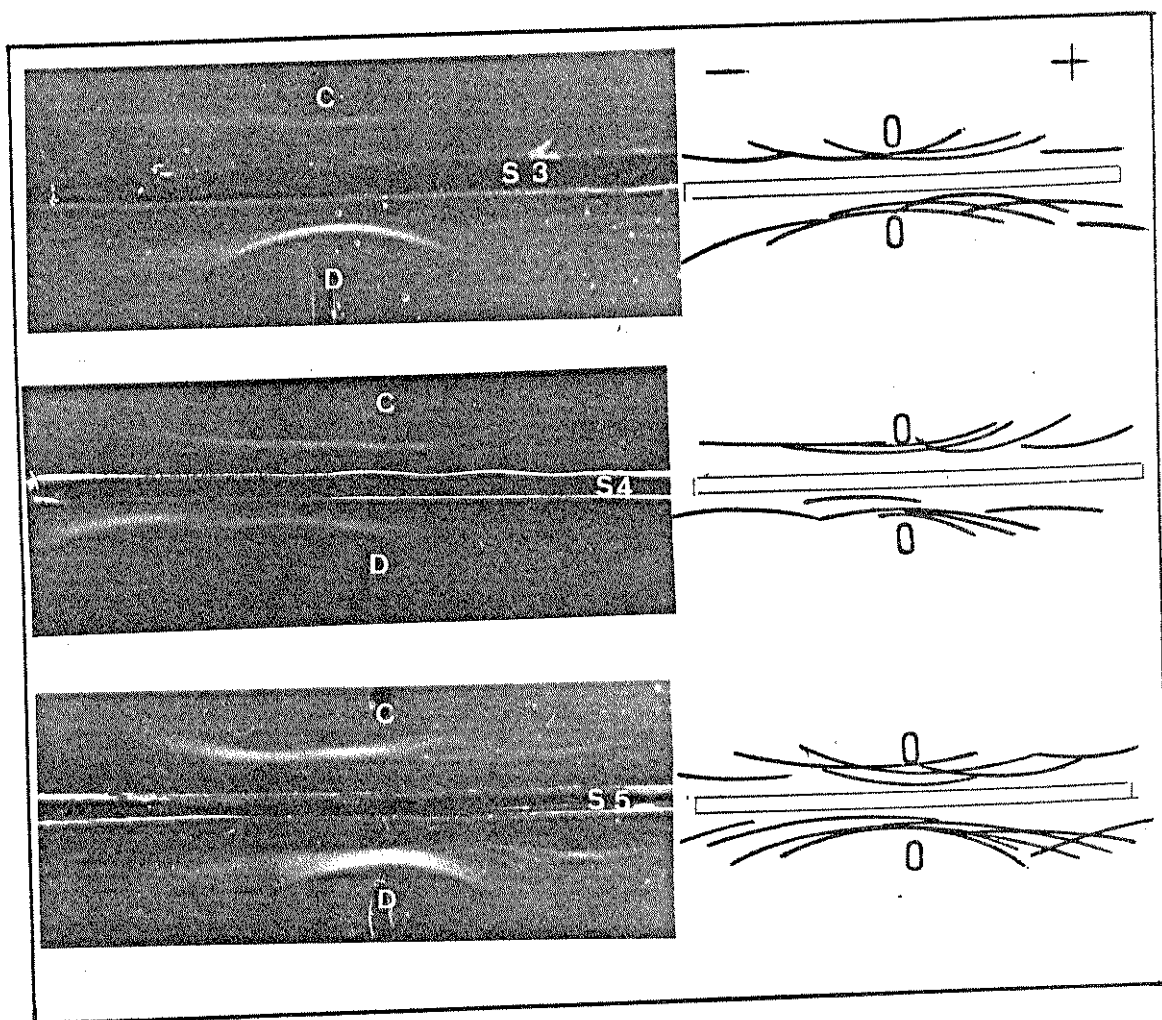


Figura 12. Imunoeletroforese das Fl (3 mg prot/ml) provenientes de EBC e EBD e os diferentes imune-soros.

3.2. Fracionamento por cromatografia de exclusão. Porções de 5 ml (13 mg prot/ml) das F1 de diferentes amostras de EBC e EBD, foram submetidas a cromatografia em coluna de Sephadex G 200 (42x2 cm) equilibrada com solução de cloreto de sódio 0,85% tamponada com fosfato 0,01 M, pH 7,2. O material foi eluído utilizando-se a mesma solução. Os eluatos foram recolhidos em frações de 1 ml e a D.O. determinada em Espectrofotômetro Zeiss $\lambda 280$ em cubas quadradas com 1 cm de caminho ótico.

Um dos resultados obtidos na cromatografia da F1 do EBD acha-se apresentado na figura 13 onde se pode verificar que diferentes frações (A, B, C,...F) foram obtidas.

Todas as frações deram reações positivas para a pesquisa de proteínas e de polissacárides.

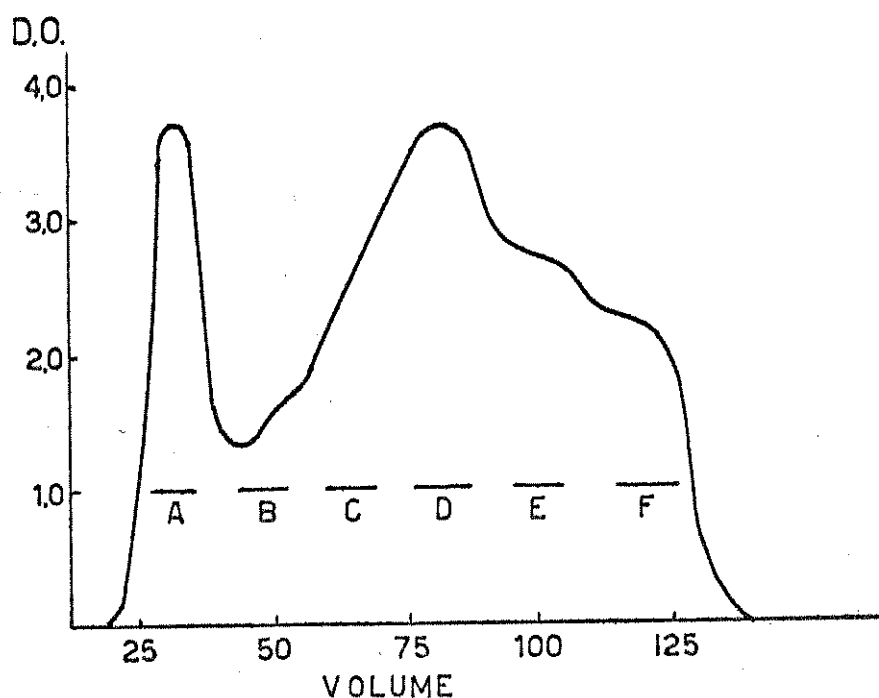


Figura 13. Cromatografia da F1 do EBD em Sephadex G 200 (coluna 42x2 cm).

Resultados similares aos indicados na figura 13 foram obtidos nas análises cromatográficas das F1 provenien

tes de EBC.

3.2.1. Análise antigênica. As frações obtidas por cromatografia foram submetidas a análise antigênica empregando-se o teste de Ouchterlony, imunoeletroforese e a reação de inibição da aglutinação como indicado a seguir.

3.2.1.1. Teste de Ouchterlony. Os resultados obtidos nos testes de imunodifusão apresentados na figura 14 mostram que as frações A, B, C e D, são capazes de precipitar com os imune-soros nº 1 e 3, ao passo que as frações E e F não precipitaram com nenhum dos soros testados.

O número de sistemas precipitantes encontrado variava com o imune-soro utilizado, encontrando-se contudo, determinantes antigênicos comuns às frações A, B, C e D em todas as experiências realizadas.

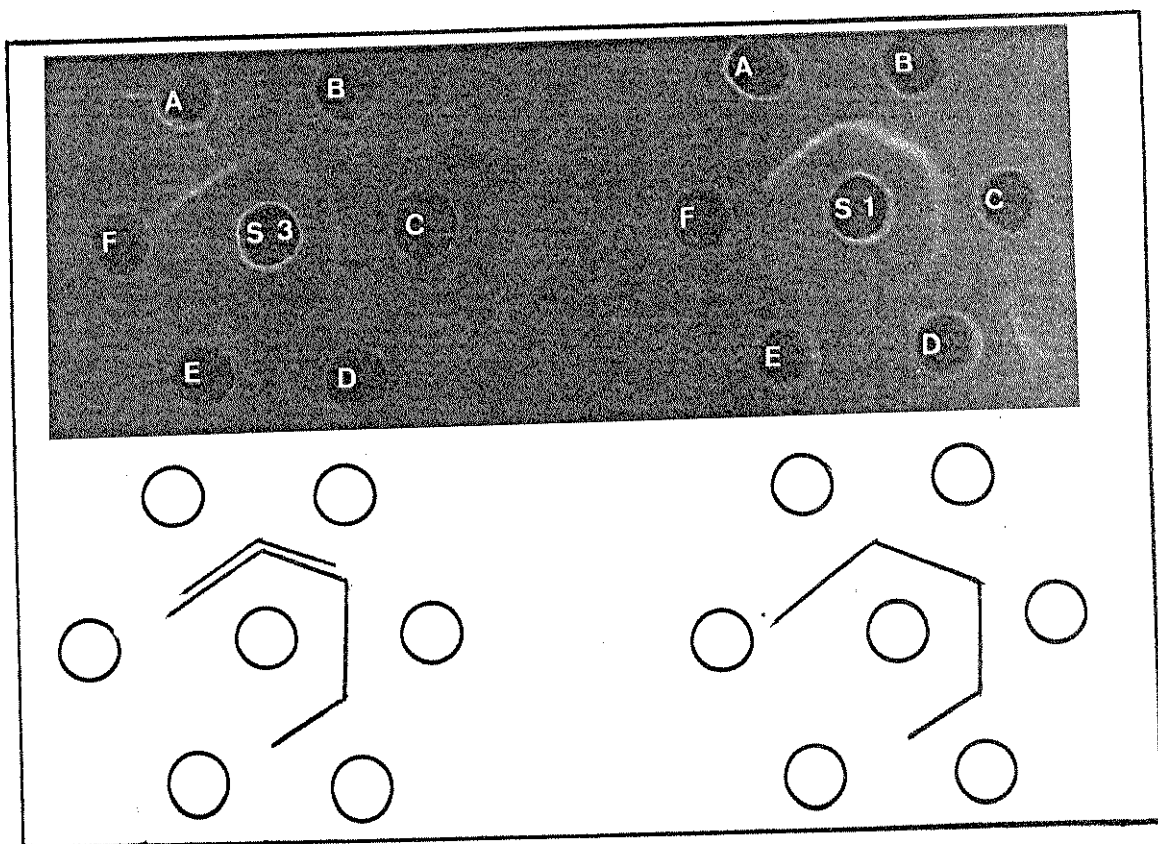


Figura 14. Teste de Ouchterlony das frações A, B, C, D e F (1 mg prot/ml) provenientes de F1 de EBD e os imune-soros 1 e 3.

Comparações entre as diferentes frações obtidas na cromatografia das F1 de EBC e EBD foram realizadas. Não foram encontradas diferenças apreciáveis entre frações provenientes de EBC e EBD conforme demonstram os resultados apresentados na figura 15.

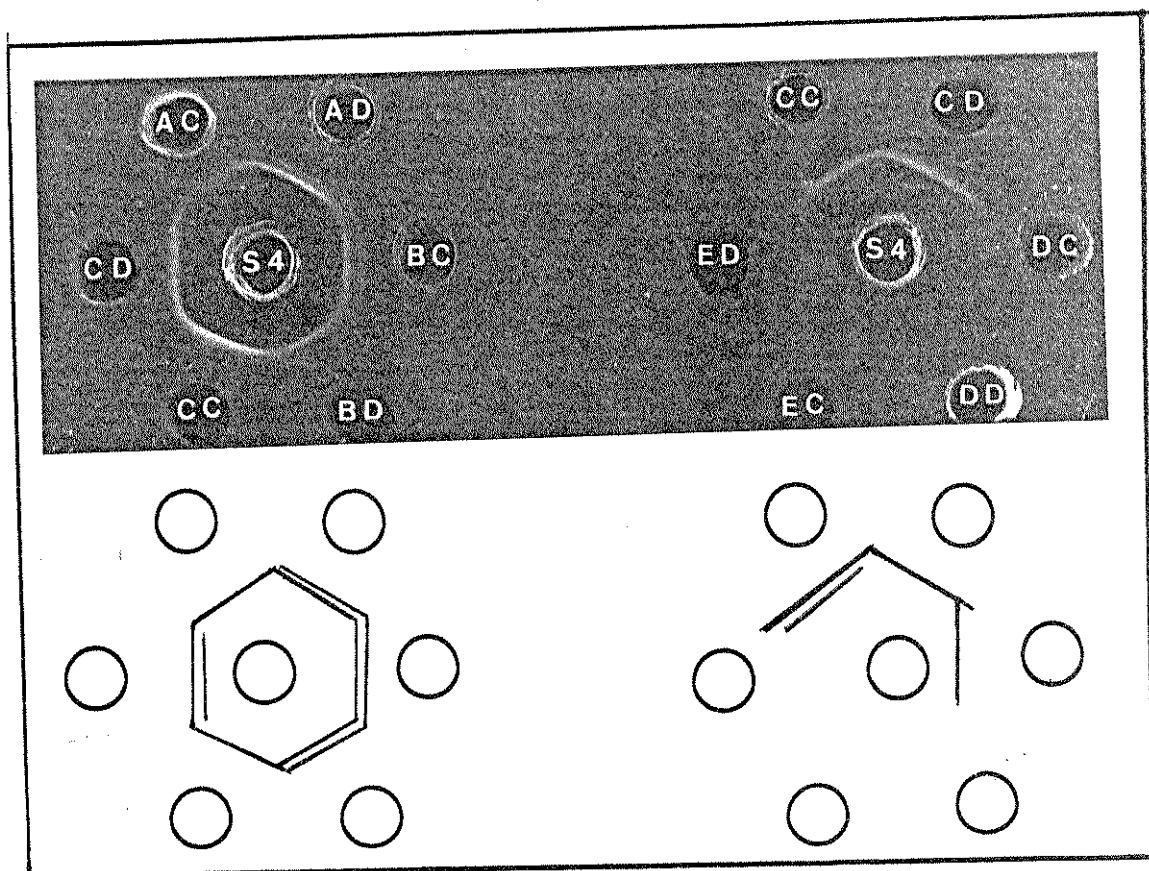


Figura 15. Comparação entre as frações obtidas na cromatografia das F1 do EBC e de EBD, utilizando-se o imune-soro nº 3.

3.2.1.2. Análise imunoeletroforética. Experiências foram realizadas utilizando-se diferentes imune-soros, alguns dos quais foram previamente absorvidos com as formas vivas de cultivo do T. cruzi.

Alguns dos resultados obtidos acham-se representados nas figuras 16 e 17.

Pode-se verificar, pela figura 16, que apenas as frações A, B, C e D apresentaram sistemas precipitantes nas

concentrações testadas. Resultados similares foram obtidos com os diferentes imune-soros. As frações capazes de precipitar apresentaram pelo menos dois constituintes antigênicos, um dos quais era aparentemente comum a todas as frações.

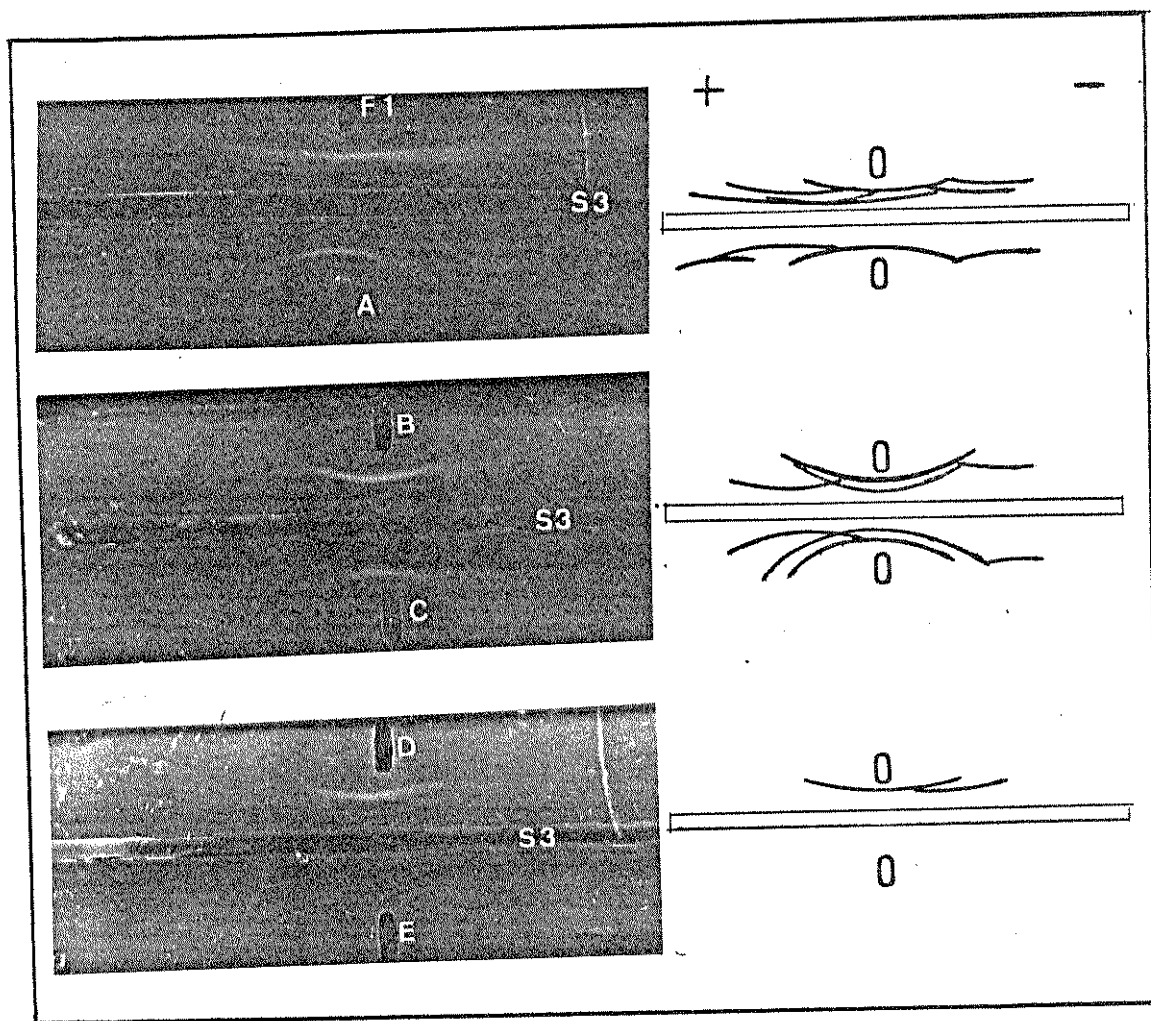


Figura 16. Imunoelectroforese das frações A, B, C, D e E com 2 mg prot/ml provenientes de EBC.

As experiências com soros absorvidos mostraram que as frações A, B, C e D obtidas de F1 contêm antígenos de superfície. Um dos resultados obtidos nestas experiências a cha-se apresentado na figura 17 onde se pode observar que o componente que migrou para o polo negativo, não precipitou

com o imune-soro absorvido. Este componente está presente em concentrações variáveis em todas as frações. As frações A e C apresentaram além deste, outros com mobilidades eletroforéticas diferentes que não foram detectados com o imune-soro absorvido e não estão presentes nas demais frações (B e D).

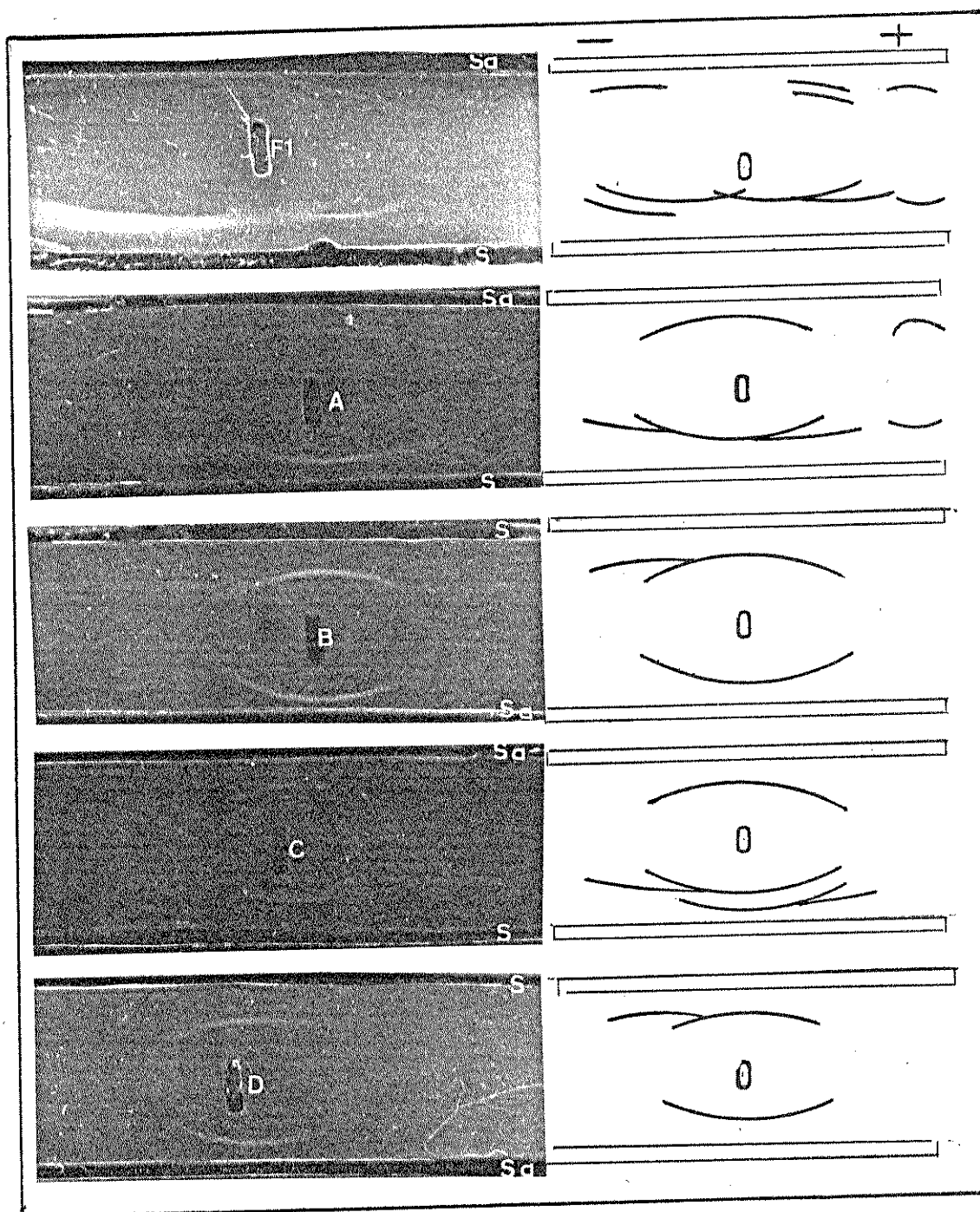


Figura 17. Imunoelectroforese das frações F1, A, B, C e D. (S) imune-soro nº 4, (Sa) o mesmo imune-soro absorvido com as formas vivas de T. cruzi.

Resultados similares aos apresentados na figura 17 foram observados com os diferentes imune-soros. Não foram encontradas diferenças apreciáveis entre as frações (A, B ... D) de F1 proveniente de EBC.

Os dados obtidos sugerem que pelo menos 4 componentes não são detectáveis quando se utiliza soros absorvidos com as formas de cultivo do T. cruzi.

3.2.1.3. Reação de inibição da aglutinação. Nas diferentes frações obtidas por cromatografia foram pesquisados antígenos com capacidade de inibir as reações de aglutinação das formas vivas de cultivo pelas reações de aglutinação.

Alguns dos resultados obtidos acham-se apresentados na tabela 10 onde se pode observar que apenas a fração A apresentou nítida inibição. Resultados similares foram encontrados com as frações do EBC.

TABELA 10							
Reação de inibição da aglutinação com as frações de EBD e o imune-soro nº 3							
1 mg prot./ml	Diluições do imune-soro nº 3						Controle
	1:150	1:300	1:600	1:1200	1:2400	1:4800	
FA	+	+	+	-	-	-	-
FB	+	+	+	+	-	-	-
FC	+	+	+	+	+	-	-
FD	+	+	+	+	+	-	-
FE	+	+	+	+	+	-	-
FF	+	+	+	+	-	-	-
Controle	+	+	+	+	+	±	-

3.3. Fracionamento pela precipitação no ponto iso-elétrico. Diferentes amostras de EBC e EBD foram ajustadas a pH 4,5, adicionando-se, gota a gota, HCl 0,1 N, em banho de gelo. Desta maneira foi obtido um precipitado (FP) que foi separa

do por centrifugação a 3020 g, durante 15 minutos a 5°. Ambas as frações foram em seguida ajustadas a pH 7,6 com NaOH 0,1 N. A FP foi posteriormente purificada, repetindo-se por 3 vezes o processo acima.

A pesquisa de proteínas e polissacárides em ambas as frações deu resultados positivos.

3.3.1. Análise antigênica das FP e FS. As frações FP e FS obtidas de diferentes amostras de EBC e EBD, foram comparadas empregando-se teste de Ouchterlony, imunoeletroforese e a reação de inibição da aglutinação.

3.3.1.1. Reação de inibição da aglutinação. Diferentes concentrações de FP e FS, provenientes de EBC e de EBD, foram testadas com diferentes imune-soros.

O resultado de uma das experiências acha-se apresentado na tabela 11 onde se pode observar que a FP foi capaz de inibir a aglutinação. A FS só foi capaz de apresentar alguma inibição quando utilizada em altas concentrações.

TABELA 11							
Resultado da reação de inibição da aglutinação por FP e FS provenientes de EBD							
Antígeno	µg da proteína	Diluição do imune soro nº 2					
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
EBD	100	+	+	-	-	-	-
EBD	50	+	+	±	-	-	-
EBD	25	+	+	+	-	-	-
FP	100	+	-	-	-	-	-
FP	50	+	+	-	-	-	-
FP	25	+	+	+	-	-	-
FS	100	+	+	+	-	-	-
FS	50	+	+	±	-	-	-
FS	25	+	+	+	+	-	-
Controle		+	+	+	+	-	-

Resultados semelhantes aos apresentados na tabela 11 foram obtidos utilizando-se diferentes imune-soros e diferentes partidas de FP e FS provenientes de EBC ou de EBD.

3.3.1.2. Teste de Ouchterlony. As FP e FS provenientes de diferentes partidas de EBD ou EBC foram comparadas pelo teste de Ouchterlony frente aos diferentes imune-soros.

Os resultados apresentados na figura 18 mostram, a presença de constituintes antigênicos em ambas as frações (P e S) capazes de reagirem com os diferentes imune-soros. A presença de um antígeno comum às FP e FS foi sempre observado em todas as experiências realizadas.

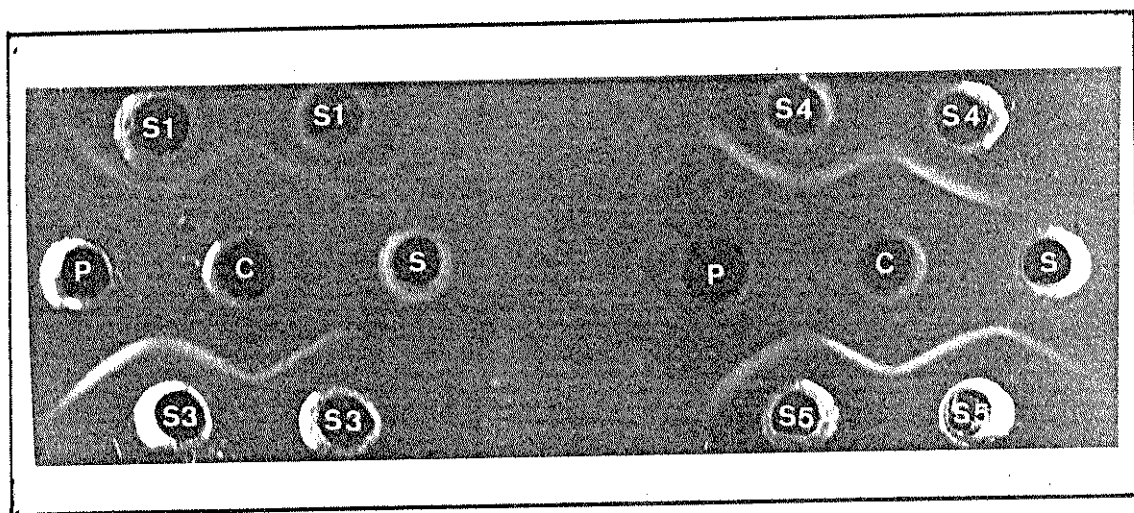


Figura 18. Teste de Ouchterlony com as FP(P) e FS(S) provenientes de EBC (C) com 2 mg prot/ml e os diferentes imune-soros (1 a 5).

A figura 19 mostra a comparação entre as FP e FS provenientes de EBD. Pode-se observar que apenas com o imune-soro nº 4 houve uma reação de identidade parcial entre as duas frações. Com os demais soros sempre foi observada uma identidade total nos sistemas precipitantes.

Sempre que se comparou as FP provenientes de EBC

e de EBD, frente aos diferentes imune-soros, pelo teste de Ouchterlony, obteve-se uma figura de identidade. A comparação das FS provenientes de EBC ou de EBD pelo mesmo método, mostrou igualmente uma identidade dos sistemas precipitantes.

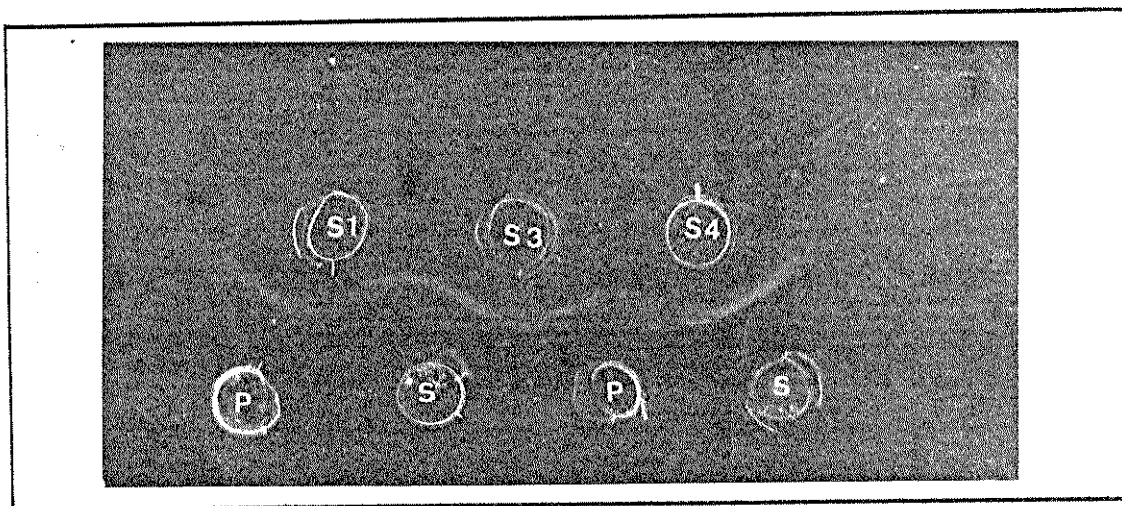


Figura 19. Teste de Ouchterlony com as FP e FS provenientes de EBD com 2 mg de prot/ml e os diferentes imune-soros (1 a 4).

3.3.1.3. Análise imunoeletroforética das FP e FS. Diferentes preparações de FP e FS foram submetidas a análise imuno eletroforética frente aos diferentes imune-soros. Um dos resultados obtidos acha-se apresentado na figura 20, onde se pode observar que os sistemas precipitantes, detectados no EBD, acham-se representados em FP e FS. Pode-se observar também, que aparentemente a maioria dos sistemas precipitantes existentes em FP estão também representados em FS. Resultados similares foram obtidos, utilizando-se diferentes imune soros.

4. Comparação entre as frações (A) obtidas por cromatografia em coluna de Sephadex e as frações (P e S) obtidas por precipitação no ponto iso-elétrico.

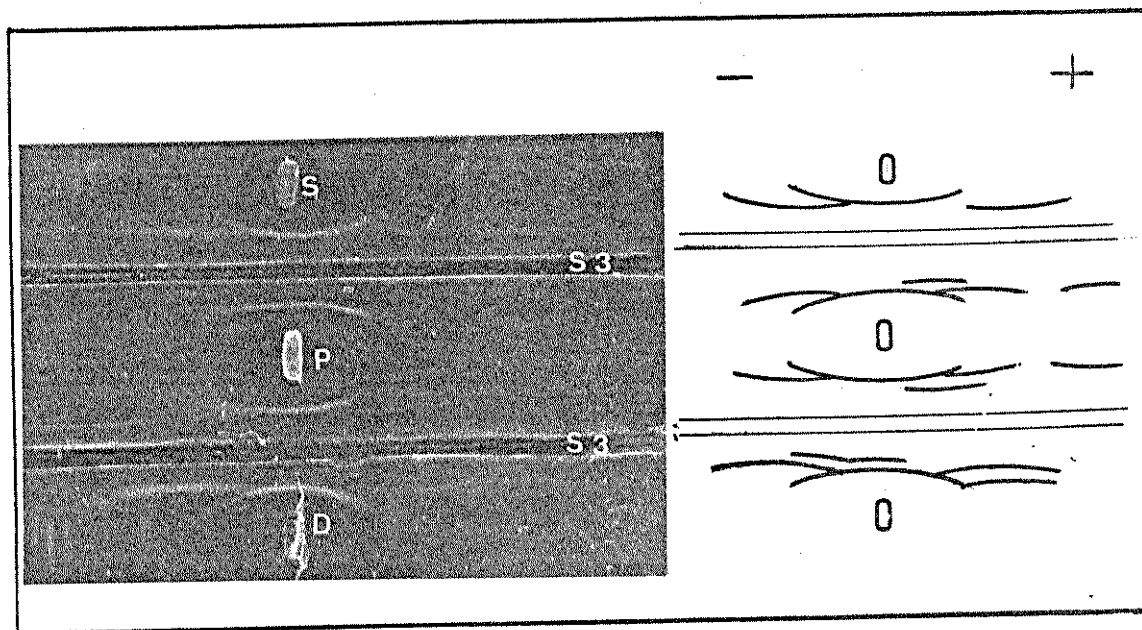


Figura 20. Imunoelectroforese de EBD (D), FP e FS (4 mg prot/ml). Imune-soro nº 3 (S3).

4.1. Diferentes amostras das FP, FS e FA provenientes de EBC ou de EBD foram comparadas pelas reações de inibição da aglutinação, teste de Ouchterlony e reação de imunoelectroforese, segundo as indicações apresentadas em material e métodos.

4.1.1. Reação de inibição da aglutinação. As FP, FS e FA provenientes de EBC ou EBD foram comparadas pelas reações de inibição da aglutinação utilizando-se diferentes imunesoros. Alguns dos resultados obtidos acham-se apresentados nas tabelas 13 e 14, onde se pode observar que, para idênticas concentrações de proteínas, a FP apresentou maior poder de inibição que a FS e a FA.

4.1.2. Teste de Ouchterlony. Diferentes amostras de FP, FS e FA provenientes de EBC ou de EBD foram comparadas frente aos diferentes imune-soros pelo teste de Ouchterlony. Um dos resultados obtidos abha-se apresentado na figura 21, onde se pode observar uma figura de identidade entre os sistemas precipitantes das frações. Resultados similares foram

TABELA 12

Resultado da reação de inibição da aglutinação por FP, FS e FA provenientes de EBD e o ímune soro nº 3

Antígeno (100 µg)	Diluição do soro nº 3						Controle
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	
EBD	+	+	+	-	-	-	-
FP	+	+	-	-	-	-	-
FS	+	+	+	-	-	-	-
FA	+	+	+	-	-	-	-
Controle	+	+	+	+	±	-	-

TABELA 13

Resultado da reação de inibição da aglutinação por FP, FS e FA provenientes de EBC e o ímune-soro nº 3

Antígeno (100 µg)	Diluição do soro nº 3						Controle
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	
EBC	+	+	+	+	-	-	-
FP	+	+	±	-	-	-	-
FS	+	+	+	+	-	-	-
FA	+	+	+	+	-	-	-
Controle	+	+	+	+	±	-	-

obtidos com os diferentes imune-soros.

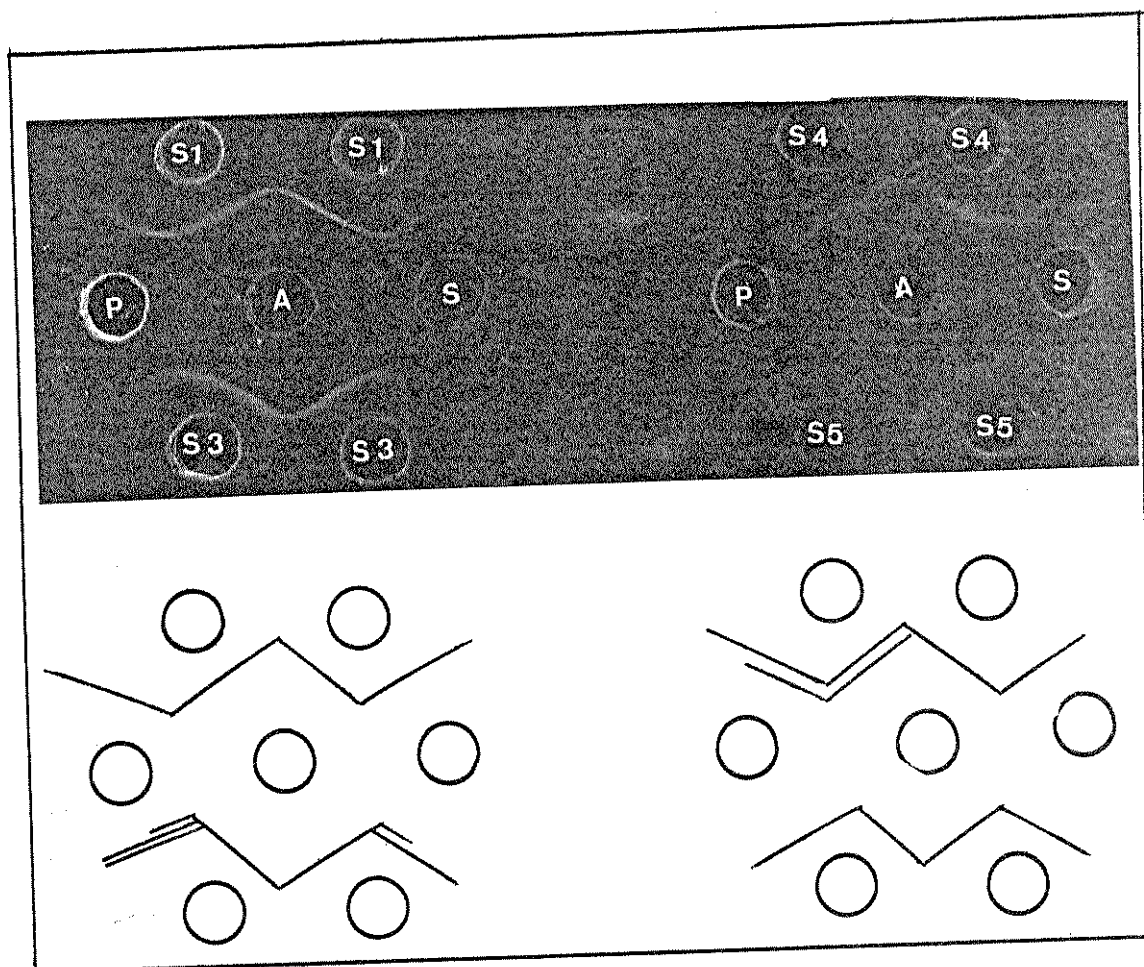


Figura 21. Testes de Ouchterlony das FA, FP e FS provenientes de EBD e os imune-soros 1, 3, 4 e 5.

4.1.3. Análise imunoeletroforética das FP, FS e FA. Diferentes amostras das FP, FS e FA provenientes de EBD e EBC foram analisadas frente a diferentes imune-soros absorvidos e não absorvidos com as formas de cultivo de *T. cruzi*. Um dos resultados obtidos acha-se apresentado na figura 22, onde se pode observar que pelo menos dois componentes não foram detectados com o imune-soro absorvido. Observa-se, ademais, que os sistemas precipitantes detectados com soros absorvidos têm menor intensidade de reação do que os sistemas correspondentes detectados com os soros não absorvidos.

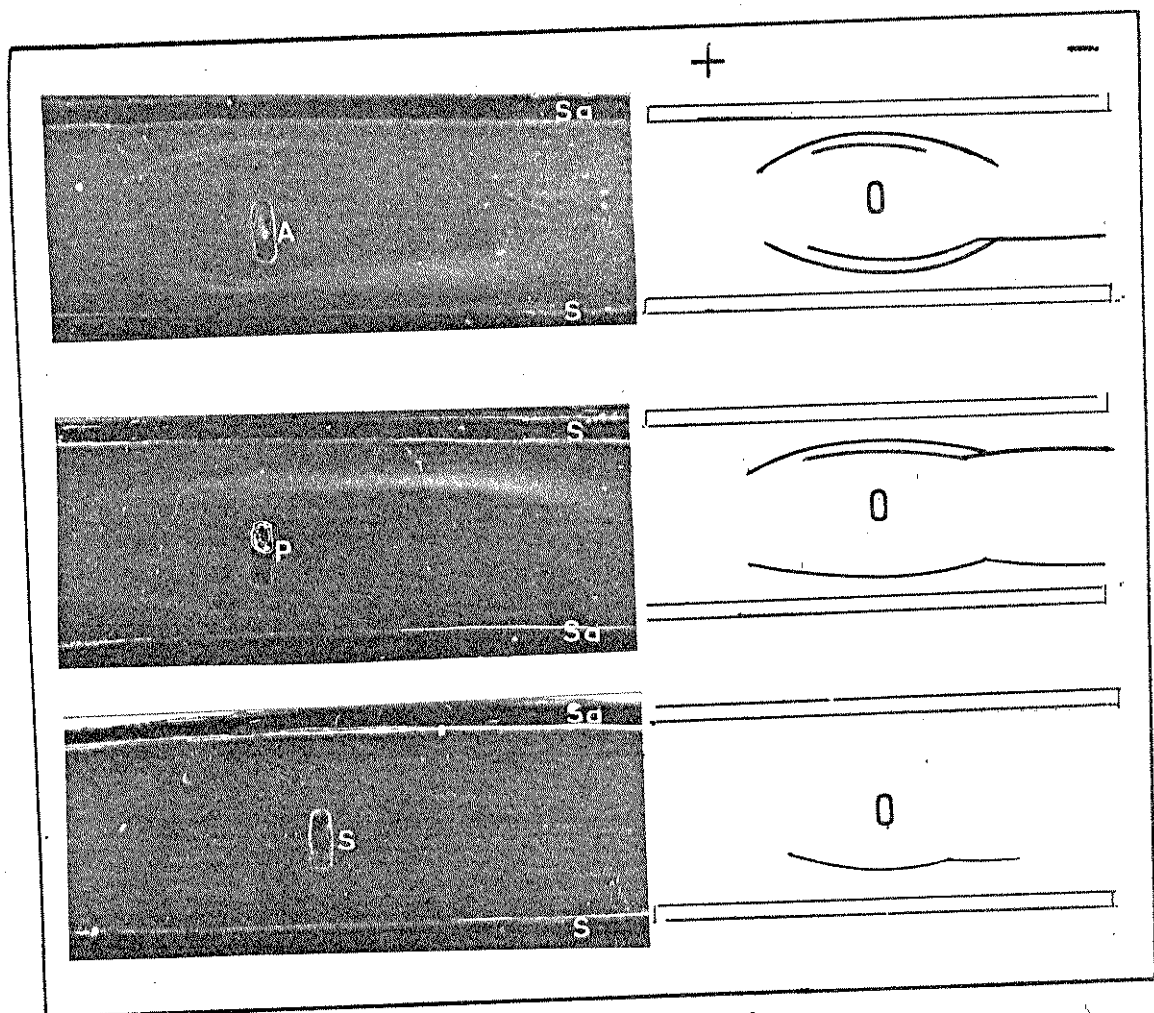


Figura 22. Imunoelectroforese das FP, FS e FA com 3 mg prot/ml provenientes de EBD. Imune-soro nº 4 absorvido (Sa) com as formas vivas de cultivo de T.cruzi e não absorvida (S).

D I S C U S S Ã O

A importância da técnica adequada para a extração dos antígenos de microorganismos tem sido acentuada (Williams e Chase, 1967, Borsos, 1967). Tendo em vista a carência de estudos sistemáticos sobre os constituintes antigênicos do T. cruzi, tornou-se necessário, no presente trabalho, utilizar comparativamente o material obtido por dois diferentes métodos de extração a fim de minimizar a restrição imposta pela metodologia.

A extração dos antígenos, por qualquer das duas técnicas, forneceu um extrato límpido e um sedimento.

O estudo microscópico dos SC e SD revelou a presença de um material amorfo em meio do qual existia elementos aproximadamente esféricos. A caracterização deste material, empregando-se técnicas histoquímicas, revelou que o material amorfo era constituído por lípidos, proteínas e polissacárides, enquanto que os elementos aproximadamente esféricos eram constituídos de ácidos nucleicos, o que sugere que estes elementos representam restos de núcleo e de cinetoplastos.

Através do uso de solventes orgânicos, pôde-se obter desses sedimentos uma fração lipídica e um sedimento delipidado. Não foram observadas diferenças apreciáveis no teor de proteínas e polissacárides nos SC e SD.

Esses sedimentos são capazes de reagir com os imune-soros preparados contra as formas de cultura do T. cruzi. Alguns dos determinantes antigênicos presentes na superfície das formas vivas do T. cruzi estão presentes nos SC e SD delipidados, visto que esses sedimentos foram capazes de absorver anticorpos aglutinantes do T. cruzi.

Admite-se, em geral, com base em estudos de microscopia eletrônica, que a membrana celular dos tripanossomos é de natureza lipoproteica (Milder, 1971 e Mayer e Porter, 1954). No entanto, tem-se assinalado, além desta membrana, a presença de um material pouco denso ao feixe eletrônico, provavelmente de natureza polissacarídica ao qual se tem atribuído um papel importante nas reações antígeno-anticorpo (Vickerman, 1968). Tem-se assinalado também a presença nos meios de cultura de um exoantígeno de natureza provavelmente glicoproteica (Tarrant e Fife, 1965). A provável relação entre as observações de Vickerman, o exoantígeno e os presentes resultados obtidos com os sedimentos delipidados não está esclarecida. Essa relação deve ser investigada, a fim de se esclarecer a citoarquitetura da superfície do T. cruzi.

Foi possível extrair dos SC e SD uma fração lipídica, constituída de pelo menos 6 componentes, um dos quais foi identificado como sendo colesterol, confirmando os achados de von Brand e McMahon, (1959). Esta fração foi capaz de reagir com os imune-soros anti T. cruzi, quando testada pelas técnicas de floculação e fixação do complemento. Essas reações se devem provavelmente aos componentes lipídicos da fração, porquanto não foi possível demonstrar a presença de contaminantes proteicos ou polissacarídicos.

Experiências preliminares não relatadas indicam que esta fração lipídica é capaz de reagir também com alguns soros humanos Wassermann positivos, e que soros de coelho anti T. cruzi reagem com cardiolipina em reações de floculação. Estas observações podem ser aproximadas dos dados obtidos por Chaffé et al., (1956), que mostraram que extratos de T. cruzi, extraídos com éter, têm acentuada redução na positividade de reações cruzadas com soros sífilíticos.

Os dados obtidos e os encontrados na literatura sobre os lípidos dos extratos de T. cruzi sugerem fortemente que esses lípidos desempenham um importante papel nas reações cruzadas. Contudo, a especificidade dessas reações de

ve ser previamente estabelecida por experiências conduzidas no sentido de excluir a possibilidade de interferência de lípidos provenientes do meio de cultura. Esta possibilidade deve ser acentuada sobretudo devido ao fato de que foi demonstrada a presença, nos extratos brutos, de contaminantes derivados do soro bovino empregado no meio de cultura. Por outro lado, a verificação de que entre 10 diferentes soros de coelhos normais testados foi possível obter reação de flo-culação com um deles, sugere a existência de anticorpos naturais em animais criados nas condições habituais. Deste modo, a reatividade dos soros anti T. cruzi poderia também ser atribuída à presença desses anticorpos.

Os extratos brutos, obtidos por qualquer das duas técnicas para a extração dos antígenos, quando submetidos a estudos químicos e imunoeletroforéticos não apresentaram diferenças apreciáveis. Os nossos resultados sobre a relação proteína/polissacarídes, encontrada em ambos os extratos, está de acordo com os resultados encontrados por Fernandes e Castelani, (1966). No entanto, dados discrepantes, dos acima citados foram encontrados por von Brand e McMahon (1959), devendo-se provavelmente atribuir esta discrepância à utilização de diferentes meios de cultura, e ao emprego de diferentes métodos para a extração e dosagem dos antígenos.

A análise eletroforética de EBC e EBD revelaram diferenças na mobilidade relativa dos componentes de EBC e EBD. Duas interpretações podem ser dadas a esse fato: 1. Diferentes componentes estariam presentes em EBC e EBD; 2. Os mesmos componentes estariam presentes nos dois extratos, sendo que a alteração observada na mobilidade eletroforética seria devida à interação do desoxicolato de sódio com os componentes. Os dados acumulados no decorrer deste trabalho não conseguiram demonstrar grandes diferenças entre EBC e EBD, sugerindo que ambos os extratos conten os mesmos componentes.

A comparação de EBC e EBD, contendo igual teor de proteínas, revelou algumas diferenças no padrão imuno-

troforético, quando alguns soros eram utilizados. Essas diferenças podem ser atribuídas a diferenças da concentração relativa dos antígenos existentes em um ou outro extrato, porquanto a comparação desses extratos pela técnica de Ouchterlony resultou sempre numa figura de identidade. Ademais os imune-soros absorvidos com EBC ou com EBD não mais precipitavam com quaisquer dos extratos, indicando que ou ambos os extratos contêm os mesmos determinantes antigênicos ou que a sensibilidade da técnica empregada não permitia detectar as diferenças existentes.

Nas experiências de imunoeletroforese foram observadas figuras de reação cruzada entre o componente presente na região do ponto de partida e componentes de maior ou menor mobilidade eletroforética, indicando provavelmente a presença de um componente antigênico de elevado peso molecular e de componentes estruturalmente relacionados e de menor peso molecular.

Tanto o EBC quanto o EBD possuem a capacidade de inibir a aglutinação do T. cruzi pelos imune-soros. As experiências de fracionamento mostraram que esta propriedade está ligada a componentes de peso molecular provavelmente inferior a 10.000 e a componentes de alto peso molecular, em torno de 200.000, que são excluídos das colunas de Sephadex G 200.

O conjunto de dados obtidos com EBC ou EBD sugerem que esses extratos contêm praticamente os mesmos antígenos. As reações de identidade encontradas indicam que ou não houve desnaturação apreciável durante o emprego das técnicas de extração ou essas técnicas devem ter afetado igualmente os mesmos antígenos. Contudo, a complexidade dos extratos, e a limitação dos métodos de análise empregados, impedem uma conclusão definitiva sobre a superioridade de uma ou de outra técnica de extração. Embora a análise imunoeletroforética mostre um número limitado de sistemas precipitantes, é bem provável que o número de antígenos seja muito maior que os observados em nossas experiências. É sabido que o número de sistemas precipitantes depende essencialmente

da imunogenicidade individual dos componentes e da relação de concentração entre estes antígenos individuais e os anticorpos específicos para estes antígenos (Grabar, 1958). Durante nossas experiências foi sempre observada a presença de um componente capaz de precipitar com todos os soros testados. A existência desse e de outros sistemas precipitantes observados poderia mascarar a presença de componentes presentes em baixa concentração. De fato, empregando-se concentrações maiores desses extratos, vários outros sistemas são aparentes. No entanto, o uso de concentrações elevadas de antígeno nas experiências da imunodifusão devem ser analisadas com cautela, visto que desdobramentos de linhas de precipitação podem ocorrer (Kaminski, 1955).

O fracionamento pela ultrafiltração permitiu a separação de uma fração com constituintes de PM elevado (F1) e um material filtrável (F2) que deu reações positivas com o reativo de biureto e para a pesquisa de carboidratos pela técnica de Dubois. Esta fração (F2), com peso molecular inferior a 10.000, não precipitou com os imune-soros testados nem inibiu a reação de precipitação destes imune soros frente a F1 nas condições indicadas. No entanto, uma inibição da aglutinação das formas vivas de cultivo de T. cruzi, comparável a da F1, foi observada com a F2, quando testada com os diferentes imune-soros, sugerindo que alguns determinantes antigênicos dos antígenos de superfície estão presentes nesta fração. Esses dados dificilmente poderiam ser explicados admitindo-se a hipótese de contaminação da F2 por componentes da F1, pois essa hipótese exigiria como premissa que a F2 e F1 contivessem o mesmo teor do componente responsável pela inibição. Esta premissa pode ser afastada, porquanto os componentes da F1 precipitam com os imune-soros, enquanto que com F2 nenhuma precipitação pode ser detectada. Ademais, experiências preliminares indicam que a capacidade de inibir as reações de aglutinação da F2 desaparece após diálise, enquanto que, em idênticas condições, tal fato não ocorre com a F1. Ao que tudo indica, a capacidade inibitória da F2 é devida a componentes de baixo peso mole-

cular. Fife, (1960), demonstrou a presença de uma fração proteica dialisável em extratos submetidos ao fracionamento, sem no entanto submetê-la a estudos de inibição da aglutinação.

A fração retida nas membranas de ultrafiltração contém praticamente todos os componentes capazes de precipitar com os imune-soros.

Esta fração (F1) cromatografada em Sephadex G 200 pode ser desdobrada em várias sub-frações. Uma dessas, (FA) excluída das malhas do gel, contém pelo menos 3 componentes detectáveis por imunoeletroforese. Esses componentes de alto peso molecular contém pelo menos alguns determinantes antigênicos presentes na superfície das formas de cultivo do T. cruzi, porquanto ou não eram precipitados ou o precipitavam fracamente com os imune-soros absorvidos com as formas vivas de cultivo do T. cruzi. Ademais, a FA inibe fortemente as reações de aglutinação do T. cruzi pelos imune-soros.

Algumas frações obtidas por cromatografia em Sephadex (E e F) não precipitaram com os imune-soros e inibiram, embora fracamente, as reações de aglutinação do T. cruzi. As demais frações (B, C e D) aparentemente continham os mesmos determinantes antigênicos presentes na FA. Contudo, essas frações tinham menor capacidade de inibir essas reações de aglutinação. Esses fatos sugerem que ou as FB e FC estão contaminadas com componentes de FA ou que os componentes das FB e FC de menor peso molecular contém a maior parte dos determinantes antigênicos presentes em FA.

Pode-se isolar de EBC ou de EBD uma fração precipitável a pH 4,5 (FP) e uma fração não precipitável nesta concentração de ions hidrogênio (FS). A FP contém pelo menos 3 componentes antigenicamente relacionados entre si. Esses componentes representam parte do antígeno de superfície do T. cruzi, visto que inibem fortemente as reações de aglutinação, e, ou não precipitam, ou o fazem muito fracamente com os imune-soros absorvidos com as formas vivas do T. cruzi.

A análise de FS pela técnica de Ouchterlony, imunoeletroforese e inibição da aglutinação, mostrou que esta fração está contaminada por componentes de FP. Não foi possível, através dessas técnicas, demonstrar a presença de antígenos exclusivos dessa fração ou das diferentes frações obtidas. Esse fato pode ser explicado admitindo-se que os imune-soros utilizados, preparados contra as formas de cultura, continham maior proporção de anticorpos apenas para um dos componentes presentes nos extratos. Em apoio a essa interpretação, as experiências de imune-difusão pela técnica de Ouchterlony mostraram sempre uma ou duas linhas de precipitação e as experiências de imunoeletroforese mostraram sempre componentes com relação antigênicas entre si, e que continham determinantes antigênicos presentes na superfície do T. cruzi. Esses componentes com diferentes mobilidades eletroforéticas, e provavelmente de diferentes pesos moleculares, representariam fragmentos de antígeno de superfície do T. cruzi.

Tendo em vista estes resultados, torna-se necessária a imunização de animais com frações purificadas a fim de se obter maior discriminação nas análises imunoquímicas. Experiências nesse sentido estão em curso.

Os dados obtidos nesse trabalho mostram que se pode extrair o antígeno de superfície do T. cruzi e obter frações ricas desse antígeno, utilizando-se formas brandas de fracionamento, (ultrafiltração, precipitação no ponto isoelétrico, cromatografia), facilitando, desta maneira, futuros estudos sobre a sua estrutura. Contudo, a experiência acumulada no decorrer da presente investigação, indica que, devido à complexidade do material em estudo, para que se possa aprofundar a análise imunoquímica torna-se necessário contornar algumas dificuldades.

A necessidade da utilização de meios de cultivo que não interfiram na antigenicidade da amostra é imperiosa. A comprovação de que alguns dos imune-soros anti T. cruzi reagiram fortemente contra componentes do soro de vitelo

indica que a pesquisa de alguns determinantes antigênicos do T. cruzi acha-se dificultada pela presença desses componentes que se encontram combinados ou adsorvidos aos antígenos do T. cruzi. Tentativas de contornar esse inconveniente, cultivando o T. cruzi em meios de composição definida (Citri e Grossowicz, 1955) ou em meios dialisáveis foram realizadas em diferentes laboratórios (Fernandes e Castellani, 1968). Os dados disponíveis indicam que esses meios permitem apenas o crescimento de determinadas amostras. Em consequência, os esforços devem ser orientados no sentido de eliminar dos meios complexos, como o de Yeager, os componentes que reagem com os antígenos do T. cruzi.

As linhas de precipitação, formadas entre os componentes dos extratos, e os imune-soros obtidos por imunização prolongada de coelhos com T. cruzi, eram, na maioria das vezes, extremamente tênues, impedindo a sua documentação por métodos de coloração ou por fotografia direta. Por outro lado, apenas um pequeno número de componentes, geralmente guardando relações antigênicas entre si, pôde ser detectado. Esses dados sugerem uma resposta imunitária limitada a um pequeno número de determinantes antigênicos, e indicam a necessidade de se encontrar uma espécie animal adequada para a preparação dos imune-soros.

Os extratos de T. cruzi, conservados a -20° tendem a formar precipitados. Acresce que esses extratos contêm enzimas proteolíticas (Repka et al., 1972) que muito provavelmente degradam parcialmente os antígenos presentes. Essas observações indicam a necessidade de encontrar métodos que permitam estabilizar as características físicoquímicas dos extratos ou de suas frações.

RESUMOS E CONCLUSÕES

1. Os lisados das formas de cultivo de T. cruzi contêm um material insolúvel, contendo proteínas, polissacárides e lípidos. Este material é capaz de absorver anticorpos aglutinantes das formas de cultivo do T. cruzi.
2. Os lípidos extraídos dos sedimentos insolúveis floculam e fixam complemento com imune-soros anti T. cruzi.
3. O sedimento delipidado contém determinantes antigênicos, presentes na superfície das formas de cultivo do T. cruzi.
4. Não foram observadas diferenças apreciáveis na composição antigênica e química dos extratos obtidos quer pela ação do desoxicolato de sódio quer pela ação do congelamento e descongelamento sucessivos, sugerindo que ambos os processos extraem os mesmos componentes.
5. Os EBC e EBD contêm antígenos de superfície das formas de cultivo do T. cruzi. O fracionamento desses extratos por ultrafiltração, cromatografia de exclusão e precipitação no ponto iso-elétrico permite obter frações ricas desses antígenos.

R E F E R E N C I A S B I B L I O G R Á F I C A S

- ADLER, S. (1958) - The action of specific serum on a strain of Trypanosoma cruzi. Ann. trop. Med. Parasit., 52: 282-301,
- BEALE, G.H. (1957) - The antigen system of Paramecium aurelia. Int. Rev. Cytol., 6: 1-23.
- BEISSON, J. and SONNEBORN, T.M. (1965) - Cytoplasmic inheritance of the organization of the cell cortex in Paramecium aurelia. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 53: 275-282.
- BORSOS, T. (1967) - Discussion on immunological aspects of parasitic infections. PAHO Advisory Comm. Med. Res., 150: 100-106.
- BROOM, J.C. and BROWN, H.C. (1940) - Studies in Trypanosomiasis. IV. Notes on the serological character of Trypanosoma brucei after cyclical development in Glossina morsitans. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 34: 53-64.
- BROWN, K.N. (1967) - Nature and variation of parasites antigens. PAHO Advisory Comm. Med. Res., 150: 21-24.
- CAMPBELL, D.H.; GARVEY, J.S.; CREMER, N.E. and SUSSDORF, D.H. (1970) - Immunology, 2a. ed., W.A. Benjamin, Inc., New York, N.Y., USA, 454p.
- CAPPA, S.M.C. and KAGAN, I.G. (1969) - Agar gel and immunoelectrophoretic analysis of several strains of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasit., 25: 50-57.

- CAPRON, A.; BIGUET, J.; VERNES, A. et AFCHAIN, D. (1968) - Structure antigenique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. Path. Biol., 16: 121-138.
- CAPRON, A.; BONNANGE, M.N. and MAUROIS, P. (1969) - Immunological aspects of host parasites relationships in human and experimental filariosis. Conf. on Parasitic Dis., Mitt Washington, D.C., p. 4-6.
- CAPRON, A.R. (1970) - L'antigene parasitaire structure et fonction. J. Parasit., 56: 515-521.
- CHAFFEE, E.F.; FIFE Jr., E.H. and KENT, J.F. (1956) - Diagnosis of Trypanosoma cruzi infection by complement fixation. Am. J. trop. Med., 5: 763-771.
- CHAGAS, C. (1909) - Neue Trypanosomen. Vorläufige Mitteilung. Trypanosoma minasense, n.sp. und Trypanosoma cruzi, n. sp. Arch. Schiffs. Tropenhyg., 13: 120-122.
- CITRI, N. and GROSSOWICZ, N. (1955) - A partially defined culture medium for Trypanosoma cruzi and some other haemoflagellates. J. gen. Microbiol., 13: 273-278.
- DAMIAN, R.T. (1964) - Molecular mimicry: Antigen sharing by parasite and host and its consequences. Amer. Natur., 98: 129-149.
- DAMIAN, R.T. (1967) - Common antigens between adult Schistosoma mansoni and the laboratory mouse. J. Parasitol., 53: 60-64.
- DEANE, M.P. (1968) - O agente etiológico. In: J. Romeu Cançado (Ed.) Doença de Chagas, Belo Horizonte, MG, p. 22-49.
- DESOWITZ, R.S. (1970) - Antiparasitic mechanisms in parasitic infections. J. Parasit., 56: 521-525.

- DINEEN, J.K. (1963a) - Immunological aspects of parasitism. *Nature*, 197: 268-269.
- DINEEN, J.K. (1963b) - Antigenic relationship between host and parasite. *Nature*, 197: 471-472.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. and SMITH, F. (1956) - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- DUPOUEY, P. and MARECHAL, J. (1966) - Structure antigénique des trypanosomes. I. Étude des antigènes de trois espèces de trypanosomes (T.mega, T.cruzi, T.gambiense) par la fixation du complément, la précipitation en gel et l'immunofluorescence. *Ann. Inst. Pasteur*, 110: 888-911.
- FERNANDES, J.F. and CASTELLANI, O. (1966) - Growth characteristics and chemical composition of Trypanosoma cruzi. *Exp. Parasit.*, 18: 195-202.
- FERNANDES, J.F. e CASTELLANI, O. (1968) - Nutrição e crescimento do Trypanosoma cruzi. In: J. Romeu Cançado (Ed.) Doença de Chagas, Belo Horizonte, MG, p. 68-86.
- FIFE Jr., E.H. and KENT, J.F. (1960) - Protein and carbohydrate complement fixing antigens of Trypanosoma cruzi. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 9: 512-517.
- FISHER Jr.; F.M. (1963) - Production of host endocrine substances by parasites. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 113: 63-73.
- FLODIN, P. (1962) - Dextran gels and their applications in gel filtration. *Pharmacia*, Uppsala, Sweden, 3a. ed., 85p.
- FRANKE, E. (1905) - Über Trypanosomentherapie. *München Med. Wschr.*, 52: 2059-2060.

- GOBLE, F.G. (1970) - South American Trypanosomes. In: G.J. Jackson, R. Herman and I. Singer (Ed.), Immunity to Parasitic Animals, vol. II, Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation, New York, N.Y., USA, p. 597-689.
- GRABAR, P. (1958) - The use of immunochemical methods in studies on proteins. Advances in Protein Chem., 13: 1-33.
- GRABAR, P. y BURTIN, P. (1968) - Immunoelctroforesis. Ed. Toray-Masson, S.A., Barcelona.
- GRAY, A.R. (1962) - The influence of antibody on serological variation in Trypanosoma brucei. Ann. trop. Med. Parasit., 56: 4-13.
- GRAY, A.R. (1965) - Antigenic variation in a strain of Trypanosoma brucei transmitted by Glossina morsitans and G. palpalis. J. gen. Microbiol., 41: 195.
- GUERREIRO, C. e MACHADO, A. (1913) - Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. Brasil Med., 27: 225-226.
- HAUSCHKA, T.S.; GOODWIN, M.B.; PALMQUIST, J. and BROWN, E. (1950) - Immunological relationship between seven strains of Trypanosoma cruzi and its application in the diagnosis of Chagas'disease. Am. J. trop. Med., 30: 1-16.
- I.B.B.D. (1958, 1959, 1962, 1963 e 1968) - Doença de Chagas (Bibliografia Brasileira).
- JENKIN, C.R. (1963) - Heterophile antigens and their significance in the host-parasite relationship. Advances in Immunology, 3: 351-376.
- KABAT, E.A. et MAYER, M.M. (1961) - Experimental Immunochemistry, 2a. ed., Charles C. Thomas, Springfield, Ill, USA.

- KAGAN, I.G. and NORMAN, L. (1963) - The isolation and characterization of two host antigens in hydatid fluid of Echinococcus granulosus. Am. J. trop. Med., 12: 346-357.
- KAGAN, I.G. (1967) - Characterization of parasite antigens. PAHO Advisory Comm. Med. Res., 150: 25-36.
- KAMINSKI, M. (1955) - Formation de lignes multiples par un système précipitant simple lors de la précipitation spécifique par double diffusion en Milieu gélifié. Pub. Scient. Techn. du Ministère de l'Air, N.T. 59: 1-14.
- KIRCHNER, J. (1967) - Thin layer chromatography, E.S. Perry and A. Weissberger (Ed.), Interscience Publishers.
- LARANJA, F.S.; DIAS, E.; NOBREGA, G. and MIRANDA, A. (1956) - Chagas' Disease. A clinical, epidemiologic, and pathologic study. Circulation, 14: 1035-1060.
- LISON, L. (1960) - Histochemie et Cytochimie. Animales Principes et Methods, vol. I, Guathier-Villars (Ed.), Paris.
- LOURIE, E.M. and O'CONNER, R.S. (1937) - A study of Trypanosoma rhodesiense relapse strain in vitro. Ann. trop. Med. Parasit., 31: 319-340.
- MAYER, M.M.; OSLER, A.G.; BIER, O.G. and HEIDELBERGER, M. (1948) - Quantitative studies of complement fixation. I.A method. J. Immunol., 59: 195-206.
- MEYER, H. and PORTER, K.R. (1954) - A study of Trypanosoma cruzi with the electron microscope. Parasitology, 44: 16-24.
- MILDER, V.R. (1971) - Contribuição ao conhecimento da ultra estrutura de Tripanossomas. Tese de Doutorado.
- MILES, M.A. and ROUSE, J.E. (1970) - Chagas'disease (South American Trypanosomiasis). Suppl. trop. Dis. Bull., 67: 63-81.

- MILLER, J.K. (1965) - Variation of the soluble antigens of Trypanosoma brucei. Immunology, 9: 521-528.
- MUNIZ, J. e FREITAS, G. de (1944) - Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. II. Isolamento de polisacarídeos de "Schizotrypanum cruzi" e de outros Tripanosomídeos, seu comportamento nas reações de precipitação, de fixação do complemento e de hipersensibilidade. Os "tests" de floculação (sublimado e formol-gel). Rev. Brasil. Biol., 4: 421-438.
- MUNIZ, J. e BORRIELLO, A. (1945) - Estudo sobre a ação lítica de diferentes soros sobre as formas de cultura e sanguícolas do "Schizotrypanum cruzi". Rev. Brasil. Biol., 5: 563-576.
- MUNIZ, J. (1967) - Contribuição para o melhor conhecimento da ação patogênica do S. cruzi no organismo humano. O Hospital, 72: 675-700.
- NUSSENZWEIG, V.; DEANE, L.M. e KLOETZEL, J. (1962) - Diversidade na constituição antigênica de amostras de Trypanosoma cruzi isoladas do homem e de gambás. Rev. Inst. Med. trop., São Paulo, 4: 409-410.
- NUSSENZWEIG, V.; DEANE, L.M. and KLOETZEL, J. (1963) - Differences in antigenic constitution of strains of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasit., 14: 221-232.
- OAKLEY, C.L. (1954) - Bacterial toxins. Demonstration of antigenic components in bacterial filtrates. Ann. Rev. Microbiol., 8: 411-428.
- OGILVIE, B.M. (1970) - Immunoglobulin responses in parasitic infections. J. Parasit., 56: 525-534.
- OKUMURA, M.; BRITO, T. de; SILVA, L.H.P. da; SILVA, A.C. da and CORRÊA NETTO, A. (1960) - The pathology of experimental

Chagas's Disease in mice: I. Digestive tract changes, with a reference to necrotizing arteritis. Rev. Inst. Med. trop., São Paulo, 2: 17-28.

O.M.S. (1965) - Immunologia y enfermedades parasitarias. Informe de un Comité de Expertos de la O.M.S., Org. Mund. Salud, Serv. Inf. Tecn., 315.

OLIVEIRA LIMA, A. e DIAS DA SILVA, W. (1970) - Imunologia, Imunopatologia, Alergia, 1a. ed., Ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, GB, 673p.

OSAKI, H. (1959) - Studies on the immunological variation in Trypanosoma gambiense. (Serotypes and the mode of relapse). Biken J., 2: 113-127.

OUCHTERLONY, O. (1967) - Immunodiffusion and Immuno-electrophoresis. In: B.M. Weir (Ed.), Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

OVARY, Z. (1958) - Immediate reaction in the skin of experimental animals provoked by antibody antigen reaction. Progr. Allergy, 5: 459.

PIZZI, J. (1963) - Aspectos celulares de la inmunidad en la enfermedad de Chagas. An. Cong. Int. sobre a doença de Chagas, 4: 1217-1229.

REPKA, D.; RANGEL, H.A. e COSTA, M.G. (1972) - Atividade proteolítica de extratos de T.cruzi. Ciência e Cultura, 24: 296.

RITZ, H. (1914) - Ueber Rezidive bei experimenteller Trypanosomiasis. Deutsch. Med. Wschr., 40: 1355-1358.

ROY, E. and RITTS, J.R. (1970) - General mechanisms and principles of mammalian immunity. In: G.J. Jackson, R.

- Herman and I. Singer (Ed.), Immunity to Parasitic Animals, vol. II, Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation, New York, N.Y., USA, p. 423-438.
- SALGADO, J.A.; GARCEZ, P.N.; OLIVEIRA, C.E. e GALIZZI, J. (1962) - Revisão clínica atual do primeiro caso humano descrito da doença de Chagas. Rev. Inst. Med. trop., São Paulo, 4: 330-337.
- SCHAD, G.A. (1966) - Immunity, competition, and natural regulation of helminth populations. Amer. Natur., 100: 359-364.
- SENEKJIE, H.A. (1943) - Immunologic studies in experimental Trypanosoma cruzi infections. 2. Slide agglutination and intradermal tests. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 52: 56-59.
- SMITHERS, S.R.; TERRY, R.J. and HOCKLEY, D.J. (1969) - Host antigens in schistosomiasis. Proc. Roy. Soc. B., 171: 483-494.
- SOULSBY, E.J.L. (1963) - The nature and origin of functional antigens in helminth infections. Ann. N.Y. Acad. Sci., 113: 492-509.
- SPRENT, J.F.A. (1959) - Parasitism immunity and evolution. In: The Evolution of Living Organisms, Melbourne University Press, Victoria, Australia, p. 149-165.
- SPRENT, J.F.A. (1969) - Evolutionary aspects of immunity in Zooparasitic infections. In: G.J. Jackson, R. Herman and I. Singer (Ed.), Immunity to Parasitic Animals, vol. I, Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation, New York, N.Y., USA, p. 3-62.
- TARRANT, C.J.; FIFE Jr., E.H. and ANDERSON, R.I. (1965) -

Serological characteristics and general chemical nature of the in vitro exoantigens of T.cruzi. J. Parasit., 51: 277-285.

TORRES, M. (1917) - Estudo do miocárdio na moléstia de Chagas (forma aguda). I: Alterações da fibra muscular cardíaca. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 9: 114-134.

URIEL, J. (1971) - Methods in Immunology and Immunochemistry, Curtis A. Williams and Merriell W. Chase (Ed.), Academic Press, New York, N.Y., USA, p. 294.

Van HEYNINGEN, W.E. (1950) - Bacterial Toxins, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

VIANNA, G. (1911) - Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Molestia de Carlos Chagas". (Esquizotripanose humana ou tireoidite parasitaria). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 3: 276-293.

VICKERMAN, K. (1968) - Cyclical changes in surface structure in pathogenic trypanosomes. Abstracts of Tropical Medicine and Malaria, pp. 304-306.

Von BRAND, T.; McMAHON, P.; TOBLE, E.J.; THOMPSON, M.J. and MOSETTIG, E. (1959) - Chemical composition of the culture form of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasit., 8: 171-181.

WADSWORTH, A.B. (1943) - Métodos standart de la division de laboratorios e investigación del departamento de Sanidad del Estado de Nueva York, 2a. ed., Editorial Labor S.A., Argentina.

WEICHSELBAUM, T.E. (1946) - An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. Am. J. Clin. Path., 10: 40.

WILLIAMS, C.A. and CHASE, M.W. (1967) - Methods in Immunology and Immunochemistry, vol. I, Academic Press, New York, N.Y., USA.