



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE O
Trypanosoma cruzi.

ROSA MARIA SZAROTA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientadora:
Dra. Nanci do Nascimento

São Paulo
2006

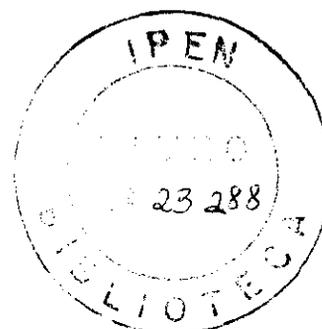
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE O
Trypanosoma cruzi

ROSA MARIA SZAROTA



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora:
Dra. NANCI DO NASCIMENTO

São Paulo
2006

A minha mãe Maria e meu pai Bronislaw "in memoriam",
por todo amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Nanci do Nascimento, minha orientadora, pela oportunidade de concretizar esta etapa da minha vida profissional, orientação, apoio constante, amizade, participação prática e o seu inesgotável otimismo.

Ao Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior pela orientação, colaboração, confiança e ter aberto as portas do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo para realização desse trabalho.

A Marilda Savoia do Nascimento pela transmissão da experiência no cultivo do *Trypanosoma cruzi*, apoio e amizade.

A Dra. Eufrosina Setsu Umezawa pelas sugestões e apoio.

A Roselaine Pereira Alvim Cardoso pelos ensinamentos transmitidos, apoio técnico e amizade.

A Elizabeth S.R. Somessarie e Carlos Gaia da Silveira, CTR – IPEN, por toda a paciência e flexibilidade no processo de irradiação dos materiais utilizados neste trabalho, e pela amizade.

A Dna. Francisca Lucio de Oliveira e demais funcionários do IMTSP pela amizade.

A Maria Neide Ferreira Mascarenhas e demais funcionários do CBM, DALI e CTR do IPEN pela amizade e colaboração.

Ao Franco Cláudio Bonetti, Luciana R. Meireles e demais colegas do IPEN e IMT-FMUSP pela amizade e auxílio.

Ao Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza.

A Faculdade de Tecnologia de Sorocaba - Departamento de Saúde pelo apoio.

A todos que de alguma forma colaboraram, meus sinceros agradecimentos.

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE O

Trypanosoma cruzi

Rosa Maria Szarota

RESUMO

A Doença de Chagas é um dos maiores problemas de saúde pública na América do Sul causando um elevado prejuízo à população. Apesar dos inúmeros esforços para o seu controle, a doença não tem cura e apresenta problemas científicos ainda não esclarecidos. Considerando-se que vários pesquisadores têm usado a radiação ionizante para modificar protozoários ou propriedades imunológicas de biomoléculas, neste trabalho foram estudados aspectos da resposta imunológica induzida em camundongos, resistentes e suscetíveis ao *T. cruzi*, utilizando formas irradiadas deste parasita. Doses baixas de radiação preservaram a capacidade reprodutiva e de invasão celular. Animais resistentes e suscetíveis, imunizados com os parasitas tratados por radiação, produziram anticorpos específicos. Após o desafio, os animais apresentaram baixa parasitemia, com exceção dos grupos imunizados com parasitas que receberam apenas altas doses de radiação. A seleção de formas tripomastigotas foi obtida irradiando-se os parasitas com baixas doses, o que promoveu aprimoramento da qualidade da resposta imune, a exemplo do que se observa quando da utilização de complemento.

Estes dados evidenciam a importância da seleção das formas tripomastigotas para a imunização contra o *T. cruzi* e apontam a radiação ionizante como alternativa para este fim, uma vez que quando a seleção é feita utilizando-se complemento, depara-se com a dificuldade de sua remoção, colocando em risco o processo de imunização por introduzir substâncias estranhas ao organismo.

**INFLUENCE OF IONIZING RADIATION ON
*Trypanosoma cruzi***

Rosa Maria Szarota

ABSTRACT

Chagas's disease is one of the major public health problems in South America, promoting high prejudice to the local population. Despite the massive efforts to control it, this disease has no cure and presents puzzling unsolved questions. Considering that many researchers have used ionizing radiation to modify protozoans or biomolecules, we investigated the immunological response aspects of susceptible and resistant mice using irradiated parasites. Low radiation doses preserved the reproductive and invasive capacities of the parasite. Both susceptible and resistant animals, after immunization with irradiated parasites produced specific antibodies. After a challenge, the animals presented low parasitemia, excepting those immunized with the antigen irradiated with higher doses. Using low radiation doses, we were able to selectively isolate trypomastigotes, leading to an improvement in the quality of the immune response, as previously reported when performing complement system assays.

These data highlight the importance of selecting trypomastigote forms for immunization against *T. cruzi* and point towards ionizing radiation as an alternative to achieve this selection, since when this procedure is performed using complement, the subsequent steps are impaired by the difficulties to remove this component from the system.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.1.1. Ciclo biológico	4
1.1.2. Transmissão	6
1.1.3. Relação parasita-hospedeiro	7
1.2. Radiação ionizante	10
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Reagentes	13
3.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
3.2.1. Formas de <i>T. cruzi</i> mantidas em cultivo	13
3.2.1.1. Manutenção em laboratório do <i>T. cruzi</i>	13
3.2.1.2. Contagem de parasitas	13
3.2.2. Formas sanguícolas	14
3.3. Animais experimentais	14
3.4. Irradiação de amostras	14
3.4.1. Amostras de <i>T. cruzi</i>	15
3.5. Viabilidade das formas irradiadas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
3.5.1. Aspectos da Biologia Celular	15
3.5.1.1. Teste de viabilidade por diluição limitante	15
3.5.1.2. Ensaio de invasão celular, por <i>T. cruzi</i> de cultivo irradiado	16
3.5.2. Ensaio metabólicos com <i>T. cruzi</i> - teste MTT	16
3.6. Seleção de formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> utilizando soro de cobaio	17
3.6.1. Obtenção de complemento de cobaio	17

3.6.2. Ensaio de seleção de formas metacíclicas	17
3.7. Ensaio imunológico	18
3.7.1. Imunização	18
3.7.1.1. Protocolo de imunização	18
3.8. Obtenção de soro dos animais experimentais	19
3.9. Desafio dos animais pré-imunizados	20
3.9.1. Verificação da parasitemia	20
3.10. Ensaio Imunoenzimático (método de ELISA)	20
3.10.1. Antígeno extrato alcalino solúvel	20
3.10.2. Padronização Teste de ELISA	21
3.10.3. Teste de ELISA	21
3.11. Teste de Avidéz de anticorpo IgG	21
3.12. Observação microscópica dos parasitas	22
3.13. Análise Estatística	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Viabilidade das formas de <i>T. cruzi</i>	24
4.1.1. Aspectos da Biologia Celular	24
4.1.1.1. Capacidade Reprodutiva	24
4.1.1.2. Infectividade de células	24
4.1.2. Ensaio metabólicos das formas de <i>T. cruzi</i> - teste MTT	25
4.2. Tratamento das formas de <i>T. cruzi</i> com complemento de cobaio	26
4.3. Ensaio imunoenzimático – ELISA	27
4.3.1. Padronização para o Ensaio Imunoenzimático	27
4.3.2. Avaliação da imunogenicidade pelo Ensaio Imunoenzimático	28
4.3.3. Determinação da avidéz de anticorpo IgG por método imunoenzimático	31
4.4. Avaliação de camundongos pré-imunizados e desafiados com formas sangüícolas de <i>T. cruzi</i>	32
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	52
APÊNDICES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE TABELAS

	Página
01. Resumo dos grupos de tratamento das formas de <i>T.cruzi</i> utilizadas como inóculos.	19

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Distribuição da Doença de Chagas no continente americano.	1
2. Corte da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> (microscopia eletrônica).	4
3. Ciclo Biológico do <i>T. cruzi</i> no hospedeiro definitivo.	5
4. <i>Triatoma infestans</i> .	6
5. Comparação da capacidade respiratória mitocôndrial de <i>T. cruzi</i> .	25
6. Sobrevivência de parasitas ao tratamento por Complemento.	26
7. Análise de diferentes diluições dos soros positivos para <i>T. cruzi</i> .	27
8. Análise de soro positivo para cepa Y de <i>T. cruzi</i> frente aos antígenos homólogos em diferentes concentrações para padronização dos ensaios imunoenzimáticos.	28
9. Produção de anticorpos IgG específicos contra <i>T. cruzi</i> em camundongos BALB/c.	29
10. Produção de anticorpos IgG específicos contra <i>T. cruzi</i> em camundongos C57BL/6.	30
11. Porcentagem de avidéz dos anticorpos produzidos em camundongos BALB/c que receberam <i>T. cruzi</i> com ou sem tratamento.	31
12. Distribuição do índice de avidéz dos anticorpos produzidos em camundongos BALB/c.	32
13. Título de anticorpos produzidos em camundongos BALB/c por formas de <i>T. cruzi</i> selecionadas por radiação e desafiados com formas sanguícolas de <i>T. cruzi</i> .	33
14. Título de anticorpos produzidos em camundongos BALB/c por preparações de <i>T. cruzi</i> selecionadas por radiação com baixa dose ou ação do complemento, e desafiados com formas sanguícolas de <i>T. cruzi</i> .	34

15. Título de anticorpos produzidos em camundongos C57BL/6 por preparações de <i>T. cruzi</i> selecionadas por radiação e desafiados com formas sanguícolas de <i>T. cruzi</i> .	35
16. Título de anticorpos produzidos em camundongos C57BL/6 por preparações de <i>T. cruzi</i> selecionadas por radiação com baixa dose ou ação do complemento, e desafiados com formas sanguícolas de <i>T. cruzi</i> .	36
17. Parasitemia após desafio com formas sanguícolas em camundongos BALB/c pré-imunizados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> tratados ou não com radiação gama .	37
18. Parasitemia após desafio com formas sanguícolas em camundongos BALB/c pré-imunizados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> tratados ou não com radiação gama e desafiados com formas sanguícolas.	38
19. Parasitemia após desafio com formas sanguícolas em camundongos C57BL/6 pré-imunizados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> tratados ou não com radiação gama.	39
20. Parasitemia após desafio com formas sanguícolas em camundongos C57BL/6 pré-imunizados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> tratados ou não com radiação gama e desafiados com formas sanguícolas.	40

ABREVIATURAS

B.O.D. - Biochemical Oxygen Demand (Demanda Bioquímica de Oxigênio – DBO)

CBM - Centro de Biologia Molecular

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CTR - Centro de Tecnologia das Irradiações

DALI - Divisão de Animais de Laboratório do IPEN

IMTSP - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

OPD - Ortofenilenodiamina

IgG - Imunoglobulinas classe G

LIT - Liver infusion tryptose

PBS - phosphate buffered saline (tampão fosfato em solução salina)

PBSTL - Salina Tamponada com fosfato contendo Tween 20 e leite em pó desnatado

S.F.B. - Soro fetal bovino

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas, também denominada tripanossomíase americana, é uma infecção generalizada, essencialmente crônica causada pelo protozoário flagelado, parasita intracelular obrigatório *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909) que pertence à família *Trypanosomatidae* (ordem *Kinetoplastida*). O nome da doença homenageia seu descobridor, o médico e cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, protagonista de um caso único na história da medicina: descreveu a anatomia patológica, a epidemiologia, as formas clínicas, os meios de transmissão, a profilaxia e a sintomatologia do mal. O nome dado ao agente etiológico, *T. cruzi*, homenageia outro grande cientista brasileiro, Oswaldo Cruz, amigo e mestre de Chagas.

A infecção humana é restrita ao continente americano e tem uma ampla distribuição geográfica estendendo-se do México ao sul da Argentina (FIG.1), com forte incidência no Brasil. É endêmica em 21 países, atingindo de 16 a 18 milhões de pessoas, onde aproximadamente 100 milhões, cerca de 25% da população da América Latina, estão em risco de adquirir a Doença de Chagas, causando grande perda econômica para o continente, devido à mortalidade e incapacidade causada em adultos jovens produtivos economicamente (Dias *et al.*, 2002; WHO, 2005).



FIGURA 1. Distribuição da Doença de Chagas no continente americano.
(<http://geo.arc.nasa.gov/sge/health/sensor/diseases/chagas.html>, 2005).

No homem, a Doença de Chagas apresenta duas fases: uma fase aguda caracterizada por elevada parasitemia, a qual é rápida após a infecção e uma fase crônica após um período silencioso que pode durar vários anos. A fase aguda não é fatal na maioria dos casos, é geralmente observada em criança, caracteriza-se por febre, enfartamento de gânglios, esplenomegalia e hepatomegalia, ou inflamação no local da infecção. Na maioria dos casos, após um período sem manifestações clínicas, quando os indivíduos infectados podem permanecer sem sintomas, aproximadamente um terço dos casos agudos desenvolvem, após 10 a 20 anos, a fase crônica, que causa lesões irreversíveis afetando órgãos como coração, esôfago e cólon, com dilatações e desordem na condução nervosa destes órgãos (Rey, 1991; Rassi *et al.*, 1997; WHO, 2005). Estima-se que 27% dos infectados desenvolvem cardiopatia crônica que pode levar à morte súbita por falência do coração; 6% desenvolvem danos digestivos principalmente megaviscera e 3% apresentam envolvimento do sistema nervoso periférico. Foram observadas severas alterações e comprometimento do aparelho digestório causados pelo *T.cruzi*, na infecção experimental em camundongos, como aumento do cólon, alterações da camada muscular do intestino e a perda das dobras do cólon e plexos mioentéricos (Guillen *et al.*, 2001).

Na fase aguda, a infecção induz danos nas terminações nervosas simpáticas do coração em ratos, com significativo parasitismo do miocárdio e numerosos macrófagos ativados, sugerindo o envolvimento de macrófagos e fatores do parasita (Mello & Machado, 1998).

A Doença de Chagas tem sido considerada por alguns pesquisadores como uma doença auto-imune por reação de antígenos cruzados. Células cardíacas, neurais, nervos periféricos, plexo mioentérico entre outras têm reação com antígenos de *T.cruzi*. Há descrição de um epítipo da miosina cardíaca, específico de reação cruzada com antígeno de *T.cruzi*, o qual tem sido sugerido como iniciador da reação auto-imune cardíaca específica durante a Doença de Chagas.

O *T.cruzi* apresenta um ciclo biológico complexo, envolvendo um hospedeiro invertebrado, triatomíneo hematófago da subfamília *Triatominae*, e várias espécies de mamíferos, inclusive o homem.

A doença pode ser prevenida principalmente pelo controle do inseto transmissor, o barbeiro, e pela seleção de doadores em bancos de sangue. Embora possa ser

curada, em geral no início, a doença ainda é endêmica em muitas áreas do interior do país, exigindo pesquisas sobre novas drogas contra o *T. cruzi* e novas formas de combater o barbeiro. Um grande avanço no combate à transmissão da Doença de Chagas tem sido realizado pelo controle da presença de triatomíneo hematófago no ciclo doméstico do *T. cruzi* nos diferentes países da América do Sul. Especificamente no Brasil estão sob controle 10 estados (WHO, 2005). O tratamento é limitado a toxicidade dos medicamentos, benzonidazol e nifurtimox, indicados para o tratamento de casos agudos, crônicos recentes ou de baixa idade (15 anos ou menos), na reativação da parasitemia em casos de queda das defesas imunológicas (por drogas imunossupressoras e radiações), em co-infecções pelo vírus HIV, para prevenir a infecção em acidentes de laboratório e em transplantes com doador infectado. A pouca eficácia da quimioterapia contra o parasita nos indivíduos cronicamente infectados, desenvolve as formas cardíaca e digestiva da doença, que ainda é o maior problema de saúde para o paciente chagásico, além de poder reativar a doença em imunodeficientes.

1.1. *Trypanosoma cruzi*

A morfologia do *T. cruzi* depende da forma analisada, sendo alongado com flagelo que se estende ao longo da célula formando a membrana ondulante nas formas tripomastigotas e epimastigotas, e ovais sem flagelo, nas amastigotas. Como organismo eucariótico, apresenta núcleo central, mitocôndria que se estende por todo comprimento do parasita, aparelho de Golgi, retículo endoplasmático, ribossomos, flagelo único e membrana ondulante (FIG.2). Apresenta uma organela em forma de disco e composta de DNA (K-DNA) envolto por dupla membrana mitocondrial, denominada de cinetoplasto, que é característica da família e, dependendo da sua posição na célula do parasita em relação ao núcleo, dá-se o nome as formas evolutivas (Hoare, 1972).



FIGURA 2. Corte da forma epimastigota de *T. cruzi* (microscopia eletrônica). Podem ser observados núcleo (N); cinetoplasto (C); flagelo (F); mitocôndria (M); vacúolo (V); bolsa flagelar (BF). (<http://www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy02/trypanosoma.htm>, 2005)

As abordagens biológicas e moleculares dos estudos do *T. cruzi* têm mostrado uma diversidade em parasitas isolados de áreas geográficas diferentes (Higo *et al.*, 2004). De fato, o *T. cruzi* é formado por grupos de subpopulações heterogêneas que apresentam características específicas, incluindo histotropismo distinto. Estes estudos demonstraram que a população do *T. cruzi* é complexa, composta por diferentes linhagens, que circulam ou nos ciclos de transmissão silvestre (*T. cruzi* I) ou nos de transmissão doméstica (*T. cruzi* II). A interação dos clones com diferenças infectantes do complexo "cruzi" e o hospedeiro humano irá determinar a morbidade da doença (Devera *et al.*, 2003; Macedo *et al.*, 2004).

1.1.1. Ciclo biológico

O ciclo biológico do *T. cruzi* é complexo e envolve as formas: tripomastigota, epimastigota e amastigota. O homem e outros mamíferos, considerados hospedeiros definitivos, são naturalmente infectados por formas tripomastigotas metacíclicas, transmitidas por triatomíneos hematófagos da subfamília *Triatominae*, junto com as dejeções durante o repasto sanguíneo (FIG.3). Após penetrarem no organismo, através de solução de continuidade da pele ou mucosa íntegra, as formas tripomastigotas metacíclicas transformam-se em amastigotas dentro de células, as quais se reproduzem por sucessivas divisões binárias e transformam-se novamente em tripomastigotas. A célula

parasitada se rompe e as formas, através da corrente sanguínea e linfática, podem parasitar outras células (principalmente fibras musculares cardíacas, lisas e estriadas, macrófagos, células de Schwan e neurônios) ou serem ingeridas pelo hospedeiro intermediário.

No hospedeiro intermediário a forma tripomastigota do parasita, após ser ingerida durante o repasto sanguíneo do triatomíneo em indivíduo parasitado pelo *T. cruzi*, transforma-se em forma epimastigota que se multiplica por divisão binária no intestino médio e, no intestino posterior, transforma-se em tripomastigota metacíclico, saindo junto com as dejeções do inseto durante o hematofagismo (Hoare, 1972; Brener, 1997).

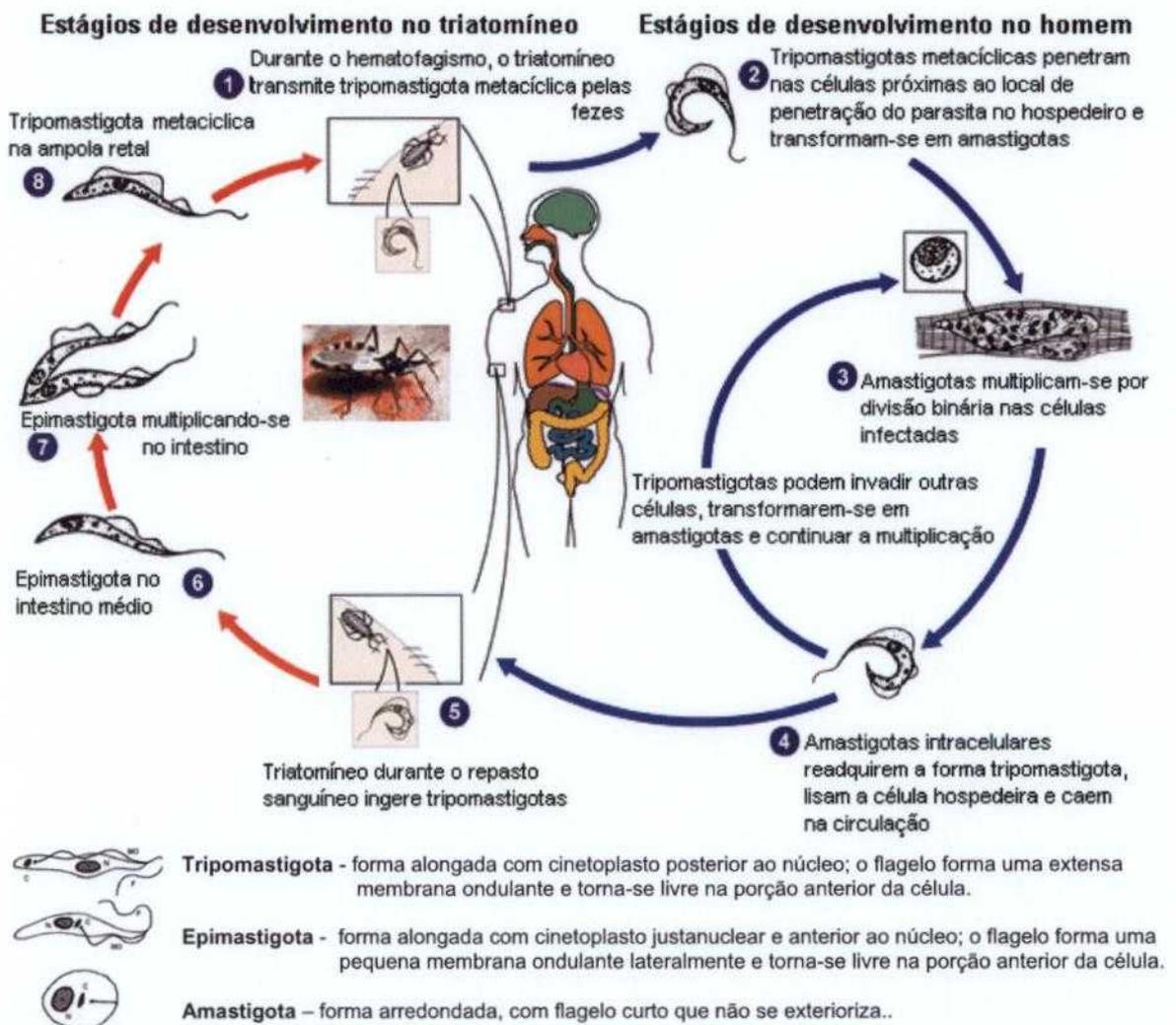


FIGURA 3. Ciclo Biológico do *T. cruzi* no hospedeiro definitivo (homem e outros mamíferos) e no hospedeiro intermediário, triatomíneos, popularmente conhecidos como barbeiro. (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx> modificado, 2005).

1.1.2. Transmissão

A transmissão pode ocorrer naturalmente ao homem e a mais de 100 espécies de mamíferos, silvestres e domésticos, de diferentes ordens, pelo vetor biológico hematófago da subfamília *Triatominae* (80 a 90%) (FIG.4). A transmissão ocorre ainda por transfusão de sangue (5 a 20%), transplante de órgãos (rim ou coração) e, com menor incidência, transmissão congênita (0,5 a 8%), por meio de alimentos contaminados com fezes de triatomíneos, amamentação ou acidentes de laboratório (Neto *et al.*, 1996; Brener, 1997; Dias, 2000). A transfusão de sangue é o segundo meio mais freqüente de transmissão da Doença de Chagas em países endêmicos.



FIGURA 4. *Triatoma infestans*, triatomíneo hematófago, hospedeiro intermediário da Doença de Chagas (<http://icb.usp.br/marcelcp/Imagens/f-hemi11c.jpg>, 2005).

A profilaxia para Doença de Chagas inclui controle químico do vetor, melhoria das habitações em regiões endêmicas para evitar a domiciliação do vetor, controle da transmissão transfusional através da triagem sorológica de todos os doadores de sangue e adoção de normas de biossegurança para evitar a contaminação em laboratórios (Dias *et al.*, 2002).

Os estudos sobre *T.cruzi* e Doença de Chagas são voltados não só para a educação das populações expostas à transmissão natural pelo inseto vetor e controle do vetor; há estudos que propõem alternativas profiláticas importantes para áreas endêmicas. Para a triagem sorológica dos doadores de sangue, que não é sempre realizada, foi preconizada a utilização de drogas tripanocidas como a violeta genciana pura ou em conjunto com ácido ascórbico e foto-irradiação, diminuindo dessa forma a concentração da violeta genciana. A violeta genciana altera a cor do sangue, o que torna a sua utilização não bem aceita (Ramirez *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 1996). Estes estudos voltam-se para o aprimoramento do

diagnóstico e tentativa de imunização dos indivíduos frente à possibilidade de exposição às formas tripomastigotas metacíclicas.

1.1.3. Relação parasita-hospedeiro

A Doença de Chagas é muito antiga nas populações latinas, 9.000 anos atrás, como demonstrado por Aufderheide e colaboradores(2004), através do encontro de DNA de *T. cruzi* em tecidos de 40,1% de 283 múmias humanas da região do deserto de Atacama, norte do Chile e sul do Peru. Estes resultados sugerem que o ciclo silvestre estava estabelecido antes dos primeiros povoadores humanos do segmento da costa Andina (membros da cultura Chinchorro) entrarem em contato com outros mamíferos hospedeiros do parasita.

A causa para prevalência da doença entre os primeiros povoadores da América do Sul foi o estilo de suas casas, feitas de palha, o tipo de esconderijo considerado ideal para os insetos transmissores. Muitos animais adaptaram-se a presença do *T. cruzi*, manifestando poucos ou nenhum efeito conseqüente da parasitemia. Provavelmente a doença é mais antiga entre animais silvestres. Nos dias de hoje, são encontrados percentagens semelhantes de indivíduos parasitados nas populações, sendo a variação na severidade da doença devido ao polimorfismo genético ou expressão da trans-sialidase pelo parasita.

A proteção contra *T. cruzi* é dependente da imunidade inata e adquirida, que são reguladas por citocinas (Silva *et al.*, 1995; Abrahamsohn & Coffman, 1996). IFN- γ recombinante tem capacidade de ativar macrófagos para matar *T. cruzi* e quando administrado em camundongos observou-se um aumento da resistência (Reed, 1988; Hoff, 1975). Observou-se que a neutralização da IL-4 reduz a parasitemia e mortalidade, sugerindo que a IL-4 endógena induz à suscetibilidade ao *T. cruzi*, principalmente por supressão da produção de IFN- γ e óxido nítrico, os quais têm atividade tripanocida. Em relação à infecção pelo *T. cruzi*, foi observada a suscetibilidade de camundongos da linhagem BALB/c e resistência da linhagem C57BL/6 (Hiyama *et al.*, 2001). Takehara e colaboradores (1981) demonstraram a proteção em camundongos suscetíveis, na fase aguda da infecção, devido à transferência de soro imune e demonstraram que a proteção é devida aos anticorpos da classe de imunoglobulinas (Ig) G, particularmente IgG2b. Os autores sugerem que estes anticorpos mantêm a parasitemia em nível muito baixo na fase crônica da infecção, levando a um equilíbrio entre o parasita e

o hospedeiro. Avaliando-se os anticorpos de camundongos irradiados com dose subletal do corpo inteiro (8 Gy), foi observada a manutenção do nível constante de anticorpos antes e após a irradiação, mas o nível de anticorpos livres diminuiu após a irradiação, sugerindo que estes são importantes no controle da fase crônica (Umekita *et al.*, 2000).

O grande desafio da Doença de Chagas é entender o mecanismo imunológico que controla a multiplicação do *T.cruzi* durante a infecção crônica e a imunopatogenese. Tais conhecimentos podem contribuir para novas tentativas de tratamento e/ou evitar o desenvolvimento da forma sintomática da Doença de Chagas (Brener & Gazzinelli, 1997; Dias *et al.*, 2002).

Vários tipos de vacinas estão sendo testados para a Doença de Chagas e nas inúmeras propostas, conseguiu-se atenuar a infecção experimental. Entre estes imunógenos há parasitas atenuados da cepa CL-14 (Paiva *et al.*, 1999), plasmídeo contendo gene da transialidase de *T.cruzi* e formas sangüícolas da cepa Y (Umekita *et al.*, 1999). Os experimentos tentam explicar a complexa resposta imunológica, tanto celular quanto humoral.

Há variação nos tipos das formas dos parasitas nas tentativas de imunização como as utilizadas para testes sorológicos na pesquisa de anticorpos. As formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, encontradas no intestino do triatomíneo, podem ser encontradas em cultivo entre 26,6°C a 28°C. As variações das formas nas culturas são influenciadas pelo pH modificado das culturas devido ao metabolismo do parasita e idade do cultivo (Hanson *et al.*, 1976). Tomlinson e colaboradores (1995) observaram que o pH ácido e a indução ácida extracelular levam à transformação de formas tripomastigotas em formas arredondadas, semelhantes às amastigotas.

Berrizbietia e colaboradores (2004) realizaram estudo com três testes imunoenzimáticos para o diagnóstico da Doença de Chagas desenvolvido com formas fixadas (epimastigota, amastigota, tripomastigota) do *T.cruzi*, onde todos os testes com soros positivos tiveram 100% de sensibilidade e quanto a especificidade, 97,6% para amastigota, 98,3% para epimastigota e 99,3% para tripomastigota, que permaneceu estável por mais de 4 meses a 4°C e à temperatura ambiente. Os autores sugerem a utilização de testes imunoenzimáticos com formas tripomastigotas em bancos de sangue.

Há desta forma necessidade de se aprofundar os estudos com as formas tripomastigotas, para tanto alguns autores têm utilizado técnicas para purificar as formas tripomastigotas como Jacobson e colaboradores (1992), que observaram que as formas epimastigotas são lisadas via complemento. As formas tripomastigotas de cultivo celular e as sangüícolas não são lisadas somente por complemento, mas na presença de anticorpo específico para o parasita e complemento. CHAO e colaboradores (1985) observaram que há subpopulações de tripomastigotas onde ocorre lise discreta quando tratadas com complemento. Compararam também a lise entre as formas de cultura de *T.cruzi* por soro de camundongo normal ou rato, e observam que é restrita às formas epimastigotas enquanto as tripomastigotas metacíclicas são mais resistentes. Entretanto pode haver lise entre 12 a 26% das formas tripomastigotas metacíclicas com complemento recentemente coletado, sendo que o congelamento reduz os títulos de lise.

Para a purificação de formas tripomastigotas de *T.cruzi* em cultivo celular, Hiyama e colaboradores (2001) utilizaram CM - celulose, obtendo 99% de formas. Parussini e colaboradores (1998) observaram que a diferença de cargas totais nas membranas entre os estágios epimastigota, amastigota e tripomastigota do *T.cruzi* apresentada está relacionada ao isomorfismo da proteinase de cisteína identificada em epimastigota e que faz parte da membrana citoplasmática. Paiva e colaboradores (1999a) utilizaram a purificação de formas tripomastigotas metacíclicas em coluna de DEAE celulose.

Diversos trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de descobrir novos tratamentos e ainda produzir vacinas eficazes contra os protozoários causadores de diversas doenças no homem. Porém, as vacinas produzidas com antígenos de parasitas mortos ou com proteínas específicas mostraram-se pouco eficazes ou com baixa especificidade (Marzochi *et al.*, 1998), quando comparados com outros métodos como, por exemplo, o uso de parasitas irradiados com radiação ionizante (Alexander, 1982).

A radiação ionizante vem sendo uma importante ferramenta empregada desde a década de 50, onde a irradiação de larvas de *Dictyocaulus viviparus*, causadores de bronquite parasitária em gados, tornou possível a produção de uma vacina eficaz. Efetivas imunizações, em animais de laboratório,

têm sido alcançadas com várias espécies de protozoários irradiados (Wales & Kusel, 1992).

1.2. Radiação ionizante

A ionização é o principal meio pelo qual a energia da radiação ionizante é transferida para tecidos biológicos. É o processo pelo qual um ou mais elétrons são retirados das camadas mais externas de um átomo ou molécula, resultando na formação de um par iônico, negativo ou positivo.

Em adição à ionização, ocorre a excitação, onde um elétron, da camada externa de um núcleo-alvo, absorve energia suficiente para elevar seu estado energético, permanecendo associado ao átomo e emitindo energia sob forma de radiação visível ou ultravioleta (Grosch & Hoopywood, 1979).

A radiação, por promover desdobramento das moléculas protéicas, as tornam mais sensíveis aos outros fatores físico-químicos. Além disso, a radiação pode colaborar para a formação de ligações covalentes intermoleculares levando ao surgimento de dímeros, trímeros e outros.

A irradiação de proteínas, em solução aquosa, tem sido estudada por causar mudanças químicas e alterações nas propriedades físico-químicas e nas estruturas primárias, secundárias e terciárias das proteínas. Estas mudanças estão relacionadas com perda de atividade biológica, além de poder interferir nas propriedades imunológicas após a irradiação.

Esses efeitos em macromoléculas são potencializados quando o fenômeno ocorre em solução aquosa. Há deposição da maior parte da energia da radiação nas moléculas de água, pelo processo denominado de radiólise da água.

Os efeitos causados pela radiação são decorrentes da interação entre a ação direta e a indireta. Na ação direta sobre a molécula alvo, há transferência de energia, provocando ionização e alterações nas propriedades físico-químicas e perda de função biológica, como enzimática, hormonal ou tóxica e com alteração das propriedades imunológicas (Hrazdira & Skalka, 1970). O efeito indireto da radiação ocorre com o material em solução e é maior na presença de oxigênio e conta com o efeito protetor de outras possíveis substâncias orgânicas presentes no meio. Este fato mostra que o efeito final diferirá de acordo com as condições de irradiação. Uma vez que a água constitui a grande maioria do material biológico, muitas das interações da radiação resultam na produção de OH',

elétron aquoso, H₂O₂ e uma variedade de produtos potencialmente danosos. Esses produtos da radiólise da água podem difundir e reagir com macromoléculas bioquimicamente ativas, causando perda de atividade biológica (Nascimento *et al.*, 1996).

Vários autores têm usado a radiação ionizante para modificar protozoários, buscando novas alternativas de tratamento e diagnóstico. Hanson *et al.* (1976) irradiaram, com 2 kGy, formas tripomastigotas e amastigotas procedentes de cultivo, tornando-as incapazes de produzir infecção em células VERO ou camundongos isogênicos susceptíveis. Imunizaram camundongos com estas formas e, após desafio, observaram diminuição da parasitemia, dos sinais da fase aguda da doença e da mortalidade dos animais.

Trabalhos como este serviram de estímulo para entender os mecanismos envolvidos na resposta imune humoral desencadeada pelo *T. cruzi* usando como ferramenta a radiação ionizante. Em resposta ao tratamento com a radiação ionizante, o parasita pode apresentar modificações em sua membrana celular pela oxidação de moléculas, o que pode melhorar a resposta imunológica por facilitar o processo de apresentação de antígenos ao sistema imunológico. Em adição a obtenção de um melhor imunógeno, há a possibilidade de seleção de formas tripomastigotas metacíclicas as quais são encontradas em menor quantidade nas amostras de cultivo, tornando possível obter quantidades significativas destas formas infectantes do *T. cruzi* relacionadas à indução de proteção.

2. OBJETIVOS

Estudar imunógenos irradiados capazes de gerar imunidade humoral e proteção contra *Trypanosoma cruzi* em camundongos.

Especificamente:

- Determinar a dose de radiação em fonte de ^{60}Co que inibe a reprodução dos parasitas mantendo suas características morfológicas e biológicas;
- Analisar *in vivo* a manutenção da viabilidade do parasita e inibição da reprodução segundo a parasitemia e ativação do sistema imune;
- Comparar a resposta imunológica entre camundongos suscetíveis e resistentes ao *T. cruzi*;
- Avaliar a capacidade da radiação ionizante de selecionar formas do parasita com maior capacidade imunogênica e indutora de proteção.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Os reagentes químicos utilizados nos experimentos eram de grau pró-análise e a água, purificada em sistema Milli Q (Millipore). A especificação de alguns reagentes está citada ao longo do texto.

3.2. *Trypanosoma cruzi*

Neste trabalho foram utilizadas formas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* de cultivo para os experimentos de imunização e formas sangüícolas para desafio de animais imunizados.

3.2.1. Formas de *T.cruzi* mantidas em cultivo

As formas de *T.cruzi*, para manutenção em cultivo e posterior utilização nos experimentos, foram cedidas pela Dra. Eufrosina S. Umezawa do Laboratório de Protozoologia do IMT-FMUSP-SP.

3.2.1.1. Manutenção em laboratório do *T.cruzi*

As formas de *T.cruzi* foram cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) com S.F.B. a 10% sem antibiótico, e incubadas à temperatura de 26°C em estufa tipo B.O.D. Procedeu-se o repique das culturas a cada 7 dias.

O meio LIT (pH 7,35) foi preparado segundo protocolo padrão estabelecido pelo Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical (anexo A).

Nos experimentos foram utilizados parasitas com 7 dias de cultivo, contendo formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas.

3.2.1.2. Contagem de parasitas

Para estabelecer o número de parasitas durante os experimentos foram feitas contagens das amostras, utilizando diluições seriadas, na base 10, do

meio contendo parasitas em tampão fosfato pH 7,2 com formaldeído a 2%. As contagens foram realizadas em câmara de contagem de Neubauer, com 0,9 mm³ de volume total da câmara espelhada, utilizando 10µl da amostra diluída em duplicata.

3.2.2. Formas sangüícolas

Tripomastigotas sangüícolas de *T.cruzi* foram utilizadas no desafio de animais pré-imunizados. Estas formas foram mantidas em camundongos CBA, com repiques a cada 7 dias, e foram cedidas pelo Dr. Luiz Augusto C. Passos do CEMIB/UNICAMP.

3.3. Animais experimentais

A fim de avaliar a infectividade e capacidade imunogênica das formas irradiadas de *T.cruzi*, foram realizados estudos com camundongos machos isogênicos, com aproximadamente 20g, das linhagens BALB/c e C57BL/6, respectivamente susceptíveis e resistentes à infecção pela cepa Y de *T. cruzi*. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP e mantidos com água e ração comercial *ad libitum* na Divisão de Animais de Laboratório do IPEN (DALI).

Todos os procedimentos com animais seguiram os "Princípios de Ética na Experimentação Animal" (COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

3.4. Irradiação de amostras

O processo de irradiação foi realizado no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN-SP, em fonte de ⁶⁰Co (GAMMACELL, Atomic Energy of Canadá, Ltd.), de forma homogênea, em presença de oxigênio, a uma taxa de dose de 4,29 kGy/hora.

Foram irradiadas formas de cultivo de *T.cruzi*, com e sem tratamento com complemento de cobaio.

3.4.1. Amostras de *T.cruzi*

Para a irradiação das amostras de *T.cruzi* a concentração era de 1×10^7 parasitas por mililitro de meio LIT sem S.F.B.

As doses de radiação utilizadas foram 100 e 400 Gy, com atenuador de 90% a uma taxa de dose de 0,429 kGy/hora, e 1 kGy a 6 kGy, sem atenuador.

Durante todos os procedimentos foi mantida uma amostra controle do lado de fora do irradiador.

Todas as amostras tratadas por radiação foram lavadas com meio LIT antes de serem utilizadas.

As amostras tratadas com radiação e/ou complemento e/ou posteriormente com radiação de 2 kGy, foram lavadas entre os procedimentos, com intervalo superior a 3 horas. Utilizou-se dose fracionada.

3.5. Viabilidade das formas irradiadas de *T. cruzi*

Para avaliar a viabilidade das formas e definir as doses de radiação a serem adotadas durante os procedimentos, foram observados os seguintes aspectos: inibição da reprodução *in vitro*, teste do MTT e invasão de células RAW.

3.5.1. Aspectos da Biologia Celular

3.5.1.1. Teste de viabilidade por diluição limitante

A viabilidade das formas irradiadas de *T. cruzi* foi avaliada em diferentes concentrações por meio da reprodução *in vitro*.

Foram irradiadas formas de parasitas de cultivo na concentração de 1×10^7 parasitas por mililitro de meio LIT sem S.F.B., com doses de 100 e 400 Gy, com atenuador de 90% e com doses de 1; 2; 3; 4; 5 e 6 kGy para avaliação da morfologia e capacidade reprodutiva.

Os parasitas irradiados e não irradiados (controle) foram colocados em placas com 96 poços (CORNING®), com diluição progressiva (1:5), na concentração inicial 1×10^7 parasitas por mililitro em meio LIT com 10% S.F.B. As placas foram incubadas em estufa tipo B.O.D. à 26°C. As culturas foram acompanhadas por morfologia e movimentos em microscópio invertido, sem interrupção do cultivo.

A observação da morfologia fina e a contagem dos parasitas foram realizadas semanalmente por microscopia óptica convencional em câmaras de Neubauer em microscopia a fresco ou coradas pelo método de Giemsa.

3.5.1.2. Ensaio de invasão celular por *T.cruzi* de cultivo irradiado.

Foram utilizadas células RAW (tumoriais de BALB/c) em meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de S.F.B. e acrescido de gentamicina. Em placas estéreis com 24 poços (CORNING®), cada poço contendo lamínula estéril, semeou-se 2×10^5 células/ 500 μ l meio de cultura. Após incubação por 24 horas, em estufa de CO₂ a 37°C, aspirou-se o meio de cultura e em seguida foram adicionados 500 μ l de solução contendo parasitas na proporção de 1:5 (relação células/parasitas). Os parasitas utilizados foram aqueles irradiados com doses de 100, 400 e 1000 Gy ou irradiados com doses de 100 e 400 Gy, tratados com complemento e posteriormente irradiados com 2 kGy. As amostras foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C. As lavagens foram feitas com solução salina estéril a 4°C, após 3, 24 ou 96 horas de cultivo e, em seguida, as lamínulas foram secas e fixadas com metanol (300 μ l/2 minutos/poço). Adicionou-se solução corante de Giemsa por 10 minutos, lavou-se por 2 vezes com água destilada e as lamínulas, após nova secagem, foram colocadas sobre gota de bálsamo sintético em uma lâmina.

3.5.2. Ensaio metabólicos com *T. cruzi* - teste MTT

Para detectar alterações na capacidade respiratória do parasita irradiado, utilizou-se o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio) Sigma®, um cromógeno que age como substrato no processo respiratório oxidativo das mitocôndrias. O subproduto formado, denominado formazan, torna possível quantificar as células viáveis do sistema utilizado (Tada *et al.*, 1986).

Para o procedimento foram adicionadas, em placa de 96 poços (CORNING®), alíquotas com 1×10^6 formas de parasitas por 100 μ l de meio, das formas irradiadas e do controle (parasita sem irradiar). Em seguida, foram adicionados 15 μ l de solução de MTT na concentração de 5mg/ml. Após 4 horas de incubação à 26°C, foram adicionados 80 μ l de SDS-HCl 10% por poço.

Transcorridas 18 horas à 26°C, foi feita a leitura em comprimento de onda de 570nm.

3.6. Seleção de formas tripomastigotas metacíclicas de *T.cruzi* utilizando soro de cobaio

Com a possibilidade de selecionarem-se formas tripomastigotas metacíclicas pelo uso da radiação, adotou-se como padrão o tratamento de amostras de parasitas com soro de cobaio.

Complemento de cobaio, rato ou camundongo é utilizado para selecionar formas tripomastigotas de culturas como as utilizadas, contendo misturas de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, pois causa lise das formas epimastigotas, sem afetar as tripomastigotas (Umekita *et al.*, 2001).

3.6.1. Obtenção de complemento de cobaio

O complemento utilizado nos experimentos foi obtido a partir da sangria de cobaio de experimentação, com origem conhecida, e isentos de infecção por tripanossomatídeos. Após retração do coágulo o soro foi coletado, aliquotado e imediatamente mantido congelado a – 18° C.

3.6.2. Ensaio de seleção de formas metacíclicas

Para os experimentos foram utilizadas amostras de *T.cruzi* mantidas em meio LIT sem S.F.B. irradiadas com 100 e 400 Gy com atenuador de 90%, e amostras sem tratamento prévio por radiação. Foram utilizados soro de cobaio “in natura” e soro de cobaio irradiado com 2 kGy.

Para realizar tal procedimento as amostras, irradiadas ou não, foram centrifugadas e o sedimento re-suspenso em meio LIT sem S.F.B. Alíquotas de 500µl das amostras foram transferidas para poços de placa com 24 poços (CORNING®), em duplicata. Adicionou-se 20% (100µl) de complemento de cobaio. A placa foi mantida a 37°C por 3 horas. Para interromper a reação, foram adicionados 600µl de solução fisiológica estéril e gelada. As amostras foram centrifugadas a 10.000g /10°C por 10 minutos e o sedimento foi re-suspenso em volume suficiente para obter uma concentração final de 1×10^7 parasitas por mililitro de meio LIT sem S.F.B. Algumas amostras tratadas com 100 e 400 Gy e,

posteriormente, com complemento foram irradiadas com 2 kGy.

3.7. Ensaio imunológico

A fim de avaliar as propriedades imunogênicas das formas de *T. cruzi* irradiadas, foram realizados experimentos de produção de anticorpos anti-*T. cruzi* e acompanhamento da parasitemia e mortalidade de animais pré-imunizados e desafiados com formas sangüícolas.

Os animais utilizados, camundongos BALB/c e C57BL/6, foram divididos em grupos de 4, 6 e 8 animais, os quais receberam 4 inóculos de 1×10^6 parasitas/100 μ l de meio por animal, via intraperitoneal, com intervalo de 15 dias.

Para o preparo do inóculo todas as amostras, tratadas e não tratadas, foram centrifugadas a 10000g/10°C por 10 minutos e o sedimento foi ressuspenso a fim de selecionar as formas não destruídas pelo tratamento com radiação ou complemento de coelho. A concentração final das amostras foi ajustada para 1×10^6 parasitas por 100 μ l de meio LIT sem SFB.

3.7.1. Imunização

Para avaliação da produção de anticorpos induzida por parasitas irradiados, diferentes grupos de animais, resistentes ou suscetíveis à infecção por *T. cruzi*, foram acompanhados.

3.7.1.1. Protocolo de imunização

Camundongos BALB/c, suscetíveis à cepa Y de *T. cruzi* (8 animais por grupo) e C57BL/6, resistentes (6 animais por grupo) receberam diferentes imunógenos, conforme descrito na TAB. 1.

TABELA 01. Resumo dos grupos de tratamento das formas de *T. cruzi* utilizados nos inóculos.

TRATAMENTO GRUPOS	<i>T. cruzi</i>	IRRADIAÇÃO (Gy)	COMPLEMENTO	COMPLEMENTO + IRRADIADO COM 2 kGy	IRRADIAÇÃO PARA ESTERILIZAÇÃO Gy
01	+				
02	+	100			
03	+	400			
04	+	2000			
05	+		+		
06	+			+	
07	+	100			2000
08	+	400			2000
09	+	100	+		
10	+	100	+		2000
11	+	400	+		2000
12	+	100		+	
13	+	100		+	2000
14	-				

3.8. Obtenção de soro dos animais experimentais

Foram coletadas amostras de sangue por secção leve da extremidade da cauda em papel filtro Whatman nº3, com diâmetro de 0,5cm ($\approx 5 \mu\text{l}$) secos e armazenados a -18°C para o preparo de eluatos de sangue. Quando eram necessárias maiores quantidades de amostra, o sangue era coletado por punção do plexo orbital e processado imediatamente para separação do soro e posterior armazenamento (-18°C). As coletas foram realizadas antes de cada inóculo e a cada 15 dias.

3.9. Desafio dos animais pré-imunizados

Os grupos de camundongos imunizados com *T.cruzi* foram desafiados, após 60 dias, com 1×10^4 parasitas sangüícolas, via intra-peritoneal. Os animais foram acompanhados durante 30 dias quanto à mortalidade e parasitemia.

3.9.1. Verificação da parasitemia

Para a contagem de parasitas, uma amostra de 0,5 µl de sangue, obtido da cauda dos animais, foi colocada entre lâmina e lamínula de microscopia. O material foi examinado com aumento de 400 vezes em microscópio óptico comum. Foram observados 50 campos e contados os parasitas. A quantidade de parasitas foi calculada a partir da multiplicação do número de formas encontrado em 50 campos pelo fator 43,8. O fator foi estabelecido a partir do número total de campos da lamínula 22 X 22 mm no microscópio utilizado com aumento de 400 vezes (objetiva de 40X e ocular de 10X) dividido por 50 (Brenner, 1962).

3.10. Ensaio Imunoenzimático (método de ELISA)

Para avaliação dos animais quanto à produção de anticorpos, inicialmente foi feita a padronização do método de ELISA com antígeno preparado a partir de formas de cultivo utilizadas nos experimentos. O antígeno e controle positivo do experimento foram avaliados comparativamente com amostra de antígeno padronizado pelo IMT-FMUSP e soro controle positivo com título conhecido.

3.10.1. Antígeno extrato alcalino solúvel

A obtenção de antígeno extrato alcalino solúvel de *T. cruzi* (Mineo, 1982) foi feita a partir de formas da cepa Y de *T.cruzi* mantidas em cultivo em meio LIT com 10% S.F.B. a 26°C. Os parasitas foram quantificados e centrifugados a 10000g por 10 minutos a 10°C. O sedimento foi re-suspenso e lavado por duas vezes em PBS pH 7,2 estéril e estocado em freezer a -70°C. Ao sedimento em tubo cônico de PVC adicionou-se 4ml de água destilada e a suspensão foi submetida ao ultra-som (THORNTON-INPEC®) a 40 ciclos por períodos de 30 segundos, em banho de gelo. Certificada a lise completa dos parasitas, adicionou-se ao material 4ml de NaOH 0,3 M e centrifugou-se a 10000g

por 30 minutos a 4°C. Após dosagem de proteínas, pelo método de Bradford, o sobrenadante foi armazenado em alíquotas a -70°C.

3.10.2. Padronização do Teste de ELISA

Para determinar a melhor diluição de soro e antígeno a serem utilizadas nas reações, foram realizadas avaliações do antígeno padrão, antígeno preparado e de soros padrão positivo para *T.cruzi*. Foram utilizadas as concentrações de 2,5; 5 e 10 µg de antígeno extrato alcalino solúvel em 1000µl de solução e as diluições de 1:50; 1:100; 1:200 e 1:400 dos soros controle positivo.

3.10.3. Teste de ELISA

Utilizando placa com 96 poços (CORNING®), colocou-se 50 µl do antígeno padronizado diluído em PBS por poço. Após 18 horas a 4°C em câmara úmida, lavou-se a placa com PBSTL (Tampão PBS acrescido de 2% de Tween 20 e 0.3g% de leite em pó desnatado) por 5 vezes. Colocou-se 100 µl de PSBTL e após incubação por 1 hora a 37°C, lavou-se com PBSTL por 5 vezes. Adicionou-se 50 µl de soro ou eluato diluído 1:100, em duplicata, e incubou-se por 1 hora a 37°C. Procedeu-se à lavagem com PBSTL por 5 vezes, acrescentou-se 50 µl de conjugado (Anti-IgG camundongo ligados a peroxidase, SIGMA), diluído em PBS e incubou-se por 1 hora a 37°C. Lavou-se novamente com PBSTL por 5 vezes e a reação foi revelada pela adição de 50µl do revelador orto-fenilenodiamina (OPD) e água oxigenada e incubou-se por 30 minutos em câmara escura à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 25µl solução de HCl 4N. A leitura da absorbância foi feita em leitor de microplacas automático (Labsystem Multiskan MS) utilizando o comprimento de onda de 492 nm (Venkatesan & Walekin, 1993).

3.11. Teste de Aidez de anticorpo IgG

Foi realizado o mesmo ensaio imunoenzimático, porém utilizando Uréia 6M como agente caotrópico (Camargo *et al.*, 1991) com o intuito de determinar a aidez dos anticorpos pesquisados.

A determinação da avidéz é baseada geralmente no tratamento dos anticorpos ligados ao antígeno, em um suporte sólido, com um agente caotrópico, como Uréia 6 M, que é capaz de retirar os anticorpos de menor afinidade, pois é um agente desnaturante das ligações antígeno – anticorpo. Os anticorpos de alta avidéz permanecem ligados ao antígeno após o tratamento da amostra.

Em uma placa com 96 poços (CORNING®), colocou-se 50 µl de antígeno, diluído em solução de uréia 1M por poço. Após 18 horas a 4°C em câmara úmida, lavou-se a placa com PBSTL por 5 vezes. Foram adicionados 100 µl de PBSTL e após 1 hora de incubação a 37°C lavou-se com PBSTL por 5 vezes. Colocou-se 50 µl de soro ou eluato das diferentes amostras, diluído a 1:100 e incubou-se por 1 hora a 37°C. Após lavar com PBSTL por 5 vezes, acrescentou-se 100 µl de solução de uréia 6M por 10 minutos, a 37°C, em duplicata. Para cada amostra foi feito um controle onde foram acrescentados 100 µl de solução PBSTL. Após lavar com PBSTL por 5 vezes, acrescentou-se 50 µl de conjugado (Anti-IgG camundongo ligados a peroxidase, SIGMA), diluído em PBSTL e incubou-se por 1 hora a 37°C. Lavou-se novamente com PBSTL por 5 vezes e a reação foi revelada pela adição de 50 µl do revelador orto-fenilenodiamina (OPD) e água oxigenada e incubou-se por 30 minutos em câmara escura à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 25 µl solução de HCl 4N. A leitura da absorbância foi feita em leitor de microplacas automático (Labsystem Multiskan MS) utilizando o comprimento de onda de 492nm (Venkatesan & Walekin, 1993).

Os resultados foram expressos em porcentagem de avidéz (IA), determinados pela razão entre os valores da densidade óptica das amostras tratadas com uréia e a densidade óptica das amostras não tratadas [(D.O. uréia/D.O. PBSTL) x 100].

3.12. Observação Microscópica dos Parasitas

Para observação das formas dos parasitas utilizou-se de microscopia óptica comum. Foram confeccionadas preparações a fresco e coradas pelo método de Giemsa, observadas respectivamente com aumento de 400 vezes e 1000 vezes com objetiva de imersão.

3.13. Análise Estatística

Os dados frequenciais foram comparados pelo teste de chi-quadrado, enquanto dados paramétricos ou ordinais foram analisados pelo teste de t ou ANOVA, após verificação da homogeneidade de variâncias. Na ausência de homogeneidade, foram utilizados testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Foram consideradas significantes as diferenças cuja probabilidade de igualdade foi menor que 5% ($P < 0.05$). Todos os testes foram feitos utilizando-se o pacote estatístico Graph Pad Prism 3.0.

4. RESULTADOS

4.1. Viabilidade das formas de *T. cruzi*

4.1.1. Aspectos da Biologia Celular

Durante o experimento foram utilizadas diferentes doses de radiação, e os aspectos de biologia celular dos agentes foram analisados por microscopia, contagem e crescimento. Observou-se alteração da morfologia dos parasitas irradiados, com transformação para formas esferomastigotas a partir da dose de 3 kGy. Em doses maiores, as formas esféricas e com flagelo (esferomastigotas) foram aumentando de frequência até que com 6 kGy, 100% eram esféricas.

4.1.1.1. Capacidade Reprodutiva

A viabilidade avaliada por meio da capacidade reprodutiva em cultivo mostrou que não houve nenhum crescimento a partir da dose de 2 kGy, resultando em esterilidade, embora tenha sido observada preservação da motilidade e da integridade das formas. A partir da dose de 3 kGy observou-se uma maior mortalidade dos parasitas.

4.1.1.2. Infectividade de células

A capacidade dos parasitas irradiados de infectar células foi observada pela formação de vacúolos em células RAW cultivadas a 36°C. Após 3 horas de exposição aos parasitas, observou-se a formação de vacúolos no citoplasma das células com amostras de *T. cruzi* de todos os grupos experimentais, com todas as doses de radiação, na presença ou não de complemento.

Os tratamentos a que foram submetidos os parasitas não inibiram a capacidade de infecção, entretanto, em culturas de parasitas irradiados com doses de 100 e 400 Gy com e sem tratamento com complemento de coelho e irradiadas posteriormente com 2 kGy, não se observou crescimento. Por outro lado, alguns

dos parasitas irradiados somente com 100, 400 e 1000 Gy mantiveram a capacidade de reprodução.

4.1.2. Ensaios metabólicos das formas de *T. cruzi* - teste MTT

Formas irradiadas nas doses de 100 e 400 Gy, com atenuador de 90% e posteriormente com 2 kGy, foram avaliadas quanto a sua capacidade de oxidar o MTT e conseqüente viabilidade das formas. Observou-se menor oxidação de MTT nas formas irradiadas no decorrer do tempo do teste, em relação às formas do controle não irradiadas (FIG.5). Analisando as absorvâncias apresentadas pelos parasitas que resistiram às doses de radiação, verificamos que, após a irradiação, houve uma diminuição na produção de formazan, mas sem um efeito típico dose-resposta, não havendo diferença da capacidade respiratória em parasitas irradiados com mais que 100 Gy. Interessante notar que houve uma oxidação significativa de MTT neste ensaio mesmo por células esterilizadas, mostrando a viabilidade celular, mas não a reprodutiva das células irradiadas.

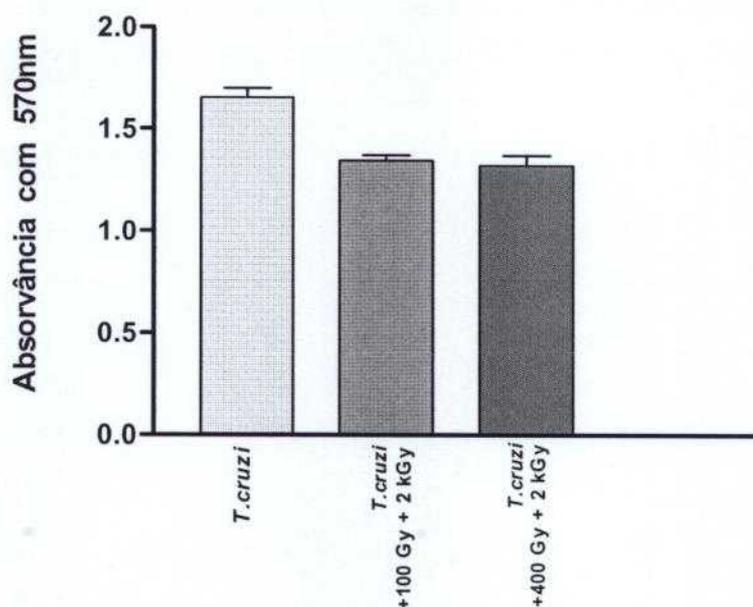


FIGURA 5. Comparação da capacidade respiratória mitocondrial de 1×10^7 formas/ml de *T. cruzi* não irradiadas e irradiadas. Teste de produção de formazan na presença de MTT.

4.2. Tratamento das formas de *T. cruzi* com complemento de coelho

Nos estudos comparativos entre formas irradiadas com 100 e 400 Gy tratadas e não tratadas com complemento e posteriormente irradiadas com 2 kGy, observou-se a diminuição do número de parasitas após a irradiação.

Foi possível observar a diminuição dos parasitas tratados por complemento e os irradiados e tratados com complemento e irradiados novamente com 2 kGy, de 1×10^7 formas/ml para 1×10^6 formas/ml, cerca de 10% da quantidade inicial. Nas amostras com parasitas não tratados com complemento, mas irradiados com 100 ou 400 Gy e posteriormente com 2 kGy, a quantificação ficou entre 30 a 40% e 30 a 50%, respectivamente, em relação ao número inicial de parasitas nas amostras (FIG. 6).

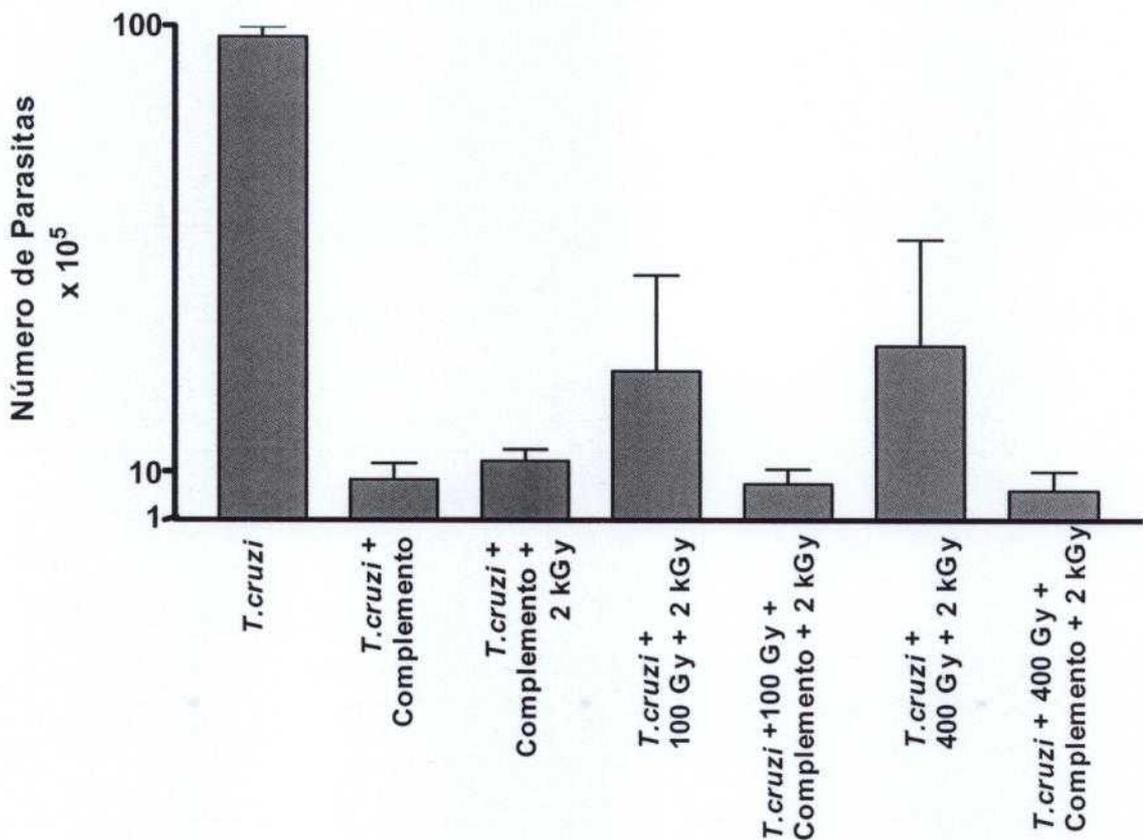


FIGURA 6. Sobrevivência de parasitas ao tratamento por complemento, medida indireta da proporção de formas tripomastigotas metacíclicas, utilizando diferentes tratamentos por radiação. As barras representam o erro padrão.

4.3. Ensaio imunoenzimático – ELISA

4.3.1. Padronização para o Ensaio Imunoenzimático

Para determinar a melhor concentração de soro e antígeno a serem utilizados, foram realizadas avaliações com diluições do antígeno padrão, antígeno preparado e do soro padrão positivo para *T.cruzi*. Tal procedimento permitiu selecionar a diluição de 1:100 do soro e concentração de 5 µg/ 1000 µl do antígeno (FIGs. 7 e 8).

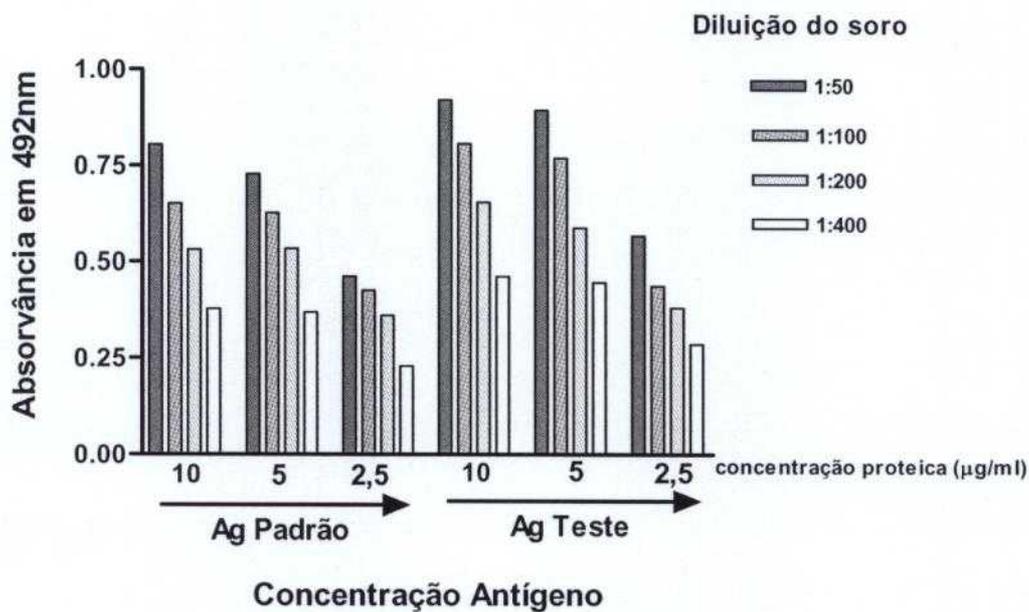


FIGURA 7. Análise de diferentes diluições (1:50; 1:100; 1:200 e 1:400) dos soros positivos para cepa Y de *T.cruzi*, frente às diferentes concentrações protéicas (2,5; 5 e 10 µg/ml) do antígeno padrão e antígeno teste para a padronização dos ensaios imunoenzimáticos.

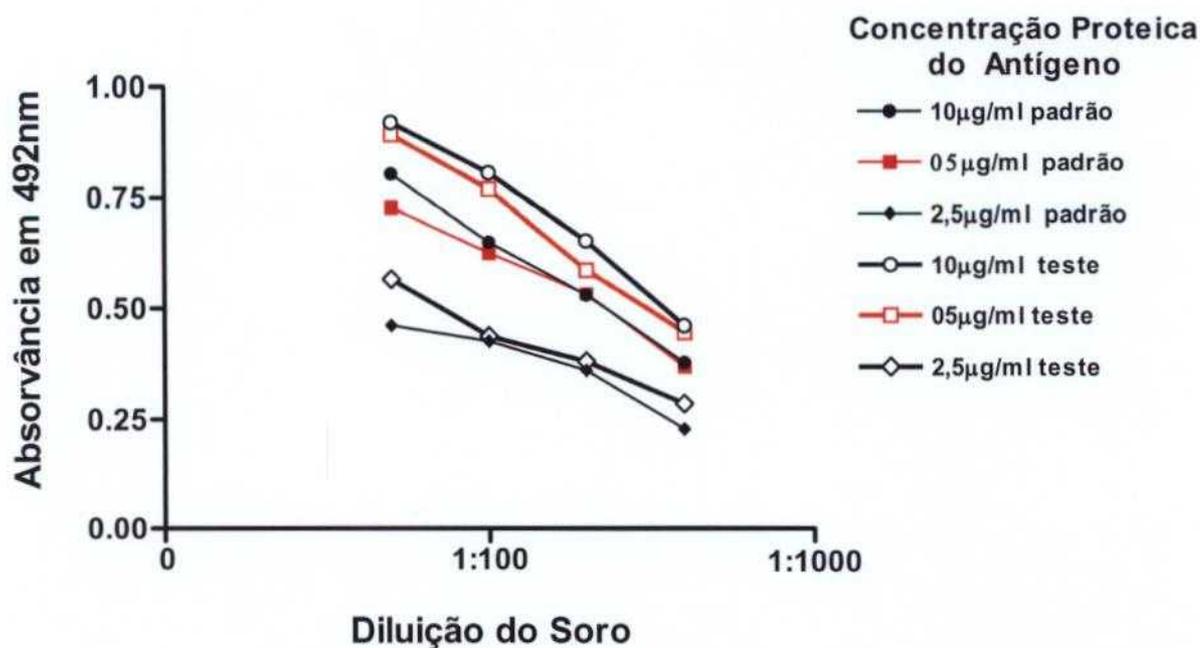


FIGURA 8. Análise de soro positivo para cepa Y de *T. cruzi* frente aos antígenos homólogos em diferentes concentrações para padronização dos ensaios imunoenzimáticos.

4.3.2. Avaliação da Imunogenicidade pelo Ensaio Imunoenzimático

Foram realizados experimentos inoculando formas de *T. cruzi*, tratadas por complemento ou irradiadas, em animais suscetíveis, BALB/c, e resistentes, C57BL/6, à cepa Y de *T. cruzi*, com seguimento sorológico e hematológico. A avaliação dos soros de camundongos imunizados foi feita pelo teste de Elisa.

Os animais de todos os grupos que receberam formas irradiadas tratadas ou não com complemento e o grupo controle, que recebeu formas não irradiadas, apresentaram anticorpos específicos anti -*T. cruzi*, como observado nas FIG. 9 e 10.

Na FIG. 9 podemos observar que camundongos BALB/c, suscetíveis à cepa Y de *T.cruzi*, apresentaram pico de anticorpos 60 dias após o início da imunização. O grupo que recebeu formas de *T.cruzi* sem qualquer tratamento foi o que desenvolveu uma quantidade maior de anticorpos e não houve diferença significativa entre os grupos tratados, quanto à quantidade sérica de anticorpos produzida.

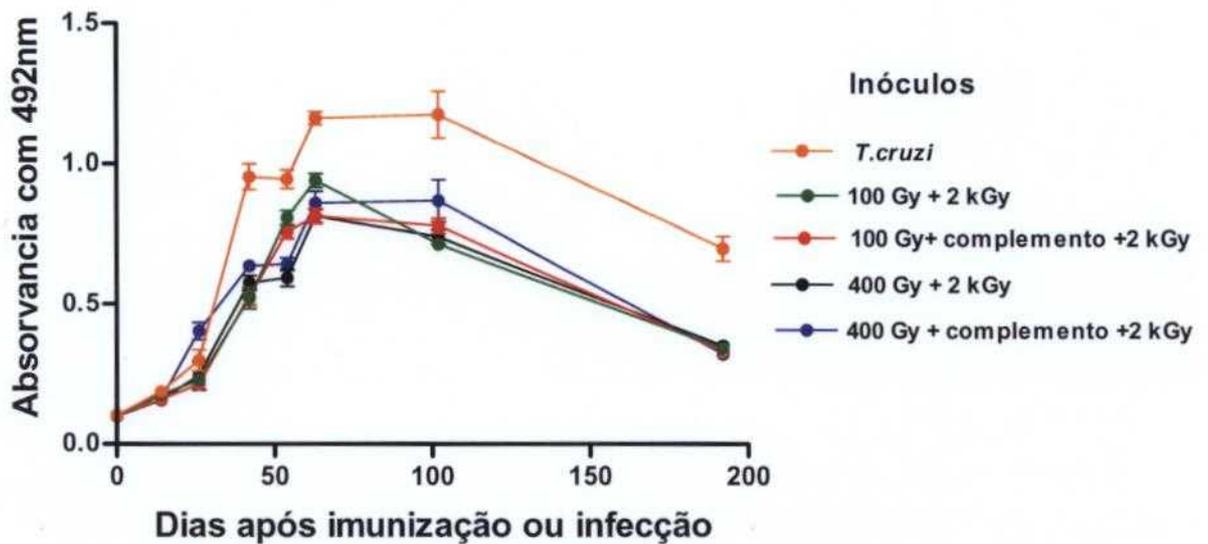


FIGURA 9. Determinação da produção de anticorpos IgG específicos contra *T.cruzi* em camundongos BALB/c imunizados com diferentes preparações de *T.cruzi* irradiados e/ou tratados com complemento. As barras representam erro padrão da média.

Na FIG.10, observa-se que camundongos C57BL/6, resistentes à cepa Y de *T. cruzi*, apresentam título máximo de anticorpos por volta do 100º dia. O tratamento com diferentes doses de radiação, associado ou não à adição de complemento, promoveu diminuição de cerca de 50% na quantidade sérica de anticorpos formados.

Cabe ressaltar que os grupos tratados com complemento apresentaram pico máximo de anticorpos por volta do 50º dia, metade do tempo apresentado pelos demais grupos.

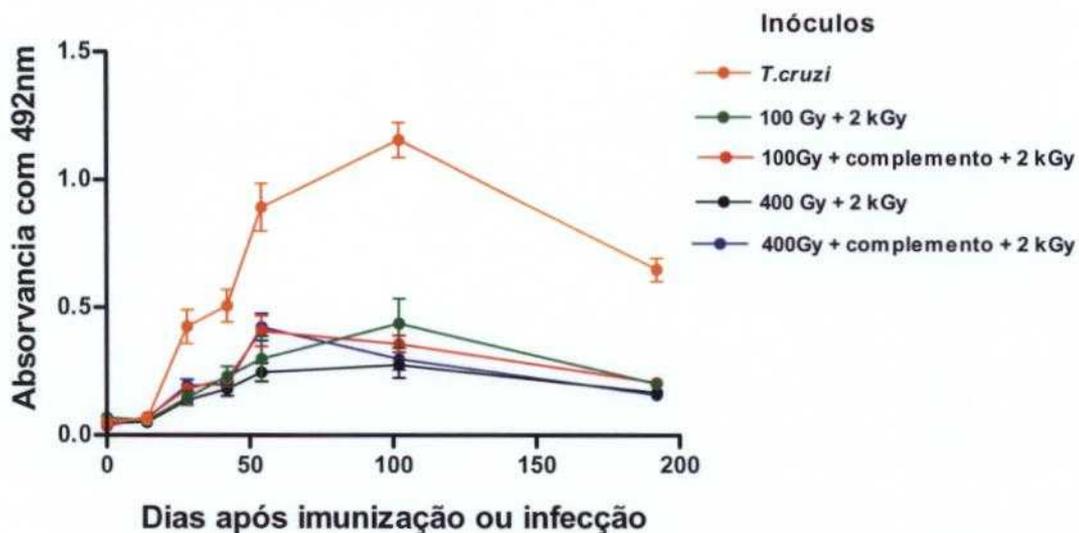


FIGURA 10. Determinação da produção de anticorpos IgG específicos contra *T. cruzi* em camundongos C57BL/6 imunizados com diferentes preparações de *T. cruzi* irradiados e/ou tratados com complemento. As barras representam erro padrão da média.

Os grupos que receberam parasitas sem tratamento final de esterilização por radiação, nas linhagens BALB/c e C57BL/6, apresentaram quantidades maiores de anticorpos quando comparados aos demais grupos.

Em relação às diferentes linhagens utilizadas, BALB/c e C57BL/6, nos grupos com *T. cruzi* sem tratamento, verificou-se que ambas apresentam quantidade semelhantes, porém a linhagem suscetível apresenta pico de anticorpos por volta do 60º dia, enquanto que os camundongos resistentes têm seu pico por volta do 100º dia. Quando são comparados os grupos que receberam formas irradiadas verificamos quantidades menores na linhagem C57BL/6.

4.3.3. Determinação da avidéz de anticorpo IgG por método imunoenzimático

Observou-se um aumento na porcentagem de avidéz dos anticorpos produzidos contra os parasitas tratados, quando comparados ao grupo que recebeu *T. cruzi* sem tratamento (FIG. 11). No período que antecede o 60º dia, observa-se o aumento na avidéz dos anticorpos nos grupos que receberam parasitas tratados e diminuição no grupo que recebeu parasita sem tratamento.

Por outro lado, a partir do 60º dia, o grupo que recebeu parasitas irradiados com 100 Gy e posteriormente 2 kGy, bem como o grupo que recebeu parasita não tratados, apresentou aumento da porcentagem de avidéz. No mesmo período os demais grupos apresentaram diminuição na porcentagem de avidéz.

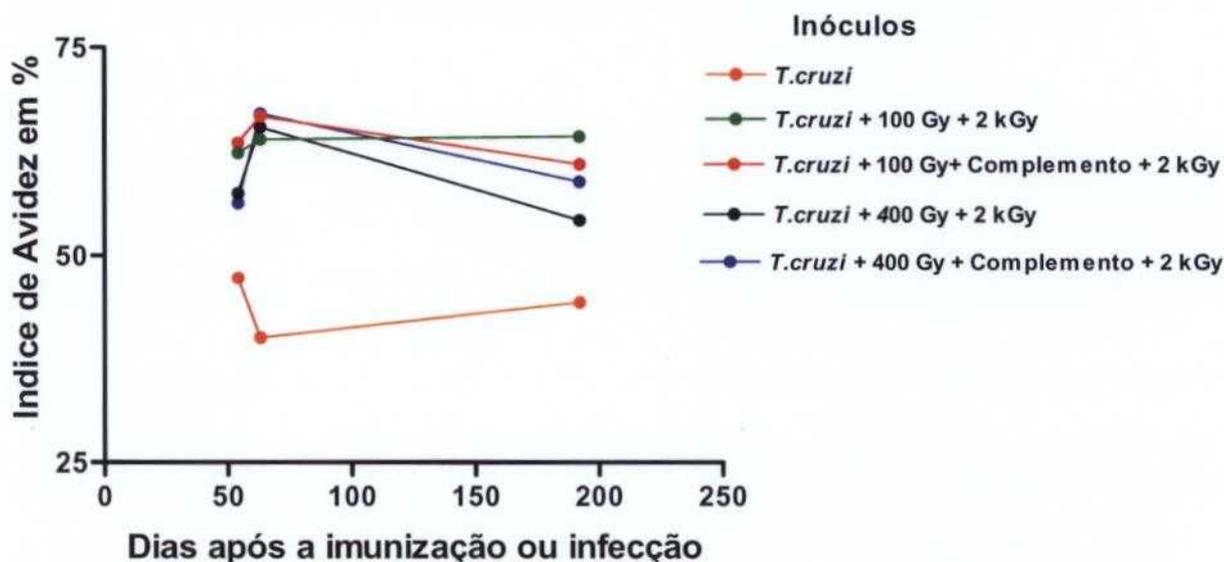


FIGURA 11. Porcentagem de avidéz dos anticorpos produzidos em camundongos BALB/c que receberam *T. cruzi* com ou sem tratamento.

O índice de avidéz dos anticorpos produzidos em animais que receberam parasitas sem tratamento permaneceu entre 40 e 50%, como pode ser visto na FIG.12. Os grupos inoculados com parasitas irradiados com 100 e 400Gy, tratados ou não com complemento e irradiados posteriormente com 2 kGy, apresentaram porcentagem de avidéz entre 50 e 70%. Animais que receberam parasitas irradiados com 100 Gy, tratados ou não com complemento e posteriormente irradiados com 2 kGy apresentaram porcentagem de avidéz entre 60 e 70% durante todo o período avaliado. Assim, fica claro que a infecção

provoca um retardo na seleção de anticorpos de alta avidéz, o que não ocorre em animais imunizados.

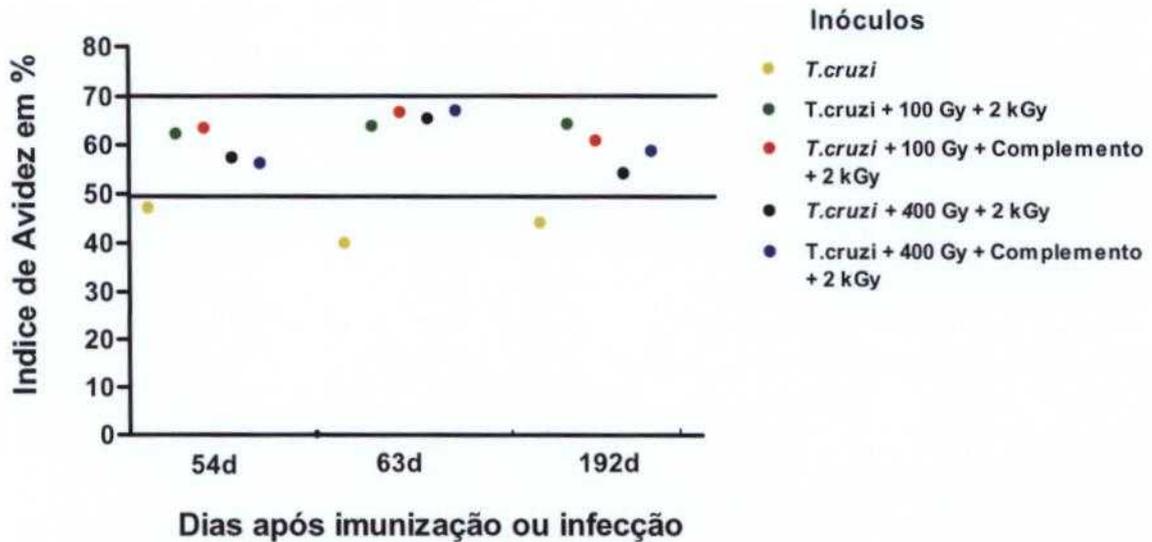


FIGURA 12. Índice de avidéz dos anticorpos produzidos em camundongos BALB/c que receberam *T. cruzi* com ou sem tratamento.

4.4. Avaliação de camundongos pré-imunizados e desafiados com formas sangüícolas de *T. cruzi*

As duas linhagens de camundongos imunizadas foram desafiadas com 1×10^4 formas sangüícolas de *T. cruzi* no 60º dia após o início da imunização e tanto a parasitemia como a mortalidade foram acompanhadas por um período de 30 dias.

Na FIG.13 observa-se que todos os grupos de camundongos BALB/c imunizados apresentaram produção de anticorpos. Até o 60º dia após o início da imunização, o grupo que recebeu *T.cruzi* sem tratamento apresentava título de anticorpo maior em relação aos grupos que receberam inóculos com parasitas irradiados com 100 Gy, 400 Gy e 2 kGy.

Os grupos após a inoculação de formas sangüícolas apresentaram o título mais alto no 107º dia, quando se observou maior produção de anticorpos no grupo com inóculos irradiados com 2 kGy.

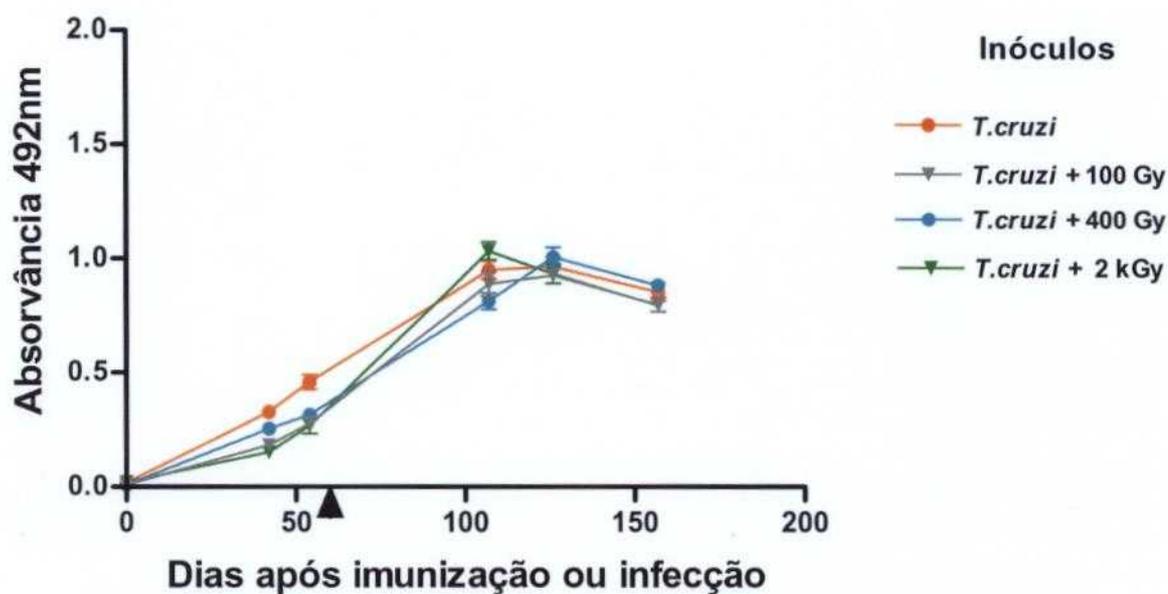


FIGURA 13. Título de anticorpos produzidos em camundongos BALB/c por formas de *T.cruzi* selecionadas por radiação e desafiados no 60º dia com formas sangüícolas de *T.cruzi*

Na FIG. 14 é observada a produção de anticorpos em todos os grupos imunizados de camundongos BALB/c. Durante o período analisado, o grupo que recebeu inóculos com parasitas irradiados com 100 Gy e depois tratados com complemento tiveram maior produção de anticorpos. Os grupos que receberam inóculos com parasitas tratados com complemento irradiado ou não e inóculos com parasitas irradiados com 100 Gy e tratados com complemento, irradiado ou não, apresentaram produção de anticorpos equivalentes entre si, porém maiores do que o grupo que recebeu apenas *T.cruzi*. Os demais grupos que receberam os inóculos irradiados com 100 Gy e posteriormente 2 kGy, irradiados com 100 Gy tratados com complemento, irradiado ou não, e irradiados novamente com 2 kGy apresentaram menores títulos de anticorpos.

Houve aumento nos títulos de anticorpos até o 72º dia nos grupos, com exceção do grupo que recebeu inóculo com formas irradiadas com 100 Gy e depois tratadas com complemento irradiado com 2 kGy, cujo pico de anticorpos se deu no 56º dia.

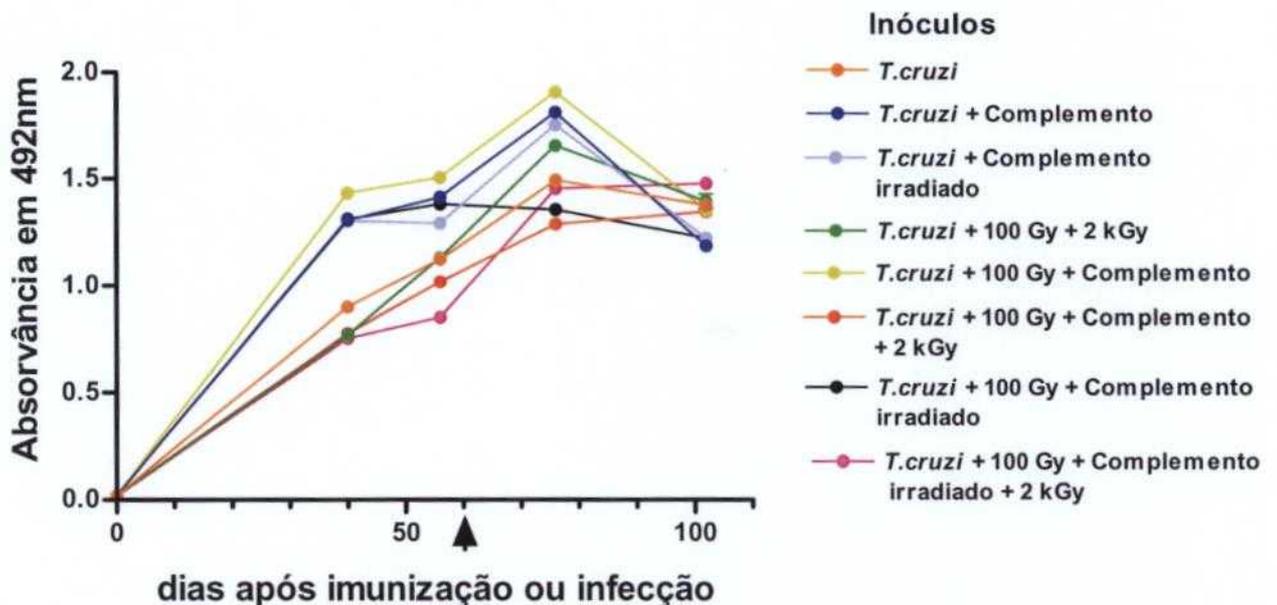


FIGURA 14. Título de anticorpos produzidos em camundongos BALB/c por preparações de *T.cruzi* selecionadas por radiação com baixa dose ou ação do complemento, esterilizadas a seguir e desafiados no 60º dia com formas sangüícolas de *T.cruzi*. A seta indica o dia do desafio.

Na FIG.15 podemos observar que todos os grupos imunizados de camundongos C57BL/6 apresentaram produção de anticorpos. Durante o período analisado observamos um padrão semelhante na produção de anticorpos nos grupos estudados com diferentes inóculos, sendo que o grupo que recebeu inóculos com parasitas irradiados com 2 kGy apresentaram títulos menores de anticorpos para *T.cruzi*.

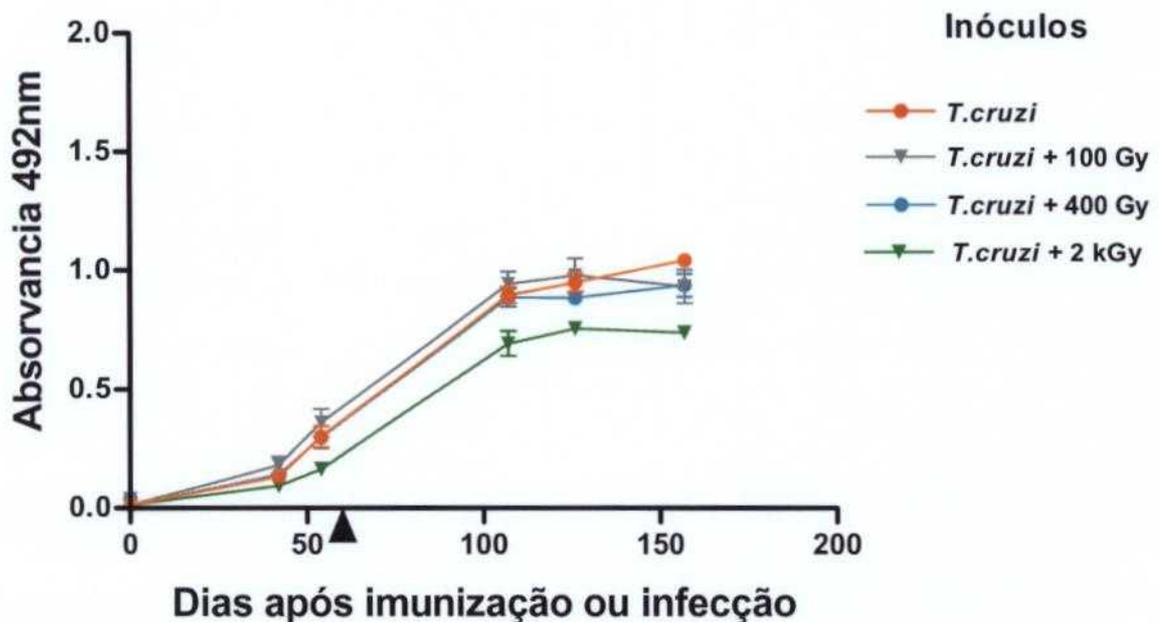


FIGURA 15. Título de anticorpos produzidos em camundongos C57BL/6 por imunizações com preparações de *T.cruzi* selecionadas por radiação e desafiados no 60º dia com formas sangüícolas de *T.cruzi*. A seta indica o dia do desafio.

Na FIG. 16 observa-se produção de anticorpos anti -*T. cruzi* em todos os grupos de camundongos C57BL/6. Todos os grupos apresentaram o título máximo de anticorpos no 76º dia. Os grupos que receberam inóculos com parasitas tratados com complemento e parasitas irradiados com 100 Gy e depois tratados complemento irradiado ou não apresentaram título de anticorpos equivalentes entre si, porém maiores do que o grupo que recebeu *T. cruzi* não tratado. Os demais grupos que receberam os inóculos irradiados com 100 Gy e posteriormente com 2 kGy, parasitas irradiados com 100 Gy tratados com complemento, irradiado ou não, e irradiados novamente com 2 kGy apresentaram títulos de anticorpo menores.

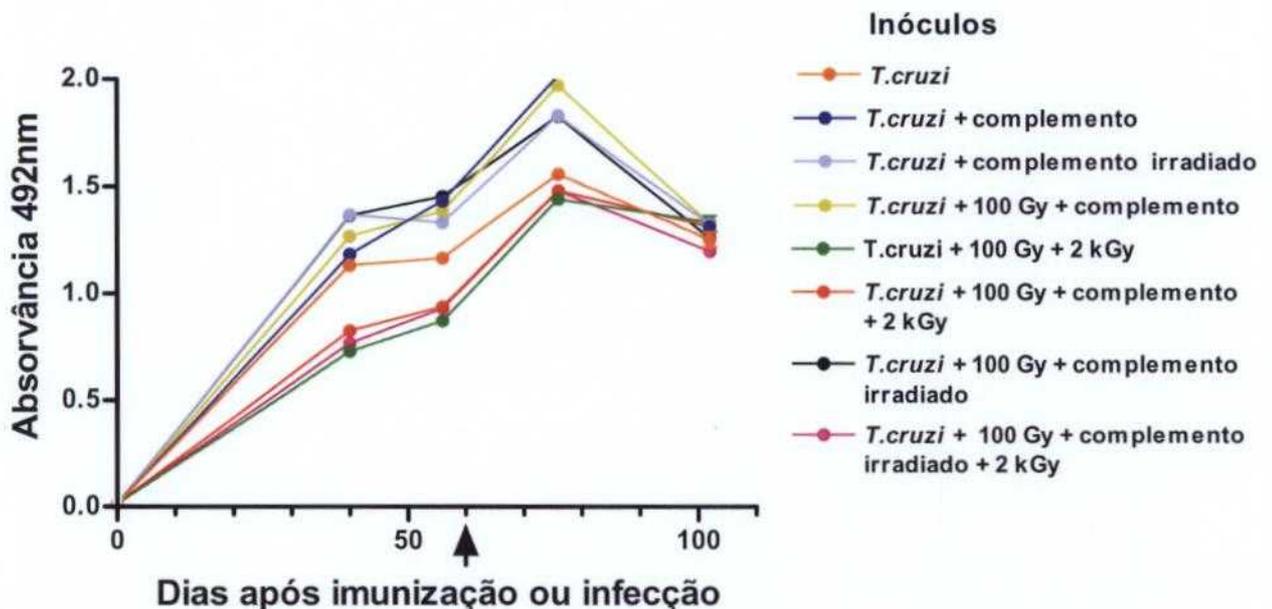


FIGURA 16. Título de anticorpos produzidos em camundongos C57BL/6 por preparações de *T. cruzi* selecionadas por radiação com baixa dose ou ação do complemento, esterilizadas a seguir e desafiados no 60º dia com formas sangüícolas de *T. cruzi*. A seta indica o dia do desafio.

A avaliação da imunização foi realizada pelo acompanhamento da produção de anticorpos e após 60 dias os animais foram desafiados com formas sangüícolas de *T. cruzi*. A mortalidade e parasitemia foram observadas por 30 dias após o desafio.

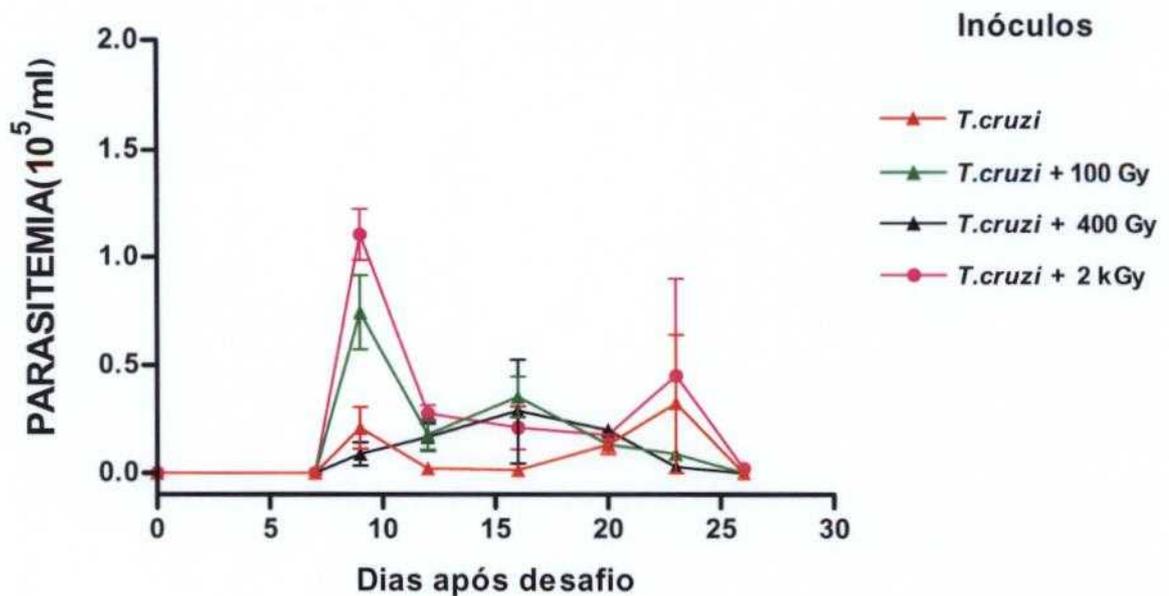


FIGURA 17. Parasitemia após desafio com formas sangüícolas em camundongos BALB/c pré-imunizados com cepa Y de *T. cruzi* tratados ou não com radiação gama.

Na FIG. 17 observa-se que todos os grupos de camundongos BALB/c imunizados apresentaram parasitemia após desafio. O grupo imunizado com parasitas irradiados com 2 kGy apresentou maior número de parasitas.

A maior parasitemia observada foi no 09º dia, com declínio no 12º dia e podendo ser detectados parasitas até o 26º dia. Os grupos seguiram um mesmo padrão em relação à parasitemia, com exceção dos animais que receberam parasitas irradiados com 400 Gy, quando a maior parasitemia foi detectada no 16º dia.

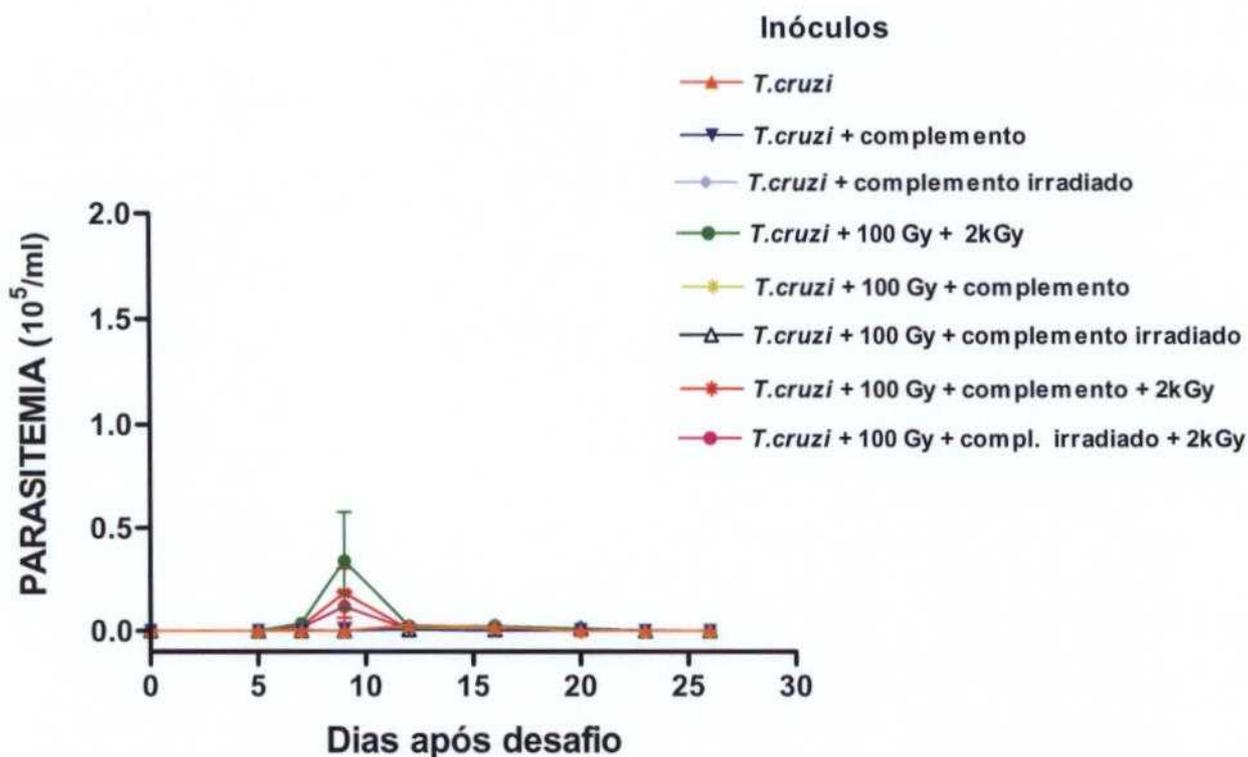


FIGURA 18. Parasitemia após desafio com formas sangüícolas em camundongos BALB/c pré-imunizados com cepa Y de *T. cruzi* tratados ou não com radiação gama.

Na FIG. 18 observa-se que os grupos de camundongos BALB/c que receberam parasitas tratados com doses de 100 Gy e/ou complemento e posteriormente 2 kGy, apresentaram parasitemia com pico no 9º dia pós-desafio, com o mesmo perfil, sendo o pico maior para animais que foram imunizados com parasitas tratados com 100 Gy e posteriormente com 2 kGy.

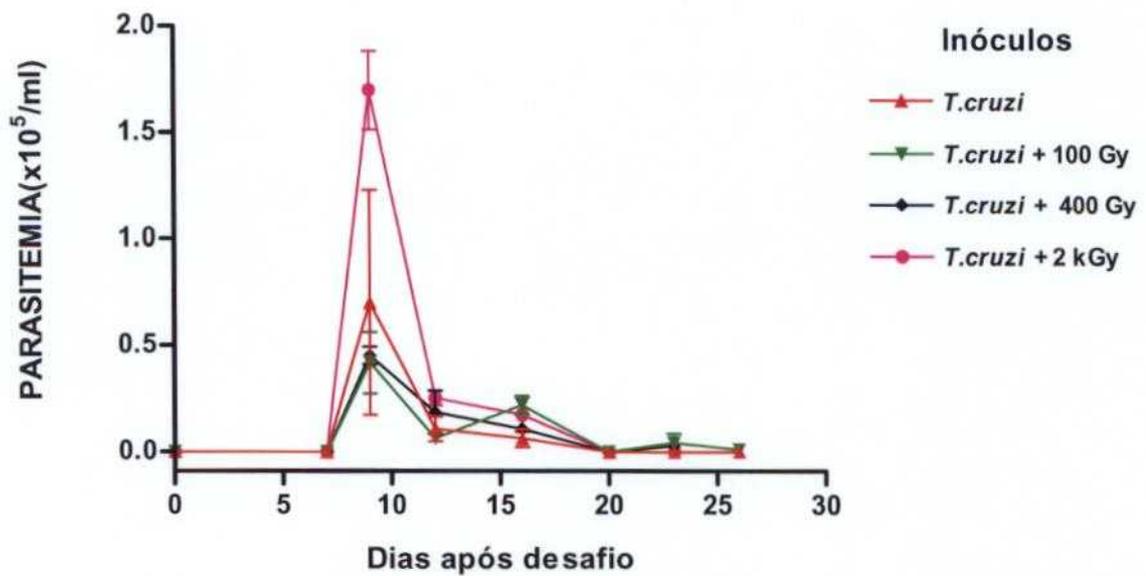


FIGURA 19. Parasitemia após desafio com formas sangüícolas em camundongos C57BL/6 pré-imunizados com *cepa* Y de *T. cruzi* tratadas ou não com radiação gama.

Na FIG. 19 observa-se o mesmo padrão de parasitemia nos camundongos C57BL/6 que receberam inóculos diferentes, com maior parasitemia no 9º dia pós-desafio. Foi observado o declínio no número de parasitas os quais foram detectados até o 26º dia.

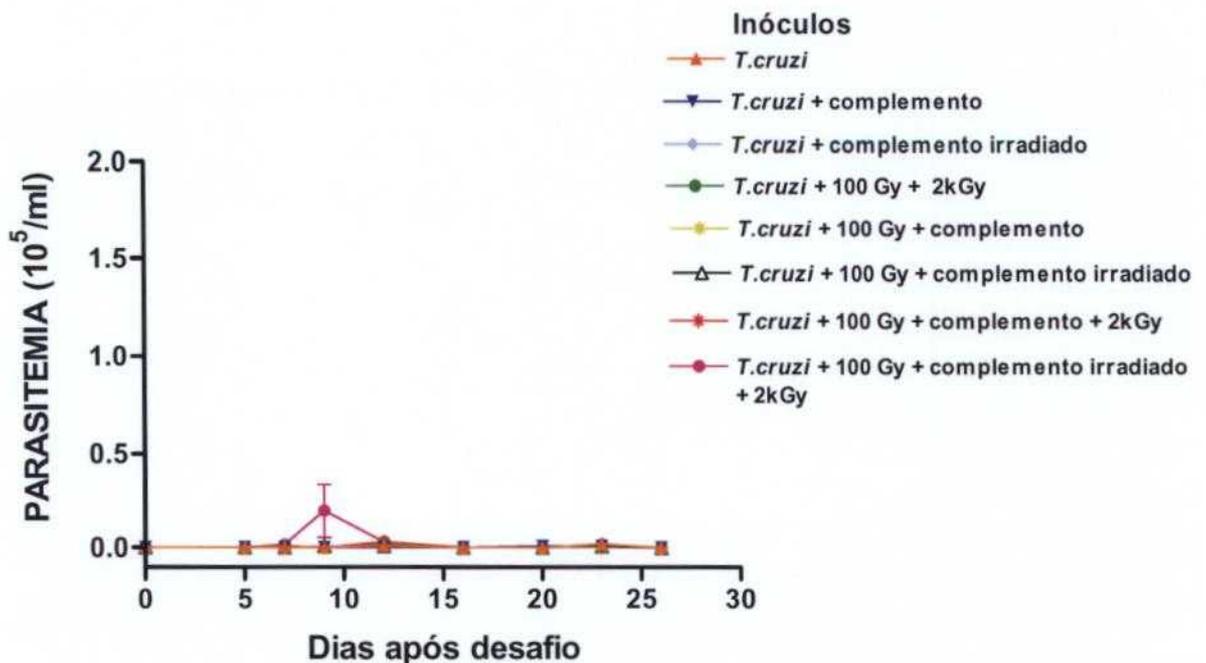


FIGURA 20. Parasitemia após desafio com formas sangüícolas em camundongos C57BL/6 pré-imunizados com cepa Y de *T. cruzi* tratados ou não com radiação gama.

Na FIG. 20 é possível verificar que o grupo de camundongos C57BL/6 que recebeu inóculo com parasitas tratados com 100 Gy, complemento irradiado e posteriormente 2 kGy apresentou pico de parasitemia no 9º dia após o desafio com formas sangüícolas.

Comparando-se as linhagens BALB/c e C57BL/6, observa-se maior aumento na parasitemia nos grupos de camundongos C57BL/6 que receberam inóculos irradiados. Em ambos os grupos a parasitemia foi maior nos animais que foram imunizados com formas irradiadas com 2 kGy. Nos grupos que receberam inóculos tratados com doses de 100 Gy e/ou complemento e posteriormente 2kGy, nas duas linhagens observamos uma parasitemia menor.

Quanto à mortalidade, os animais de todos os grupos imunizados das linhagens BALB/c e C57BL/6 permaneceram vivos durante os 30 dias de observação após o desafio com formas sangüícolas. Todos os animais apresentaram parasitemia a partir do 7º dia após o desafio com as formas sangüícolas.

A comparação entre as imunizações com parasitas não irradiados (FIG. 17 e 19) e parasitas esterilizados por 2 kGy (FIG.18 e 20) mostram uma

parasitemia muito menor nos animais desafiados com os antígenos selecionados para tripomastigotas, quer seja isoladamente, na irradiação mais baixa, quer seja pela associação de processos.

5. DISCUSSÃO

A Doença de Chagas tem uma ampla distribuição nas Américas Central e do Sul, encontrada somente no continente americano, sendo endêmica em 21 países, com 16 a 18 milhões de pessoas infectadas e 100 milhões de pessoas em risco. Cerca de 50.000 morrem anualmente pela infecção (WHO, 2005).

Não obstante os esforços para o seu controle, a doença ainda não tem cura e demonstra ser de grande importância tanto do ponto de vista social, como por apresentar problemas científicos ainda não resolvidos (Passos, 2003).

A doença é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado e parasita o qual é transmitido principalmente por duas vias, através das fezes do triatomíneos depositadas na pele durante o hematofagismo ou através da transfusão de sangue infectado. Como consequência do parasitismo a doença se caracteriza por ser essencialmente crônica, apresenta, contudo uma fase aguda com parasitemia alta, sendo estimada a manifestação da fase aguda aparente em 3% dos casos em área endêmica; as formas indeterminadas em 50%; as cardíacas em 30%, forma grave para qual não há tratamento específico disponível; e as digestivas em 7 a 8 %, no Brasil (FUNASA, 2000; Buscaglia & Di Noia, 2003).

A Doença de Chagas era, primitivamente, uma enzootia que afetava exclusivamente animais silvestres, transmitida por triatomíneos, também silvestres. O homem, ao invadir estes ecótopos naturais, possibilitou que os triatomíneos se instalassem em seus domicílios, transformando a tripanossomíase americana em uma antropozoonose.

Devido ao ciclo de transmissão da infecção, as medidas de controle são dirigidas ao combate do vetor e ao controle da qualidade do sangue transfundido. O controle da transmissão em laboratório deve ser feito através do rigoroso uso das normas de biossegurança (FUNASA, 2000; Dias *et al.*, 2002). Existe a possibilidade de transmissão congênita, mas muitos dos conceptos têm morte prematura, pelo leite materno e sugere-se a hipótese de transmissão por

via oral em alguns surtos episódicos, como aqueles ocorridos devido à ingestão de caldo de cana na região sul do Brasil no ano de 2005.

O tratamento da doença de Chagas conta hoje, na prática, com apenas dois medicamentos, um disponível no Brasil, o benzonidazol e outro na América Latina, o nifurtimox. Ambos são indicados para o tratamento de casos agudos, crônicos recentes ou de baixa idade (15 anos ou menos), na reativação da parasitemia em casos de queda das defesas imunológicas (por drogas imunossupressoras e radiações, por exemplo), em co-infecções pelo vírus HIV (Aids), para prevenir a infecção em acidentes de laboratório e em transplantes com doador infectado. O tratamento dura 60 dias e os medicamentos matam o parasito, exceto no caso de algumas poucas linhagens resistentes.

Buscas por novos agentes quimioterápicos para o tratamento da doença de Chagas estão sendo feitas, e entre os compostos testados destacam-se alguns antifúngicos de última geração, que atuam na inibição de enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol (molécula de fundamental importância na vida do parasito).

Há estudos que propõem alternativas profiláticas importantes para áreas endêmicas, como para a triagem sorológica dos doadores de sangue que não é sempre realizada, foi preconizada a utilização de drogas tripanocidas como a violeta genciana em conjunto com ácido ascórbico e foto-irradiação, diminuindo dessa forma a concentração da violeta genciana (Ramirez *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 1996). Estes estudos voltam-se para o aprimoramento tanto do diagnóstico como dos processos de imunização dos indivíduos, frente à possibilidade de exposição às formas tripomastigotas metacíclicas.

A imunização contra o *T.cruzi* foi investigada por vários autores, utilizando vários tipos de antígenos tratados com métodos químicos ou físicos.

Agentes químicos, como a formalina, utilizados para matar formas epimastigotas, promoveram pouca ou nenhuma proteção; o perclorato de sódio foi deficiente para aumentar a imunogenicidade das formas tratadas. Porém formas epimastigotas, tratadas por congelamento ou descongelamento e inoculadas com ou sem adjuvante, desenvolveram significativa proteção ao desafio com formas tripomastigotas homólogas (McHardy, 1978).

Ruiz e colaboradores (1990) estudaram a fração subcelular de epimastigota de *T.cruzi* quanto a sua capacidade de induzir proteção ou efeitos agressivos aos animais de experimentação (camundongos). Observaram a sobrevivência após desafio com formas sangüícolas e imunoproteção, quando imunizados com a fração FCH-F8-4, que neutraliza a infectividade de formas sangüícolas e produz lise mediada por complemento em tripomastigotas derivados de cultivo celular, sendo este epitopo um candidato à produção de vacinas. Utilizando a combinação de BCG e formas promastigotas mortas de *Leishmania* em vacinação experimental, Araujo e colaboradores (1999) observaram a redução da infecção aguda com formas tripomastigotas de *T.cruzi*, pois estimula a resposta T-celular ao antígeno de *T.cruzi* e promove a produção de IFN- γ na fase aguda e crônica. Estimula ainda a produção de IL-12, inibe IL-10, mas não apresenta qualquer efeito sobre IL-4 na infecção de camundongos por *T.cruzi* (Araujo *et al.*, 2000).

Os efeitos da radiação gama sobre o crescimento, infectividade, morfologia e motilidade foram estudados por alguns autores. Experimentos inoculando animais com parasitas irradiados com diferentes doses resultaram em 100% dos animais infectados com doses de 150 e 300Gy; em 60% e 10% de animais, com infecção com doses de 600 e 900Gy respectivamente, e sem desenvolvimento de infecção com doses de 1200Gy (Chiari *et al.*, 1968). Salata e colaboradores (1976) utilizando formas irradiadas com radiação gama com doses de 900Gy para imunização de animais detectaram baixos títulos em imunofluorescência indireta. Okanla e colaboradores (1982) observaram redução da parasitemia após desafio em camundongos imunizados com formas irradiadas, e nenhuma proteção em animais imunizados com extratos liofilizados *T.cruzi*. Alterações morfológicas foram observadas com doses de 500 Gy e a inativação do crescimento e infectividade com 400 Gy (Martinez-Silva *et al.*, 1969).

Neto e colaboradores (1996) utilizando doses de 25 ou 50 Gy de raios gama em bolsas de sangue, experimentalmente infectadas, não conseguiram bons resultados na obtenção de imunógeno ou prevenção da infecção transfusional pelo *T.cruzi*. Doses de 200 ou 300Gy mostraram-se efetivas, porque não produziram infecções em animais, entretanto podem propiciar a hemólise e

aumento da quantidade de potássio no sangue a ser transfundido (Takeda *et al.*, 1986).

Neste trabalho verificamos o efeito de diferentes doses e taxas de dose da radiação gama em formas de cultivo de cepa Y de *T.cruzi* com intuito de selecionar formas, inibir a reprodução e manter a imunogenicidade em animais experimentais.

Os parasitas mantidos em meio LIT com 10% de S.F.B. à 26°C, foram irradiados com diversas doses e a variação da taxa de dose foi obtida pela utilização de atenuador de 90% nas irradiações de baixa dose. Amostras contendo parasitas após serem irradiadas foram observadas quanto à manutenção da morfologia, número de formas e movimentação. Em irradiações com baixas doses observou-se a diminuição do número de formas a partir de 100 Gy. A partir de 3 kGy as formas mantiveram motilidade logo após a irradiação, como descrito por Hanson e colaboradores (1976), apresentaram formas arredondadas e morreram após semeadura em meio LIT com 10% de S.F.B. à 26°C. As amostras que receberam 2 kGy, apesar de não se reproduzirem nas mesmas condições, mantiveram-se vivas por mais de 7 dias. As amostras irradiadas com 100, 400 e 1 kGy mantiveram-se vivas e se reproduziram, porém em menor número quando comparadas com amostra não irradiada.

Nos cultivos utilizados haviam formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas em menor proporção, pois é uma característica da cepa Y de *T.cruzi* apresentar menor metaciclogênese nestas condições do que as cepas G ou CL. A diminuição do número de formas ocorre porque as formas epimastigotas se reproduzem no inseto vetor e em meios de cultura, a 26°C. As células em divisão são mais radiosensíveis em relação a células em estágio estacionário (Hall, 2000), selecionando as formas metacíclicas das epimastigotas por estas estarem em constante divisão celular nas condições utilizadas.

A seleção das formas tripomastigotas foi avaliada observando-se a diminuição do número de parasitas e aspecto reprodutivo nas amostras tratadas por radiação, complemento ou a associação de ambos.

Foi utilizado o complemento de cobaio como referência para os procedimentos de imunização, pois as formas epimastigotas são lisadas via complemento (Jacobson *et al.*, 1992) selecionando formas tripomastigotas. As

formas tripomastigotas de cultivo celular e as sangüícolas não são lisadas somente por complemento, mas na presença de anticorpo específico para o parasita e complemento.

CHAO e colaboradores (1985) observaram que há subpopulações de tripomastigotas onde há mínima lise quando tratadas com complemento. A lise entre as formas de cultura de *T. cruzi* por soro de camundongo, normal ou rato, é restrita às formas epimastigotas enquanto as tripomastigotas metacíclicas são mais resistentes. Entretanto pode haver lise entre 12 a 26% das formas tripomastigotas metacíclicas com complemento recentemente coletado enquanto o congelamento reduz os títulos de lise.

A seleção de formas tripomastigotas metacíclicas por complemento de cobaio, rato ou camundongo é utilizado para selecionar tripomastigotas de culturas como as utilizadas, contendo formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, pois causa lise das formas epimastigotas (Umekita *et al.*, 2001).

A incubação de soro fresco de humanos, coelhos e cobaios com tripanossomas de cultivo contendo formas tripomastigotas, epimastigotas e formas de transição, lisaram todas as formas epimastigotas, não afetando as formas tripomastigotas e de transição. O estudo cinético mostrou que a lise completa ocorre em 30 minutos e a incubação por mais de 2 horas não aumenta o número de formas lisadas (Nogueira *et al.*, 1975) podendo ser utilizada para purificar formas tripomastigotas viáveis.

Existe a possibilidade de isolar formas de tripanosomas, como as formas sanguíneas de *T. equinum* (Szarota *et al.*, 1980) e tripomastigotas de *T. cruzi* de culturas (Al-Abbassy *et al.*, 1972), por métodos cromatográficos através do uso de colunas de troca iônica como colunas de DEAE-celulose ou CM-celulose. É um método com base na carga total e baseia-se na separação de proteínas por cromatografia de troca iônica, onde a afinidade pela matriz do suporte pode influenciar no comportamento das proteínas. As proteínas com cargas negativas (aniônicas) podem ser separadas por cromatografia em colunas com cargas positivas de dietilaminoetil-celulose (DEAE-celulose). Inversamente, as proteínas com cargas positivas (proteínas catiônicas) podem ser separadas em colunas com cargas negativas de carboximetilcelulose (CM-celulose) (Stryer, 1995).

Visando a purificação de formas tripomastigotas metacíclicas Paiva e colaboradores (1999a) utilizaram coluna de DEAE celulose enquanto Hiyama e colaboradores (2001) obtiveram 99% de recuperação das formas utilizando CM - celulose. Parussini e colaboradores (1998) observaram que há diferença de cargas totais na membrana citoplasmática entre os estágios epimastigota, amastigota e tripomastigota do *T.cruzi*. Em estudos realizados para obter formas amastigotas em meio axênico a partir de formas tripomastigotas metacíclicas, pesquisadores utilizaram a purificação de parasitas através de coluna de DEAE-52, e verificaram que o procedimento não afetou a transformação de tripomastigota metacíclicas em amastigota (Contreras *et al.*, 2002).

Neste trabalho, todas as amostras tratadas com radiação, complemento ou com a associação dos dois, apresentaram diminuição significativa no número de parasitas, indicando a seleção das formas tripomastigotas. As amostras apenas irradiadas apresentaram significativa diminuição do número de parasitas, contudo foi menor do que a apresentada pelas amostras contendo complemento.

A despeito deste resultado, a utilização da radiação como alternativa para selecionar as formas tripomastigotas foi bem sucedida, uma vez que apresenta vantagens sobre a utilização do complemento. A mais importante delas reside na propriedade que a radiação tem de causar efeito na amostra sem, contudo introduzir qualquer substância à mesma, diferentemente das formas selecionadas por complemento, cuja dificuldade em extraí-lo é extrema, quando possível.

Cabe ressaltar ainda a dificuldade de obtenção de complemento de fonte confiável. As duas técnicas alternativas, além de serem mais demoradas também envolvem um risco maior na manipulação do material e são vulneráveis à contaminação das amostras.

Os inóculos tratados selecionaram formas metacíclicas, porém nos animais que receberam formas sem tratamento além das formas tripomastigotas em menor quantidade, haviam as formas epimastigotas, cujos antígenos foram apresentados para o sistema imune. Os inóculos tratados tinham a sua concentração ajustada para 10^6 parasitas/100 μ l, concentrando as formas selecionadas.

O Índice de Avidéz é um dado importante, pois indica que nos grupos que receberam amostras irradiadas tratadas ou não com complemento, há diminuição de anticorpos com menor afinidade ao *T. cruzi* durante o período estudado, porém há aumento na qualidade da memória imunológica.

Na resposta imune, existe seleção progressiva de clones de células B específicos, cuja afinidade pelo antígeno é alta, em substituição aos clones inicialmente ativados e de afinidade menor, resulta em aumento da proporção de anticorpos de maior afinidade com a evolução da infecção (Boes, 2000).

A determinação da avidéz é baseada geralmente no tratamento dos anticorpos ligados ao antígeno, em um suporte sólido, com um agente caotrópico, como Uréia 6M, que é capaz de retirar os anticorpos de menor afinidade, pois é um agente desnaturante das ligações antígeno - anticorpo. Os anticorpos de alta avidéz permanecem ligados ao antígeno após o tratamento da amostra e a proporção entre os antígenos de baixa e alta avidéz é indicador do período da infecção da amostra estudada (Hedman *et al.*, 1993).. Em doenças infecciosas, tais como toxoplasmose e doença de Chagas, a avidéz de anticorpos determina a fase da infecção, sendo considerada importante marcador sorológico. Foi demonstrado que não há relação entre a concentração de anticorpos e avidéz. Assim sendo, a avidéz é uma qualidade do anticorpo que pode indiretamente indicar uma memória específica ao agente.

Foi realizado ensaio imunoenzimático, utilizando Uréia 6M como agente caotrópico (Camargo *et al.*, 1991) com o intuito de determinar a avidéz dos anticorpos pesquisados. A partir da Densidade Óptica a 492nm da reação tratada com uréia a 6M e com PBSTL, os resultados foram expressos em índice de avidéz (IA), determinados pela razão entre os valores da densidade óptica das amostras tratadas com uréia e a densidade óptica das amostras não tratadas e expresso em porcentagem (Hedman & Seppala, 1988). Sendo definidos que: IA menor que 40% considerados de baixa avidéz, entre 41 e 70%, de média avidéz e maior que 70%, de alta avidéz (Souza *et al.*, 2005).

O índice de avidéz dos animais que receberam inóculo com parasitas sem tratamento permaneceu entre 40 e 50%. Os demais grupos avaliados com inóculos com parasitas irradiados com 100 e 400Gy, tratados ou não com complemento de cobaio e irradiados posteriormente com 2 kGy, apresentaram

índice de avidéz entre 50 e 70%. Os que receberam inóculos com formas irradiadas com 100 Gy, tratadas ou não com complemento e posteriormente irradiadas com 2 kGy apresentaram índices de avidéz entre 60 e 70% durante todo o período avaliado. Segundo o índice preconizado, os resultados obtidos restringiram-se a faixa de média avidéz. O mesmo resultado foi observado em estudo sobre a evolução da avidéz de anticorpos para diferentes antígenos específicos em ratos infectados por tripomastigotas sangüíneos de *T. cruzi* cepa Tulahuen, os quais apresentaram índice de avidéz de 70% no 60º dia pós-infecção. Foram demonstrados valores de alta avidéz somente durante a fase crônica da infecção em relação aos anticorpos contra antígenos 21-, 33-, 42-, 56-, 58-, 66-, e 72-kDa. É possível detectar diferenças na maturidade da infecção chagásica e discriminar a infecção recente (aguda) da crônica. (Marcipar *et al.*, 2001).

A porcentagem de avidéz é utilizada para auxiliar diagnósticos como na Toxoplasmose. Em outros parasitas como a *Leishmania amazonensis* agente etiológico da leishmaniose tegumentar, a associação entre o quadro clínico do paciente com o perfil de imunoglobulinas, bem como, com sua avidéz, é muito complexo. Souza e colaboradores (2005) não conseguiram estabelecer correlação entre o tempo de evolução da lesão dos pacientes e a avidéz das imunoglobulinas, pois nos casos de lesões recentes, entre 1 a 3 meses, foram observados anticorpos com altos índices de avidéz. Além disso, em pacientes com até 10 anos de infecção foram detectados anticorpos de baixa avidéz. Esses dados evidenciam a complexidade da resposta imune humoral em pacientes com LTA, mostrando que durante esse processo infeccioso, não há correlação entre maturação e mensuração de anticorpos, em termos de avidéz, com a evolução da parasitose (Souza *et al.*, 2005).

Interessante notar que a maturação da avidéz foi mais rápida nas imunizações do que na infecção natural. Este fato pode estar relacionado à maior velocidade de produção de células de memória em imunização, dado o sistema de pulso dos antígenos, diferentes da contínua exposição na infecção. Outra explicação para o fato seria o consumo de células imunes durante o controle da infecção.

O tratamento por radiação com 100 Gy e posteriormente com 2 kGy revela-se importante na seleção de parasitas e evidencia um estímulo à resposta imunológica equivalente as amostras tratadas com complemento que seleciona as formas tripomastigotas. Há equivalência quando se compara a produção de anticorpos da classe IgG entre camundongos BALB/c e C57BL/6. Em camundongos BALB/c observa-se o mesmo padrão na porcentagem de avidéz de anticorpos quando comparado com a imunização de animais com formas selecionadas com complemento e irradiação posterior de 2 kGy.

Observamos a capacidade de invasão celular a 37⁰C através da formação de vacúolos nas células após 3h de contato das amostras com 100, 400 e 1000 Gy e amostras irradiadas com doses de 100 e 400 Gy, tratadas com complemento e posteriormente irradiadas com 2 kGy. Nas amostras com 100, 400 e 1 kGy observou-se a reprodução dos parasitas. Burtleigh & Andrews, 1995, estudando o mecanismo de invasão de células de vertebrados por *T.cruzi*, utilizaram tripomastigotas derivadas de cultura celular que equivalem a tripomastigota sangüícola, e observaram a transformação de tripomastigota para amastigota. Após a invasão a transformação inicia-se e 1 a 2 horas depois o parasita escapa do vacúolo parasitóforo. Hanson e colaboradores (1973) irradiaram formas tripomastigotas e amastigotas em doses que variaram de 300 Gy a 3 kGy, e observaram que as formas expostas a 1,5; 2 e 3 kGy mantiveram a motilidade após a irradiação, porém não se desenvolveram em culturas com células VERO a 37⁰C. Estas descrições confirmam nossos resultados de manutenção da biologia celular do agente, a despeito da perda de sua capacidade reprodutiva.

As formas tripomastigotas metacíclicas e sangüíneas apresentam propriedades biológicas similares sob a perspectiva parasitológica. Ambas têm a capacidade de penetrar ativamente, transformar-se em amastigotas, multiplicação intracelular e diferenciar em tripomastigota. Estas formas são conhecidas por expressar antígenos estágio-específico e atualmente apresentam diferentes formas de interação com células do hospedeiro (Burtleigh & Andrews, 1995). Por instantes as tripomastigotas metacíclicas expressam várias glicoproteínas de membrana que interagem com as células de mamíferos, as quais não são observadas equivalentes em formas sangüícola (Ruiz *et al.* 1993). Esta diferença

na expressão gênica justifica a discriminação entre formas tripomastigotas sangüícolas e metacíclicas como fisiologicamente distinguem os estágios do ciclo biológico (Tyler & Engman, 2001).

Nossos dados de desafio de animais imunizados claramente corroboram a hipótese de seleção de antígenos importantes no processo de irradiação. Tanto o fato de imunógenos irradiados com baixas doses de radiação apresentar maior capacidade de induzir proteção quando comparados àqueles irradiados com altas doses, como o fato de formas resistentes à radiação gerar imunógenos mais protetores, sugere fortemente que a radiação seleciona os antígenos mais importantes para a proteção, provavelmente aqueles existentes no hospedeiro vertebrado, nas formas metacíclicas ou tripomastigotas.

A produção de anticorpos em camundongos tratados com parasitas irradiados com 2kGy é menor em relação aos tratados com formas de *T. cruzi* não irradiadas, como pode ser observado nas FIG. 9 e 10. Estes resultados também foram observados por Salata e colaboradores (1976), porém utilizando formas irradiadas com 900 Gy. Em camundongos resistentes, C57BL/6, observou-se uma redução maior na produção de anticorpos quando imunizados com formas irradiadas. A irradiação das formas pode ter induzido uma resposta celular (Th1) por modificar a carga do parasita ou as moléculas superficiais, melhorando a apresentação ao sistema imunológico, podendo envolver células dendríticas.

O uso adequado de sistemas de seleção associado à radiação ionizante resultam em imunógeno não contaminados com proteínas exógenas e com restrições ao uso em vacinas, como acontece nos tratamentos com complemento; ainda são necessários, contudo, novos estudos para que a radiação seja adotada como uma ferramenta mais eficiente na seleção de formas tripomastigotas ou metacíclicas.

6. CONCLUSÕES

Conclusão geral

A radiação ionizante, isoladamente ou em associação, pode ser uma ferramenta útil no desenvolvimento de imunógenos capazes de gerar imunidade humoral e proteção contra infecções por *T.cruzi* em camundongos.

Conclusões específicas

1. A irradiação de *T. cruzi* com 2 kGy é capaz de inibir totalmente a capacidade reprodutiva de formas do parasita, sem interferir significativamente em sua biologia celular.
2. Altas doses de radiação promovem a esterilização e a destruição do agente.
3. A indução de imunidade humoral, medida pela quantidade de IgG específica, é mais adequada quando há manutenção da biologia celular do agente.
4. A indução de anticorpos de alta avidéz é mais precoce nos ensaios de imunização do que na infecção, mas não tem relação direta com a proteção.
5. A seleção de formas tripomastigotas, pelo uso de doses baixas de radiação e ou tratamento com complemento, gera imunógenos mais eficientes na proteção de camundongos imunizados e desafiados.

APENDICE A

Meio LIT (Liver Infusion Tryptose)

Meio LIT (pH 7,35) com Soro Fetal Bovino (S.F.B.) a 10% sem antibiótico para manutenção de *T.cruzi* a temperatura de 26°C.

Preparar as soluções abaixo e armazená-las refrigeradas em geladeira. Todas as soluções devem passar por teste de esterilidade antes de serem armazenadas ou utilizadas.

Fórmula das Soluções utilizadas:

Solução A

NaCl	4,0g
KCl	0,4g
Na ₂ HPO ₄ anidro	8,0g
Bacto Tryptose (Difco)	5,0g
H ₂ O destilada - qsp	800ml

Autoclavar a 121°C por 20 minutos, pH 7,8

Solução B

Infusão de Fígado – Bacto (Difco)	12g
H ₂ O destilada - qsp	200ml

Autoclavar a 121°C por 20 minutos

Solução C

D-glicose anidra	10g
H ₂ O destilada - qsp	200ml

Autoclavar a 121°C por 20 minutos

Solução Hemina 1%

Hemina	0,1g
NaOH 0,1N	10ml

Esterilizar em filtro descartável com membrana Millipore 0,22 µm

Soro Fetal Bovino

Inativar antes do uso: colocar em banho-maria a 56°C por 30 minutos.
Esterilizar em filtro descartável com membrana Millipore 0,22 µm.

Solução para uso: misturar 800ml da Solução (sol) A, 50ml da Sol. B, 40ml da Sol. C, 1,0ml de Solução de Hemina e 90ml de Soro fetal bovino estéril e inativado. Manter em geladeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, I.A & COFFMAN, R.L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, INF- γ and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp. Parasitol.**, v.84, p.231-244, 1996.

AL-ABBASSY, S.N.; SEED, T.M.; KREIER, J.P. Isolation of the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* from a mixture of the tripomastigote and epimastigote forms of parasites by use of a DEAE-cellulose column. **The Journal of Parasitology**, v.58, n.3, p.631-632, 1972.

ALEXANDER, J. A radio attenuated *Leishmania major* vaccine markedly increases the resistance of CBA mice to subsequent infection with *Leishmania mexicana, mexicana*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.76, p.646-649, 1982.

ARAUJO, Z.; BOUHDIDI, A.; HEREMANS, H.; MARCK, E.V.; CASTES, M.; CARLIER, Y. Vaccination of mice with a combination of BCG and killed *Leishmania* promastigotes reduces acute *Trypanosoma cruzi* infection by promoting an INF- γ response. **Vaccine**, v.17, p.957-964, 1999.

ARAUJO, Z.; HEREMANS, H.; STORDEUR, P.; WISSING, M.; GOLDMAN, M.; CASTES, M.; CARLIER, Y. INF- γ , IL-4, IL-10 and IL-12 gene expression in BCG - *Leishmania* vaccination of *Trypanosoma cruzi* - infected mice. **Vaccine**, v.18, p.1822-1829, 2000.

AUFDERHEIDE, A.C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L.E.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. A 9,000-year record of Chagas' disease. **PNAS**, v.101, n.7, p.2034-2039, 2004.

BERRIZBIETIA, M.; NDAO, M.; GOTTSCHALK, M.; ACHÉ, A.; VÁSQUEZ, F.; LACOUTURE, S.; MEDINA, M.; WARD, B.J. Development and comparison of enzyme immunoassays for diagnosis of Chagas' disease using fixed forms of *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes, amastigotes, and trypomastigotes) and assessment of antigen stability for the three assays. **J Clin Microbiol**, v.42, n.4, p.1766-1769, 2004.

BOES, M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. **Molecular Immunology**, v.37, p.1141-1149, 2000.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.4, n.6, p.389-396, 1962.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In: DIAS, J.C.P. & COURA, J.R. (Ed.). **Clínica e terapêutica da Doença de Chagas. Um manual prático para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p.25-32, 1997.

BRENER, Z. & GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int. Arc. Allergy Immunol.**, v.114, p.103-110, 1997.

BURGHEIGH, B. & ANDREWS, N. The mechanism of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Ann Rev Microbiol**, v.49, p.175-200, 1995.

BUSCAGLIA, C.A. & DI NOIA, J.M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and epidemiology of Chagas' disease. **Microbes and Infection**, v.5, p.419-427, 2003.

CAMARGO, M.E.; SILVA, S.M.; LESER, P.G.; GRANATO, C.H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.33, p.213-218, 1991.

Centers for Disease Control & Prevention National Center for Infectious Diseases. Division of Parasitic Diseases. Apresenta o texto trypanosomiasés, american. Disponível em <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>>. Acesso em: 08 jul 2005.

Center for Health Applications of Aerospace Related Technologies (CHAART) . Apresenta o texto Chagas' Disease Characteristics . Disponível em <<http://geo.arc.nasa.gov/sge/health/sensor/diseases/chagas.html>> . Acesso em: 29 jul. 2005.

CHAO, D.; HSU, Y.P.; CHAN, C.H.; CHEN, Y.A. Comparative studies on epimastigote and metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. II. Selective lysis by rodent sera. **Int J Zoonoses**, v.12, n.4, p.323-330, 1985.

CHIARI, E.; MANSUR NETO, E.; BRENER, Z. Some effects of gamma-radiation on *Trypanosoma cruzi*, culture and blood forms. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.10, n.3, p.131-137, 1968.

Ciência Hoje . Apresenta o texto sobre brasileira desenvolve vacina contra Chagas. Disponível em <<http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/2936>> . Acesso em: 15 ago. 2005.

CONTRERAS, V.T.; NAVARRO, N.C.; DE LIMA, A.R.; ARTEAGA, R.; DURAN, F.; ASKUE, J.; FRANCO, Y. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, n.8, p.1213-1220, 2002.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J.R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potencial of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, n.1, p.1-12, 2003.

DIAS, J.C.P. **Epidemiologia**. In *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.48-74, 2000.

DIAS, J.C.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, n.5, p.603-612, 2002.

Fundação Nacional de Saúde. Apresenta texto sobre Doença de Chagas em Guia de Doenças. Disponível em <<http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em: 29 nov. 2005.

GROSH, D. S. & HOOPYWOOD, L. E. **Biological effects of radiation**. 2 ed. New York, Academic Press, 1979.

GUILLEN, P.B.; LUGO, Y.A.; MORENO, E. Digestive tract dilatation of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Investigation Clinica**, v.42, n.3, p.195-209, 2001.

HALL, E.J. Radiobiology for the radiologist. 5^a. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 588p.

HANSON, W.L.; CHAPMAN, W.L.Jr.; WAITS, V.B. Immunization of mice with irradiated *Trypanosoma cruzi* grown in cell culture: relation of numbers of parasites, immunizing injections, and route of immunization to resistance. **Int. J. Parasitol.**, v.6, p.341-347, 1976.

HANSON, W.L.; CHIEN, J.J.; CHAPMAN, W.L.Jr. Partial resistance in mice inoculation with irradiated *Trypanosoma cruzi* from cell culture. **The Journal of Protozoology**, v.20, n.4, p.511, 1973.

HEDMAN, K.; LAPPAPAINEN, M.; SODERLUND, M.; HEDMAN, L. Serodiagnosis of infectious diseases. **Reviews in Medical Microbiology**, v.4, p.123-129, 1993.

HEDMAN, K. & SEPPÄLÄ, I. Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. **J. Clin. Immunol.**, v.8, p.214-221, 1988.

HIGO, H.; MIURA, S.; HORIO, M.; MIMORI, T.; HAMANO, S.; AGATSUMA, T.; YANAGI, T.; CRUZ-REYES, A.; UYEMA, N.; ARIAS, A.R.; MATTA, V.; AKAHANE, H.; HIRAYAMA, K.; TAKEUCHI, T.; TADA, I.; HIMENO, K. Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. **Parasitology International**, v.53, p. 337-344, 2004.

HIYAMA, K.; HAMANO, S.; NAKAMURA, T.; NOMOTO, K.; TADA, I. IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol. Res.**, v.87, p.269-274, 2001.

HOARE, C.A. **The trypanosomes of mammals**. 1^a.ed., Oxford and Edinburgh: Blackwell Scientific Publications, p.327-380, 1972.

HOFF, R. Killing in vitro *Trypanosoma cruzi* by macrophages from mice immunized with *T. cruzi* or BCG, and absence of cross-immunity on challenge in vivo. **J. Exp. Med.**, v.142, p.299-311, 1975.

HRAZDIRA, I. & SKALKA, M. Changes produced by ultrasound in the deoxyribonucleoprotein complex in vitro. **Folia Biol (Praha)**, v.16, p.121-128, 1970.

JACOBSON, K.C.; FLETCHER, R.C.; KUHN, R.E. Binding of antibody and resistance to lysis of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.**, v.14, n.1, p.1-12, 1992.

MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D.J. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas' disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.99, n.1, p.1-12, 2004.

MARCIPAR, I.S.; RISSO, M.G.; SILBER, A.M.; REVELLI, S.; MARCIPAR, A.J. Antibody maturation in *Trypanosoma cruzi*-infected rats. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, n.4, p.802-805, 2001.

MARTINEZ-SILVA, R.; LOPES, V.A.; COLÓN, J.I.; CHIRIBOGA, J. *Trypanosoma cruzi*: effects of gamma radiation on growth and infectivity. **Exp. Parasit.**, v.25, p.162-170, 1969.

MARZOCHI, K.B.; MARZOCHI, M.A.; SILVA, A.F.; GRATIVOL, N.; DUARTE, R.; CONFORT, E.M.; MOLDEBBER, F. Phase I: study of inactivated vaccine against american tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. **Mem Inst Osv Cruz**, v.93, n.2, p.205-212, 1998.

McHARDY, N. Immunization of mice against *Trypanosoma cruzi*: the effect of chemical treatment or immune serum on an epimastigote vaccine. **Tropened. Parasit.**, v.29, p.215-222, 1978.

MELLO, R.C.N. & MACHADO, C.R.S. Depletion of radiosensitive leukocytes exacerbates the heart sympathetic denervation and parasitism in experimental Chagas' disease in rats. **Journal of Neuroimmunology**, v.84, n.2, p.151-157, 1998.

MINEO, J.R. **Detecção de antígeno e de anticorpos com técnicas imunoenzimáticas para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose "aguda"**. 1982. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

NASCIMENTO, N.; SEEBART, C.S.; FRANCIS, B.; ROGERO, J.R.; KAISER, I.I. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. **Toxicon**, v.34, p.123-131, 1996.

NETO, V.A.; MATSUBARA, L.; HAMMERSCHLAK, N.; CARAGNANI, F.L. Tentativas de uso de raios gama para prevenir infecção transfusional pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.29, n.6, p.613-614, 1996.

NOGUEIRA, N.; BIANCO, C.; COHN, Z. Studies on the selective lyses and purification of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Experimental Medicine**, v.142, p.224-229, 1975.

OKANLA, E.O.; STUMPF, J.L.; DUSANIC, D.G. Resistance of mice immunized with irradiated and liophilized stages of *Trypanosoma cruzi* to infections with metacyclics. **Int. J. Parasitol.**, v.12, p. 251-256, 1982.

PAIVA, C.N.; MORGANA, T.L.; CASTELO-BRANCO, T.L.; LANNES-VIEIRA, J.; GATASS, C.R.. *Trypanosoma cruzi*: protective response of vaccinated mice is mediated by CD8⁺ cells, prevents signs of polyclonal T lymphocyte activation, and allows restoration of a resting immune state after challenge. **Experimental Parasitology**, v.91, p.7-19, 1999.

PAIVA, C.N.; MORGANA, T.L.; CASTELO-BRANCO, T.L.; ROCHA, J.L.; LANNES-VIEIRA, J.; GATASS, C.R.. *Trypanosoma cruzi*: lack of T cell abnormalities in mice vaccinated with live trypomastigotes. **Parasitol. Res.**, v.85, p.1012-1017, 1999a.

PARUSSINI, F; DUSCHAK, V.G.; CAZZULO, J.J. Membrane-bound cysteine proteinase isoforms in different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **Cell Mol Biol**, v.44, n.3, p.513-519, 1998.

PASSOS, L.A.C. **Análise do determinismo genético da resistência de camundongos infectados experimentalmente com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** 2003. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

RAMIREZ, L.E.; LAGES-SILVA, E.; PIANETTI, G.M.; RABELO, R.M.C.; BORDIN, J.O.; MORAES-SOUZA, H. Prevention of transfusion-associated Chagas' disease by sterilization of *Trypanosoma cruzi* - infected blood with gentian violet, ascorbic acid, and light. **Transfusion**, v.35, n.3, p.226-230, 1995.

RASSI, A.; RASSI Jr., A; RASSI, S.G.; RASSI, A G. **Cardiopatia crônica: arritmias.** In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. (eds). Clínica e terapêutica da Doença de Chagas. Um manual prático para o clínico geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p.201-222, 1997.

REED, S.G. In vivo administration of recombinant INF- γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immunosuppression and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **J. Immunol.**, v.16, p.193-199, 1988.

REY, L. **Parasitologia.** 2ª.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1.991. 731p.

RUIZ, A.M.; ESTEVA, M.; SUBIAS, E.; MORENO, M.; CAMPANINI, A.R.; VELAZQUEZ, E.; SEGURA, E.L. Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*: immunoprotection against metacyclic trypomastigotes obtained by immunization of mice with an affinity-purified antigen. **Mol Biochem Parasitol**, v.39, n.1, p.117-25, 1990.

RUIZ, R.C.; RIGONI, V.L.; GONSALEZ, J.; YOSHIDA, N. The 35/50-kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes an adhesion molecule involved in host cell invasion. **Parasit Immunol**, v.15, p.121-125, 1993.

SALATA, E.; BARBOSA, M.A.; CORREA, F.M.A. Efeitos de raios gama sobre *Trypanosoma cruzi* . II - Anticorpos em camundongos inoculados com formas de cultura. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.18, n.4, p.211-214, 1976.

SILVA, J.S.; VESPA, G.N.R.; CARDOSO, M.G.; ALIBERTI, J.C.S.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon activated macrophages. **Infect. Immun.** v.63, p.4862-4867, 1995.

SOUZA, H.M.; BORDIN, J.O.; BARDOSSY, L.; BLAJCHMAN, M.A. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infected human platelet concentrates with aminomethyltrimethyl psoralen (AMT) and ultraviolet (A9UV-A) light: preliminary results. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.29, n.1, p.47-49, 1996.

SOUZA, M.A.; SILVA, A.G.; AFONSO-CARDOSO, S.R.; FAVORETO JUNIOR, S.; FERREIRA, M.S. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.2, p.137-141, 2005.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan , 1995. 1000 p.

SZAROTA, R.M.; CORRÊA, F.M.A.; SALATA, E. Similaridades antigênicas entre *T.cruzi* e *T.equinum*. In: PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS - VII REUNIÃO ANUAL, I31., 3-5 novembro, 1980, Caxambu. *Resumos...* Caxambú.

TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **J Immunol Methods**, v.93, n.2, p.157-65, 1986.

TAKEDA, G.K.; CAMPOS, R.; KIEFFER, J.; MOREIRA, A.A.; AMATO-NETO, V.; CASTILHO, V.L.; PINTO, P.L.; DUARTE, M.I. Ação dos raios gama sobre formas sanguícolas de *Trypanosoma cruzi*. Estudo experimental em camundongos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.28, n.1, p.15-18, 1986.

TAKEHARA, H.A.; PERINI, A.; MOTA, I. *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in mouse. **Exp. Parasitol.**, v.52, p.137-146, 1981.

TOMLINSON ,S.; VANDEKERCKHOVE, F.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. **Parasitology**, v.110, p.547-54, 1995.

TYLER, K. & ENGMAN, D. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int J Parasitol**, v.31, p. 472-481, 2001.

UMEKITA, L.F.; CARNEIRO, S.M.; SESSO,A.; MOTA, I. One fate of bloodstream trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* after immune clearance: an ultrastructural study. **J. Parasitol.**, v.85, n.5, p.867-872, 1999.

UMEKITA, L.F.; LEITE, R.A.; BARBARO, K.C.; MOTA, I. Changes of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies after gamma-irradiation of mice in the chronic phase of the infection. **Acta Trop.**, v.75, n. 2, p. 211-217, 2000.

UMEKITA, L.F.; LOPES-FERREIRA, M.; PIAZZA, R.M.; UMEZAWA, E.S.; NASCIMENTO, M.S.; FARSKY, S.H.; MOTA, I. Alterations of the micro circulatory network during the clearance of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: an intravital microscopic study. **J Parasitol**, v.87, n.1, p.114-117, 2001.

University of São Paulo. Institute of Biomedical Sciences. Department of Parasitology, Marcelo de Campos Pereira, PhD. Apresenta galeria de imagens de parasitas do Phylum Arthropoda. Disponível em <<http://icb.usp.br/~marcelcp/Imagens/f-hemi11c.jpg>>. Acesso em: 09 nov. 2005.

VENKATESAN, P. & WALEKIN, D. Elisass for parasitologists: or lies, dammed lies and elisas. **Parasitology Today**, v.9, n.6, p. 228-232, 1993.

WALES, A. & KUSEL, J.R. Biochemistry of irradiated parasite vaccines: suggested models for their mode of action. **Parasitology Today**, v.8, n.11, p. 358-363, 1992.

World Health Organization - WHO/OMS – Chagas: The disease. Disponível em <<http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>> . Acesso em: 08 jul. 2005.

<http://www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy02/trypanosoma.htm> . Acesso em 22.fev.2006.



M23268



Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Diretoria de Ensino & Informação Científica e Tecnológica
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3816 - 9148
SÃO PAULO - São Paulo - Brasil
<http://www.ipen.br>

O ipen é uma autarquia vinculada à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento Econômico e Turismo do Estado de São Paulo, gerida técnica, administrativa e financeiramente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência e Tecnologia, e associada à Universidade de São Paulo.