UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Interação entre componentes biológicos de triatomíneos não infectados e soros de pacientes chagásicos crônicos

Antonio Marcos de Aparecida Levy

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Sumie Hoshino Shimizu

São Paulo
2003

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Levy, Antonio Marcos de Aparecida

L668I Interação entre componentes biológicos de triatomíneos não infectados e soros de pacientes chagásicos crônicos / Antonio Marcos de Aparecida Levy. -- São Paulo, 2003.
97p.

Tese(doutorado) _ Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orietandor: Shimizu, Sumie Hoshino

1. Doença de Chagas 2. Imunologia: Doença de Chagas
3. Insecta: Zoologia 4 Entomologia médica I T. infestans
II Shimizu, Sumie Hoshino, orientador.

616.9363 CDD

Antonio Marcos de Aparecida Levy

Interação entre componentes biológicos de triatomíneos não infectados e soros de pacientes chagásicos crônicos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Sumie Hoshino Shimizu
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

AD HONOREM ET GLORIAM MARIAE,
BEATAE DEI GENETRIX, SINE MACULA
CONCEPTAE.

AS PROFAS
DRAS. JUDITH KARDOS KLOETZEL,
SUMIE HOSHIINO SHIMIZU
MIRTIES UEDA
PELO APOIO E INCENTIVO

AOS
MEUS MORTOS

AGRADECIMENTOS

Em ordem de entrada, como nos velhos rádio-teatros:

A todos do Instituto de Medicina Tropical: Eufrosina Ulmezawa, Heitor Franco de Andrade Junior que deram o incentivo inicial para voltar à Pós Graduação; a Marilda Parcia do Nascimento pelos tripomastigotas, a Mônica de Paula Leal pelo fornecimento de material técnico e Margoth Ramos Garnica por ter ensinado a técnica de óxido nítrico.

A todos os funcionários do Instituto Adolfo Lutz sempre, gentilmente, colaboraram nas diferentes etapas deste trabalho, de modo especial; Aos técnicos, biólogos e pesquisadores da seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz: Aurea, Carmem, Carlos Roberto Elias, Maria de Fátima Lereño, , Pansão Westphalen, Rui Larosa e José Eduardo Tolezano por sugestões, fornecimento de material técnico e demonstrações de carinho e amizade.

Aos técnicos, biólogos e pesquisadores da seção de Imunologia: Regina, Nercide, Heide, Elizabeth de Gaspari, Lourdes, Maria das Graças, Sonia e Tokiko.

Aos amigos da seção de Sorologia: Carmem Silvia de Melo, Eide Dias Camargo, Carmen Aparecida de Freitas Oliveira, Edilene Real da

Silva, Rosimeire Yamashiro, Alonzo Fernandes, André, Mair Ferreira, Vilmar Batista Vicente, Maria Salete Rosa, Helenice Madalena da Silva, Raquel Belinatti Robert. Um abraço especial a Lia Carmem, Álvaro Pasaki e Neusa Satomi Sato. Um agradecimento a todos os estagiários que passaram pela seção durante este período.

Aos amigos e companheiros de guerra do laboratório de Xenodiagnóstico nos tempos difíceis que passamos: Dr. Abílio Augusto Fragata Filho, Geraldo Barbosa, Laura Beatriz Mesiano Maifrino, Maria Cristina Ramos, Maria Eugenia Caristina, Neilson de Jesus e Vera Lucia Fioratti pela compreensão e colaboração,

A todos os aprimorandos do laboratório de Xenodiagnóstico: Marcio, Paula, Elaine, Roberto, Anany, Cristiane e Branca: desculpas pela omissão. O aprendizado de alguém interfere no aprendizado de outros.

Aos co-laboradores deste trabalho: Paulo Nakamura, Elizabeth Visone Nunes, Helena Hilomi Taniguchi e Angela Maria Lourenço,

A colega de bancada Edna Matona de Souza.

A pesquisadora Vera Lucia Pereira Chioccola, pelas sugestões científicas e pela demonstração de amizade e incentivo.

Ao Romance, a Tufy-Tufy, a Chocolate, Tigrinho e toda a tropa que justificavam a volta à casa depois um dia de experimentos fracassados, obrigado por tanto carinho e desculpa por tantas omissões minhas

A todos que aquele que detém o Oculto e o Manifesto manifeste a Sua face favorável e derrame suas bênçãos..

INDICE

1. INTRODUÇÃO	.1
1.1.IMPORTÂNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS NOS DIAS ATUAIS	1
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO E VETORES	2
1.3.CICLO BIOLÓGICO DO PÁRASITA	3
1.4 RESPOSTA IMUNE NA DOENÇA DE CHAGAS	5
1.5 A RELAÇÃO PARASITA/VETOR	7
1.6HEMÓCITOS E <i>T. cruzi</i>	10
1.7REAÇÕES CRUZADAS E <i>T. cruzi</i>	15
1.8PROTEÍNAS EXPRESSAS POR TRIPOMASTIGOTAS	17
1.9 ESTRUTURAS DE TRIATOMÍNEOS RECONHECIDAS POR <i>T. cruzi</i>	19
2. OBJETIVO	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 SOROS	23
3.1.1 SOROS HUMANOS	23
3.1.2SOROS DE CAMUNDONGOS	24
3.2 ANIMAIS	24
3.2.1 CAMUNDONGOS	25
3.3 CEPA DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
3.3.1TRIPOMASTIGOTAS DE CULTURA CELULAR	26
3.3.2TRIPOMASTIGOTAS SANGÜÍNEOS	27
3.3.3 EPIMASTIGOTAS	27
3.4 REAÇÃO DE LISE MEDIADA POR COMPLEMENTO	28
3.5REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA <i>In situ</i>	29
3.6.HEMÓCITOS	29
3.6.1.HEMÓCITOS DE HEMATÓFAGOS	29
3.6.2.OBTENÇÃO DE HEMÓCITOS PARA A REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	30
3.6.3 HEMÓCITOS DE FITÓFAGOS	31

3.6.4.OBTENÇÃO DE HEMÓCITOS PARA A TÉCNICA DE ELETROFORESE E EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS PAGE) E IMUNOBLOT	32
3.7 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA ANTI-HEMÓCITOS	32
3.8 INVESTIGAÇÃO DE CARBOIDRATOS	33
3.8.1 TRATAMENTO DE HEMÓCITOS COM PERIODATO DE SÓDIO	33
3.8.2 IDENTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS ATRAVÉS DE LECTINAS FLUORESCENTES	34
3.9 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA(SDS PAGE)	35
3.10 IMUNOBLOT	36
3.11 OBTENÇÃO DE SALIVA DE <i>Panstrongylus megistus</i>	37
3.12 REAÇÃO DE DOT-ELISA COM SALIVA DE <i>P. megistus</i>	38
3.12.1 PARASITEMIA E MORTALIDADE	39
3.12.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE	39
3.12.3 DOSAGEM DE CITOCINAS	40
3.14 DETERMINAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	40
4. RESULTADOS	42
4.1 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA COM SOROS HUMANOS	42
4.2 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA COM SOROS DE CAMUNDONGOS	44
4.3. 'ESPECIFICIDADE' DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA ANTICORPOS ANTI-HEMÓCITOS	45
4.4 IDENTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS	46
4.5 IDENTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS ATRAVÉS DE LECTINAS	47
4.6 EXPERIMENTOS DE IMUNIZAÇÃO DE ANIMAIS COM HEMÓCITOS	48
4.6.1 PARASITEMIA E MORTALIDADE	48
4.6.2 REAÇÃO DE SOROS DE ANIMAIS IMUNIZADOS COM HEMÓCITOS E SOBRENADANTE DE HEMOLINFA COM EPIMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS	50
4.6.3 REAÇÃO DE LISE MEDIADA POR COMPLEMENTO	50

4.6.4DOSAGEM DE CITOCINAS ⁱ	50
4.6.5 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO	54
4.7. DOT-ELISA COM SALIVA DE <i>P. megistus</i>	55
4.8 IMUNOBLOT DE SOROS DE PACIENTES CHAGÁSICOS COM EXTRATO DE HEMÓCITOS DE <i>P. megistus</i>	57
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO	74
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
8.1 ANEXO 1	94
8.2ANEXO 2	96

LISTA DE ABREVIATURAS

Anti α GAL : anticorpos anti α gal presente em soros de pacientes chagásicos

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

Hc: hemócitos

HL: sobrenadante de hemolinfa

IFN γ : interferon γ

IL-10: interleucina 10

NO: óxido nítrico

PBS: solução tampão contendo cloreto de sódio e fosfatos

PPD: purified protein derivative

SDS-PAGE: eletroforese vertical em gel de poliacrilamidacontendo duodecil sulfato de sódio

TNF α : fator de necrose tumoral α

RESUMO

Investigou-se a existência de relação entre células normais de triatomíneos, formas evolutivas do *T. cruzi* e hospedeiros mamíferos. Hemócitos do vetor de espécies hematófagas não infectadas (*Triatoma infestans*, *T. palidipennis*, *Dipetalogaster maximus*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*) foram reconhecidos por soros de pacientes e camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*, por meio da técnica de imunofluorescência, enquanto que os hemócitos de um inseto fitófago, *Diactor billineatus* (ninfas e adultos) não foram reconhecidos pelos mesmos soros. Uma parcial reação cruzada foi observada entre hemócitos de *T. infestans* e soros de portadores de leishmaniose, o que não ocorreu com as amostras de portadores de doenças autoimunes, infecção com HIV e indivíduos normais. O tratamento de hemócitos com metaperiodato de sódio aboliu a fluorescência, mostrando que antígenos carboidratos estão envolvidos. O uso de lectinas marcadas revelou que N acetil-d-glicosamina, manose, glicose e β gal fazem parte da estrutura celular. O immunoblotting com extrato de hemócitos foi realizado com soros de pacientes chagásicos crônicos antes e depois do tratamento específico. Estes soros de ambos casos foram absorvidos com tripomastigotas e epimastigotas. Um número considerável de bandas desapareceu nos soros tratados com tripomastigotas, mas não com epimastigotas. Proteínas de 61-70, 41-50, 31-40 e 21-30 kDa foram as envolvidas no processo de absorção. Após a quimioterapia, as bandas de 121-130, 91-100, 81-90 e 61-60 kDa desapareceram nos soros não absorvidos. Um grupo de camundongos fêmeas A/Sn foi imunizado com hemolinfa livre de hemócitos (HL) e outro grupo com hemócitos (Hc) e desafiados com 5×10^2 tripomastigotas sanguícolas (cepa Y). Picos de parasitemia dos camundongos HL e Hc foram observados um ou dois dias após o grupo controle. Apesar da parasitemia de ambos os grupos ter sido baixa, o grupo HL apresentou 43% de mortalidade, enquanto que o grupo Hc mostrou apenas 14 % de mortalidade. As citocinas $IFN\gamma$ e $TNF\alpha$ estão envolvidas no processo de proteção, assim como óxido nítrico e anticorpos líticos. Os

hemócitos induziram uma redução de IL-10, inibindo a resposta Th2. Desde que os hemócitos e tripomastigotas compartilham epítomos comuns, epítomos de hemócitos devem ser melhor estudados em virtude de seu potencial uso no imunodiagnóstico, imunoproteção e avaliação terapêutica.

SUMMARY

Immunological relationship between normal triatomine cells, developmental life-cycle stages of *T. cruzi* and infected mammal hosts was investigated. Hemocytes from uninfected hematophagous vector species of triatomines (*Triatoma infestans*, *T. palidipennis*, *Dipetalogaster maximus*, *Rhodnius prolixus* and *Panstrongylus megistus*) were recognized by sera from patients and mice infected with *Trypanosoma cruzi*, by means of immunofluorescence assay (IFA), whereas hemocytes from a phytophagous bug, *Diactor billineatus* (nymphs and adults) were not recognized by the same sera. Hemocytes from *T. infestans* were partially recognized by leishmaniasis sera, but, not by samples from patients with autoimmune diseases, HIV positive sera. The treatment of hemocytes with sodium metaperiodate practically abolished the fluorescence staining, indicating the presence of carbohydrate antigens. These antigens were revealed be comprised of N acetyl-D-glucosamine, mannose and glucose and β gal, by means of fluorescent labelled lectins. Sera from chronic chagasic patients before and after the chemotherapy were reactive with hemocytes of *P. megistus* on immunoblotting, and the same sera previously absorbed with formaldehyde fixed cultured epimastigotes as well trypomastigotes. On immunoblotting a substantial number of bands diminished with sera absorption with trypomastigotes, but not with epimastigotes. Proteins of 61-70, 41-50, 31-40 and 21-30 kDa were the major proteins involved in the process of serum absorptions. After chemotherapy, protein bands of 121-130, 91-100, 81-90 and 51-60 kDa disappeared in unabsorbed sera. A group of female A/Sn mice were immunized with hemolymph free of hemocytes (MHL) and other group with hemocytes(MHC). Animals were challenged with 5×10^2 bloodstream trypomastigotes (Y strain). Parasitemia peaks of MHL and MHC groups were observed one or two days after the control group. In spite of the parasitemia for both groups was about 63% lower than the control group, the mortality for the MHL was 43%, differing from the MHC, which was 14% only. The Cytokines, $IFN\gamma$ and $TNF\alpha$, were shown to be involved in the protection of

immunized mice, and also the nitric oxide and complement dependent lytic antibodies. Hemocytes showed to play a role in the reduction of the IL-10 production, inhibiting Th2 response. Thus, hemocytes and trypomastigotes share common epitopes, and these epitopes are potentially useful for immunodiagnosis, immunoprotection, and evaluation of chemotherapeutic efficiency in Chagas' disease control.

1.INTRODUÇÃO

1.1.IMPORTÂNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS NOS DIAS ATUAIS

A melhoria das condições de Saúde Pública no Brasil e países do Cone Sul provocaram uma diminuição nos casos de doença de Chagas. Os dados anteriores à década de 90 (10 a 12 milhões de portadores) já não são mais assustadores. As informações atuais indicam que no Brasil houve uma redução de incidência da doença de 96% no que tange à população de 7 a 14 anos. Igual diminuição de casos registra-se no Paraguai, Argentina e Uruguai (WHO, 2002). Dados não oficiais estimam que no Brasil a população de pessoas infectadas seja de cinco a 6 milhões.

Tal decréscimo de casos está longe de configurar a doença de Chagas como algo menos relevante. A doença não apresenta grande mortalidade, porém uma alta morbidade. Como não se dispõe de uma droga totalmente eficaz no combate ao seu agente etiológico, tem-se um grande gasto econômico com os danos decorrentes da infecção como internações, marca-passos e outros procedimentos, além dos custos previdenciários. Os dados apontam que, no Brasil, para cada dólar americano investido em prevenção são gastos US\$ 17,50 em custos médicos. Sobreposição a esses fatores, um esforço da vigilância epidemiológica, que consiste em proceder trabalhos de borrifação e observar o reaparecimento de novos casos, para que o vetor da doença não torne a aparecer (Moncayo, 1999).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO E VETORES

A doença de Chagas é causada pelo protozoário heteroxeno *Trypanosoma cruzi*. Pertencente à família *Kinetoplastida* apresenta como característica a presença do cinetoplasto de onde emerge o flagelo. *T. cruzi* apresenta uma multiplicidade de formas, cujos nomes variam de acordo com a posição do flagelo em relação ao cinetoplasto, a saber: amastigota sem flagelo aparente; epimastigota com o flagelo anterior ao núcleo e tripomastigota com o flagelo posterior ao núcleo. Uma outra forma característica no inseto vetor é a esferomastigota (SCHAUB, 1989 a). A razão dessa multiplicidade de formas ainda não está esclarecida. Essas formas apresentam-se diferentemente no vetor e no mamífero, bem como em meios de cultura.

Em mamíferos são observadas as seguintes formas: amastigota e tripomastigota; no inseto vetor: esferomastigota, epimastigota (a forma de multiplicação) e tripomastigota metacíclico. Em meios de cultura axênicos podem-se obter epimastigotas. Em meios envelhecidos, os epimastigotas podem transformar-se em tripomastigotas metacíclicos em taxas variáveis (CHIARI, 1975). Tripomastigotas metacíclicos também podem aparecer em meios axênicos, quando se adiciona hemolinfa do vetor (SULLIVAN, 1982). Em meios de cultura celulares, observam-se as formas amastigotas e tripomastigotas.

Os vetores da doença de Chagas são insetos hemimetábolos pertencentes à família *Reduviidae* e à subfamília *Triatominae*. São hematófagos obrigatórios em todos os seus estádios ninfais e em ambos os sexos do estágio adulto. Mais de cento e quinze espécies foram descritas e

distribuídas em 15 famílias, cujo interesse epidemiológico prende-se à proximidade do domicílio e à preferência alimentar. Assim, enquanto alguns insetos apresentam um ciclo totalmente silvestre (ex. *Cavernicola pilosa*) e deixam de ter uma importância médica, outros como *Triatoma sordida* apresentam importância relativa, dado que este inseto parasita ninhos de aves. Em condições naturais, no Brasil, o ciclo da doença da Chagas alcança sucesso através da transmissão por *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*. Na América Central, um vetor de grande importância é *Dipetalogaster maximus* (BARRETTO, 1979).

O ciclo da doença está bem estabelecido desde a sua descoberta por Chagas em 1909. Por ocasião de um repasto sangüíneo, o vetor infectado pelo protozoário, através de mecanismo reflexo elimina o parasita pelas fezes. Os tripomastigotas entram ativamente na circulação e, através de complexos mecanismos de adesão e penetração, produção de transsialidase, invadem os macrófagos e as células fagocíticas, onde se transformam em amastigotas que conseguem se multiplicar por divisão binária (COSTA et al. 1999). A multiplicação celular termina por romper a célula e novos tripomastigotas caem na circulação, podendo penetrar em novas células fagocíticas ou células do músculo estriado onde novamente se transformam em amastigotas.

1.3 CICLO BIOLÓGICO DO PARASITA

O vetor, ao sugar o sangue do mamífero contaminado, adquire a forma tripomastigota que se transforma no interior do tubo digestivo em esferomastigotas. Estas formas, no interior do intestino médio, mudam para

formas epimastigotas. Uma parte da população de epimastigotas adere firmemente ao endotélio, o que garante a perpetuação da infecção no inseto. Outra parte migra para a porção terminal do reto e os parasitas transformam-se agora em tripomastigotas metacíclicos, que serão transmitidos ao hospedeiro mamífero por ocasião de outro repasto sangüíneo. Ao contrário dos tripanosomas africanos, em nenhum momento essas formas variadas invadem a hemocele.

A doença de Chagas apresenta duas fases em mamíferos: aguda e crônica. A fase aguda caracteriza-se por intensa parasitemia e aparecimento de anticorpos da classe IgM. É oligossintomática e os sintomas mais freqüentes são mal estar, febre baixa, adenopatia, hepatoesplenomegalia com raros comprometimentos do quadro neurológico, porém freqüente miocardiopatia (RASSI *et al.*, 1992). Após a fase aguda, o indivíduo evolui para a fase crônica, caracterizada pela escassa parasitemia detectada apenas por métodos de amplificação de parasitemia como o xenodiagnóstico, a hemocultura e por técnicas indiretas de pesquisa de anticorpos da classe IgG (BRENER & GAZZINELLI, 1997). A fase crônica é dividida em forma indeterminada, forma cardíaca e forma digestiva. A forma indeterminada é, segundo LARANJA (1956), uma forma laboratorial: o indivíduo apresenta sorologia positiva, porém eletrocardiograma e raio X de tórax normais, embora os exames mais sofisticados possam acusar alterações. O indivíduo pode permanecer a vida inteira nessa forma ou, então, evoluir para a forma cardíaca ou digestiva. A forma cardíaca é classificada didaticamente em cardiopatia dilatada (com o acometimento do ventrículo direito, bloqueio de ramo direito

associado ou não ao bloqueio do fascículo do feixe de His); cardiopatia arritmogênica sem necessária cardiomegalia e com bloqueio átrio-ventricular total e a cardiopatia mista com acometimento de cardiomegalia e arritmia (FRAGATA FILHO, 1995). A forma digestiva ocorre pela destruição de plexos intramurais do tubo digestivo pelo parasita pela formação de “ninhos”, produzindo os “megs” com prevalência no esôfago e cólon. O indivíduo caminha, então, para a desnutrição e constipação (KIRCHOFF, 1993).

1.4 RESPOSTA IMUNE NA DOENÇA DE CHAGAS

As maiores informações a respeito da resposta imune na doença de Chagas vêm de experimentos em animais, principalmente com o modelo camundongo. A observação em humanos é muito difícil, pois a doença na maioria dos casos é assintomática. A ativação do sistema imune começa já na fase aguda com ativação inespecífica de macrófagos e ativação de células NK acompanhada de ativação policlonal de linfócitos e hipergamaglobulinemia (MINOPRIO, 1986). Talvez esses fatos ocorram parcialmente pela presença de glicoinositolfosfolípides, desde que tais moléculas, extraídas de epimastigotas (mas que estão presentes em tripomastigotas), são capazes de estimular, de modo não específico, os linfócitos B a secretar IgM, IgG1 e IgG3 (BRENER & GAZZINELLI, 1997).

As células NK estão envolvidas na produção de interferon γ (IFN γ) que inibe a replicação do parasita tanto *in vivo* quanto *in vitro* por meio da indução da síntese de óxido nítrico por macrófagos ativados por essa citocina (TORRICO *et al.*, 1996; VESPA *et al.*, 1994). A resistência à infecção também

depende de fator de necrose tumoral α (TNF α)- (SILVA *et al.* 1995). A interleucina 12 (IL-12) é induzida por *T. cruzi* e, também, possui um efeito protetor contra o parasita (ALIBERTI *et al.*,1996). Dentro de uma resposta Th2 verificou-se que camundongos deficientes na produção de interleucina 10 (IL-10) são menos suscetíveis à infecção. Esta resistência foi revertida, quando os camundongos foram tratados com IL-10 recombinante, resultando em uma parasitemia exuberante (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996).

Conquanto a doença de Chagas tenha sido objeto de numerosos estudos, vários parâmetros ainda são desconhecidos. A relação parasita *versus* hospedeiro quer o hospedeiro seja o mamífero, quer seja o inseto, é ainda alvo de diversas dúvidas. Não se sabe, por exemplo, o porquê das diferentes formas de *T. cruzi*, tampouco a razão da diferente infectividade mostrada pelas diferentes cepas. A cura da doença ainda não foi alcançada. A profilaxia da doença limita-se ao combate ao vetor, não existindo ainda um inseticida completamente eficiente. As tentativas de vacinação mostraram-se improfícuas e, modernamente, aposta-se em vacinas de DNA (FUJIMURA *et al.*, 2001). A droga (benzonidazol-Rochagan ®) atualmente em uso, é altamente eficaz na fase aguda, não se dispondo ainda de um medicamento que seja eficiente em todas as etapas da doença. O diagnóstico sorológico da doença está bem estabelecido. Não se dispõe, entretanto, de provas parasitológicas ou que utilizem a tecnologia da biologia molecular que gozem de alta sensibilidade e, assim, atestem a presença do parasita (PORTELA-LINDOSO & SHIKANAI-YASUDA,2003).

1.5 A RELAÇÃO PARASITA-VETOR

Sabe-se que cepas de *T. cruzi* alcançam uma maior infectividade em triatomíneos dos quais se originaram, como demonstrado por infecções laboratoriais (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1982).

Ao contrário de *T. rangeli* e do tripanosomatídeo homoxeno entomofílico, *Blastocrithidia triatomae*, o desenvolvimento de *T. cruzi* está limitado ao lúmen do intestino. Alguns autores, entretanto, lançaram suposições que o parasita pudesse invadir a hemocèle. Carlos Chagas já enunciara esta hipótese em 1909, que mereceu posterior confirmação de LACOMBE (1980), o que não foi referendado por ALVARENGA & BRONFEN (1982).

Se de acordo com a maioria dos pesquisadores, *T. cruzi* não invade a hemocèle, tampouco provoca danos no intestino médio dos triatomíneos (KOLLIEN *et al.*, 1998). PICK (1952 revisto por SCHAUB 1992) não observou a cristalização da hemoglobina no estômago de triatomíneos infectados com este parasita. Efeitos contrários foram observados posteriormente por WATKINS (1969) que relatou degenerescência e lise das células do intestino em infecções por *T. rangeli* e *B. triatomae*.

Enquanto alguns autores como JUAREZ *et al.* (1970) notaram uma diminuição no tempo de evolução de ninfas a adultos em triatomíneos infectados, SCHAUB, utilizando vetores de uma cepa encontrada no Chile e triatomíneos da mesma região, não observou qualquer variação (SCHAUB, 1989b).

Os triatomíneos apresentam alta capacidade de resistência ao jejum. Em nosso laboratório, ninfas de *T. infestans* infectadas mantiveram-se sem

alimentação por cerca de dois anos. A ausência de alimentação interferiu na evolução do estágio ninfal para o estágio adulto. SCHAUB & LÖSCH (1989) observaram que a infecção de *T. cruzi* em *T. infestans* diminuía a resistência ao jejum, que variou de 3% para ninfas de 3º estágio até 17% para ninfas de 5º estágio. Observaram igualmente que a falta de hemoglobina não seria o único fator para explicar a morte dos insetos, mas sim a falta de metabólitos pelos quais o parasita e o inseto entram em competição, já que o intestino dos insetos mortos infectados continha mais sangue não digerido do que os insetos não infectados.

Tanto *B. triatomae* quanto *T. cruzi* gozam de uma preferência pelas glândulas retais para iniciar a colonização retal (SCHMIDT *et al.*, 1998). GUTIERREZ & BURGOS (1978, 1986) estudaram a histologia, a citologia e a citoquímica do intestino do triatomíneo. BURGOS *et al.* (1989) isolaram a fração do intestino rica em membrana peritrófica e adicionaram à cultura de epimastigotas, obtendo um aumento no número de tripomastigotas.

Ainda é pouco entendido o mecanismo pelo qual os epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicos. Sabe-se que esse processo é influenciado pela cepa do parasita. Quando os vetores como *D. maximus* ou *R. prolixus* foram infectados com diferentes clones de *T. cruzi*, observaram-se não só diferentes velocidades na metaciclogênese, mas também diferentes quantidades de metacíclicos (GARCIA *et al.* 1993).

GARCIA & AZAMBUJA (1991) supõem que o desenvolvimento de *T. cruzi* possa ser dependente ou até controlado por mecanismos químicos e bioquímicos do intestino do vetor. Os epimastigotas mostram-se insensíveis à

ação de proteases desencadeadas pelo repasto sangüíneo. Muito embora, os epimastigotas possam transformar-se em tripomastigotas em meios livres de sangue, sabe-se que a hemoglobina e peptídeos sintéticos contendo os resíduos 30-49 e 35-73 de α -d- globina aceleram a metaciclogênese (GARCIA *et al.*, 1995). KOLLIEN & SCHAUB (1998) observaram que a quantidade de parasitas no interior do intestino de triatomíneos é diminuída pela ausência de alimentação.

Como todos os insetos, os triatomíneos possuem mecanismos de defesa contra agentes invasores. Além das barreiras físicas do tegumento e do intestino (GILLESPIE *et al.* 1997), estes mecanismos compreendem os hemócitos e, supostamente a saliva, segundo as descobertas mais recentes (AMINO *et al.* 2001) . AMINO e seu grupo identificaram uma proteína na saliva formadora de poros que foi denominada trialisina (de *Triatoma infestans* citolisina). Esta proteína foi purificada e que exibiu atividade lítica *in vitro* contra tripomastigotas e epimastigotas de cultura, assim como contra *Escherichia coli* (Amino *et al.* 2002). Obviamente, essa descoberta levou à indagação de como os triatomíneos se infectariam com *T. cruzi*. O grupo respondeu brilhantemente à pergunta mostrando que a eliminação dos parasitas está relacionada à capacidade e o tempo de salivação em contato com o vaso sangüíneo e à ingestão de saliva junto com o repasto sangüíneo. Graças a tal processo, *T. infestans* seria um mau vetor de *T. rangeli* , contrastando com a alta suscetibilidade de insetos do gênero *Rhodnius* (Martins *et al.*, 2002).

1.6 HEMÓCITOS E *T. cruzi*

1.6.1 HEMÓCITOS

O estudo do sistema imune dos insetos iniciou-se em 1883, por KOWALEWSKY em São Petersburgo na Rússia e, em 1896, por CUÉNOT em Nancy, na França. A partir de 1920, METALNIKOW enfatizou os fatores celulares, e PAILLOT destacou os fatores humorais, dando grande impulso a esses estudos que foram interrompidos com as guerras que abalaram a Europa. A partir dos anos 60, houve uma retomada das pesquisas relativas à imunologia dos invertebrados (HOFFMANN & HOFFMANN, 1990).

Entre os mecanismos imunes dos insetos estão as células que são chamadas hemócitos que estão presentes na hemolinfa e, menos freqüentemente, aderidos à superfície de vários órgãos. BARRRACO (1982) assim define a hemolinfa:

“A hemolinfa é um tecido fluido que ocupa a hemocèle e banha os órgãos internos através de delicada e contínua membrana que os reveste. É impulsionada por um vaso condutor que percorre o corpo do inseto, cuja porção posterior é pulsátil, comparada a um coração que apresenta uma série de óstios, por onde a hemolinfa pode entrar. A porção anterior do vaso é denominada “aorta” e consiste num tubo contrátil e uniforme. A hemolinfa é encaminhada da hemocèle ao coração pelos óstios, dirige-se para a cabeça do inseto, para, em seguida, realcançar a cavidade hemocélica. (...) É um líquido claro, às vezes incolor(...) nela realizam-se todas as trocas químicas entre os vários órgãos dos insetos, como transporte de alimentos, encaminhamento de substâncias metabolizadas para excreção, recepção e distribuição de hormônios.”

A classificação dos hemócitos é muito complexa tanto pela variabilidade encontrada mesmo dentro de um mesmo gênero, quanto pelos diferentes

métodos utilizados pelos pesquisadores (RATCLIFFE & GÖTZ, 1990). Mesmo o emprego da microscopia eletrônica não dirimiu essas dúvidas. Analisando hemócitos de *P. megistus*, BARRACO & LOCH (1989) identificaram células de 9 a 21µm como coagulócitos, células que poderiam estar envolvidas em ilhas de coagulação, muito embora, como lembrado pelos autores, a hemolinfa de *P. megistus* não coagule. Entrementes, AZAMBUJA *et al.* (1991) identificaram tais células como cistócitos, pelo fato de que o fenômeno da coagulação não ocorra em triatomíneos. Estes últimos autores identificaram sete tipos de hemócitos em triatomíneos: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, coagulócitos e cistócitos, adipo-hemócitos, enocitóides. Uma breve caracterização dessas células será apresentada a seguir; os tamanhos das células são os citados por BARRACO & LOCH (1989).

- ♦ Pró-hemócitos: são células pequenas (6-14 µm), de forma arredondada ou ovalada com núcleo geralmente grande, ocupando a região central e preenchendo quase toda a célula. São consideradas *stem cells* (LACKIE, 1988) e dariam origem a todas as demais células.
- ♦ Plasmatócitos: são maiores (8-45µm) de morfologia extremamente variada. Quando observados ao microscópio de fase entre lâmina e lamínula, costumam apresentar formas variadas, o que tem gerado problemas com a sua classificação. O núcleo é geralmente central e pode apresentar nucléolos e massas de condensação cromatínica.
- ♦ Granulócitos: mostram tamanhos variados (8-45µm). Apresentam grânulos com estruturação definida ou não. As análises histoquímicas mostram que a maioria dos grânulos contém sialomucinas, glicoproteínas e

mucopolissacárides. Essas células emitem pseudópodos. Junto com os plasmatócitos são os principais hemócitos envolvidos no processo de fagocitose, embora a razão do reconhecimento de materiais estranhos não esteja ainda esclarecida. (DUNN, 1986).

- ◆ Coagulócitos ou cistócitos: foram observados em hemolinfa de espécies do gênero *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *D. maximus*. Sua classificação é muito controversa. BARRACCO, em 1987, classificara estas células como enocitóides. Em 1989, com o auxílio da microscopia eletrônica classificou-as como coagulócitos. AZAMBUJA *et al.* (1991) preferem classificar tais células como cistócitos e sustentam que a manipulação indevida pode provocar sua desintegração. De acordo com os últimos autores, essas células mostraram-se não estáveis, quando observadas em *T. infestans*. São muito semelhantes a plasmatócitos e possivelmente estão relacionados àquelas células.
- ◆ Adipo-hemócitos: são células grandes (24 a 90µm segundo Barraco & Loch; 24 a 60µm segundo AZAMBUJA *et al.*). Coram-se pelo Sudam Black.
- ◆ Enocitóides apresentam formas arredondadas, ovais ou alongadas, nunca emitindo pseudópodos com tamanho de 18 a 34 µm. O núcleo é menor do que o de outros hemócitos.
- ◆ Células gigantes: são células observadas por AZAMBUJA *et al.* em *Rhodnius* e *T. infestans*. Talvez estejam relacionadas a plasmatócitos grandes e representem uma grande célula fagocítica para a ingestão de células velhas ou restos celulares.

1.6.2 REAÇÕES IMUNOLÓGICAS ENVOLVENDO HEMÓCITOS

Os hemócitos estão envolvidos em reações de fagocitose, de formação de nódulos e de encapsulação.

Alguns dos estudos sobre imunidade dos insetos foram realizados com *T. rangeli*. Este parasita atinge a hemocèle, podendo se desenvolver tanto na hemolinfa, quanto dentro de hemócitos. Na hemolinfa, os epimastigotas dividem-se para formar tripomastigotas finos ou, então, epimastigotas. Dentro dos hemócitos, tripomastigotas e epimastigotas diferenciam-se em esferomastigotas que dão origem a tripomastigotas metacíclicos, rompendo os hemócitos (CUBA, 1975).

Inoculando *T. rangeli* em insetos não suscetíveis como *Periplaneta americana* (barata) e *Schistocerca gregaria* (locusto), TAKLE (1988) pôde observar a formação de nódulos e agregados multicelulares quatro horas após o inóculo. Quando a infecção se deu em *R. prolixus*, a formação de nódulos deu-se depois de dias e, quando os tripanosomas eram abundantes. Talvez essa diferença deva-se à carga eletrostática dos hemócitos (TAKLE & LACKIE, 1987).

In vitro verificou-se que aglutininas da hemolinfa de *R. prolixus* tinham a capacidade de aglutinar epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) e de *T. rangeli* (RATCLIFFE *et al.* 1996). MELLO *et al.* (1996) inocularam três cepas de *T. cruzi* na hemocèle de *R. prolixus*, bem como infectaram os insetos por via oral. As cepas Dm28c e CL e Y sobreviveram no estômago do triatomíneo em altas taxas até 20 dias, ainda que os parasitas da cepa Y tenham sobrevivido em números menores. Entretanto, quando os parasitas foram inoculados na

hemocèle, apenas os parasitas da cepa CL foram observados na hemolinfa até 96 horas de observação.

MELLO *et al.* (1999), posteriormente, mostraram que, *in vitro*, as monocamadas de hemócitos de *R. prolixus* eram capazes de induzir a formação de grumos tanto de *T. cruzi* quanto de *T. rangeli*, atribuindo essa capacidade aglutinante a uma lectina presente na superfície dos hemócitos com atividade de quinase.

Se a hemolinfa parece ter propriedades para controlar o desenvolvimento do parasita, por outro lado ela parece ajudar o desenvolvimento de aceleração da metaciclogênese. PEREIRA *et al.* (1981) já haviam demonstrado que lectinas no tubo digestivo e na hemolinfa de *R. prolixus* poderiam estar envolvidas no desenvolvimento do parasita. ISOLA *et al.* (1983) mostraram que a hemolinfa de *T. infestans*, com hemócitos ou livre destas células, poderia favorecer a metaciclogênese.

Um dos mais importantes mecanismos imunes dos insetos é o fenômeno da melanização que é a formação do pigmento melanina. A melanina é formada a partir da fenoloxidase, que catalisa a oxidação da tirosina para 3,4 di-hidroxifenilalanina convertida em sua forma ativa pela reação em cascata de serina proteases (SÖDERHALL *et al.*, 1990). Tanto os granulócitos quanto os enocitóides possuem enzimas relacionadas à fenoloxidase que podem agir nas respostas de defesa (DUNN, 1986)

MELLO *et al.* (1995) injetaram *T. rangeli* e *T. cruzi* (cepa Dm 28c) diretamente na cavidade torácica de *R. prolixus* e observaram a ativação do sistema de profenoloxidase (PPO). Embora em termos percentuais a ativação

da PPO por *T. cruzi* tenha sido mais alta do que a de *T. rangeli*, os autores não consideraram tal fato tão significativo, pois o número de parasitas de *T. cruzi* era bem menor do que o número de formas de *T. rangeli*. Importante no estudo, entretanto, é o fato de que o sistema pode ser ativado e que pode ter algum papel no extermínio dos parasitas da hemolinfa.

ALVARENGA *et al.* (1990) observaram o processo de encapsulação realizado por hemócitos de *D. maximus*. Os autores observaram a encapsulação de material biológico (grãos de pólen, pérolas de poliacrilamida revestidas com PPD e pérolas de polimetacrilato revestidos com *T. cruzi*) injetado na hemocele. No entanto, o processo não foi observado, quando as pérolas (estéreis) foram inoculadas sem os antígenos, o que leva a supor que o processo de encapsulação se dá apenas diante de um possível patógeno.

1.7 REAÇÕES CRUZADAS E *T. cruzi*

A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada por uma imunossupressão com ativação policlonal (GRAUERT *et al.* 1993). O indivíduo, ao mesmo tempo em que deixa de responder a antígenos específicos, responde amplamente a muitos antígenos, razão pela qual MINOPRIO (2001) chama esta resposta de “panclonal”. Um dos exames indiretos na fase aguda da doença de Chagas é dosagem de anticorpos heterófilos através da primeira fase da reação de Paul Bunnell-Davidsohn, onde se verifica a presença de anticorpos anti-hemácias de carneiro da classe IgM em níveis aumentados (MUNIZ & SANTOS, 1950).

Na fase crônica da doença, utilizam-se antígenos específicos. O diagnóstico sorológico da doença de Chagas inicialmente foi feito por meio da reação de fixação de complemento utilizando como antígeno extratos dos parasitas obtidos de tecidos e posteriormente extratos de tripomastigotas. (CAMARGO & TAKEDA, 1979). A reação de fixação de complemento e todas as demais técnicas que se desenvolveram a seguir têm utilizado epimastigotas obtidos de cultura acelular. Embora os epimastigotas não parasitem mamíferos, inúmeras vantagens advinham dessa escolha. Essas formas são conseguidas em grande número e não são infectantes, uma vez que os mamíferos conseguem lisar essa forma através da via alternativa do complemento (NOGUEIRA, 1975). Essas reações sorológicas utilizadas na rotina (o que veio a ser chamado sorologia convencional) mostraram-se altamente eficientes, com altíssima sensibilidade e especificidade. Sabe-se, entretanto, que há diferença entre as várias formas evolutivas do parasita em relação ao diagnóstico. Os amastigotas por exemplo apresentam uma reatividade maior e combinando-se tais formas antigênicas com conjugado anti-IgA tem-se um excelente marcador de forma digestiva (PRIMAVERA *et al.*, 1990; MATSUMOTO *et al.* 1993). Estas reações, entretanto, falham no diagnóstico de pacientes submetidos à quimioterapia, pois oferecem resultados oscilantes ou fracamente positivos .

Além da ativação policlonal da fase aguda e dos anticorpos específicos desenvolvidos na fase aguda e na fase crônica, muitos anticorpos auto-ímmes foram detectados nos soros de portadores da doença de Chagas. COSSIO *et al.*, em 1974, já haviam verificado anticorpos que reconhecem estruturas

presentes no endocárdio, vasos e músculo esquelético. KHOURY *et al.* (1979) verificaram a ocorrência de anticorpos anti-nervos periféricos e BACH-ELIAS *et al.* (1998) observaram a presença de auto-anticorpos contra os auto-antígenos Sm e RNP que estão envolvidos em diversas doenças reumáticas imunes, incluindo o lúpus eritematoso e as doenças mistas do tecido conjuntivo (TAN 1989). Algumas dessas respostas auto-imunes foram explicadas pelos autores como um mimetismo entre proteínas do hospedeiro e do parasita, que poderiam induzir a produção de anticorpos por uma reação cruzada (AVILA, 1992)

1.8 PROTEÍNAS EXPRESSAS POR TRIPOMASTIGOTAS

Os trabalhos desenvolvidos por KRETTLI e seu grupo (KRETTLI & BRENER, 1976, KRETTLI *et al.*, 1982, KRETTLI & BRENER, 1982) mostraram que pacientes chagásicos e animais cronicamente infectados desenvolvem anticorpos, que colaboram na destruição de tripomastigotas por meio da via alternativa do complemento. Estes anticorpos, que foram chamados de anticorpos líticos, estão ausentes em pacientes tratados com sucesso ou em animais imunizados com tripomastigotas fixados pelo glutaraldeído ou extratos de epimastigotas.

Durante algum tempo acreditou-se que apenas tripomastigotas poderiam induzir desenvolver tais anticorpos. TAKEHARA *et al.* (1988) mostraram que tanto tripomastigotas quanto epimastigotas poderiam ser reconhecidos por anticorpos líticos. SEGURA *et al.* (1986), trabalhando com a fração flagelar de

epimastigotas da cepa Tulahuén, obtiveram anticorpos monoclonais que reconheciam glicoproteínas de 90 , 85 e 40 kDa que induziam lise mediada por complemento. RUIZ *et al.* (1990) desenvolveram anticorpos monoclonais que reagiram com glicoproteínas de 15 e 48 kDa. A imunização de camundongos com esses antígenos conferiu proteção parcial de 60 %.

Muitas proteínas de tripomastigotas foram identificadas como alvos potenciais de anticorpos líticos. Uma das mais importantes é a GP 160 kDa que mostrou induzir anticorpos líticos e interfere na formação da C3 convertase. Os epimastigotas produzem níveis muito baixos desta proteína reguladora de complemento (CRP). Quando os epimastigotas foram transfectados com esta proteína, estas formas que, normalmente, são suscetíveis à lise mediada por complemento, tornaram-se resistentes (NORRIS ,1998).

O grupo de KIPNIS (JOINER *et al.* 1988, KIPNIS *et al.*,1991, TAMBOURGI *et al.*,1993) identificou uma glicoproteína de 87 a 93 kDa que foi denominada T-DAF por apresentar funções análogas ao DAF humano. T-DAF impede a formação da C3 convertase tanto na via clássica quanto na via alternativa pela ligação a C3b e C4b. FISCHER *et al.*(1988) isolaram uma glicoproteína de peso molecular entre 58/68 kDa que inibe apenas a C3 convertase da via alternativa, por meio de uma interação com o fator B.

Entre as proteínas de tripomastigotas, ALMEIDA *et al.* (1997) isolaram uma glicoproteína de 74 kDa semelhante à mucina (*mucin- like*), que contém epítomos α galactosil presentes em cadeias de oligossacarídeos e são lisadas por anticorpos líticos.

Uma variedade de proteínas de 72 a 160 kDa foi isolada por UMEZAWA *et al.* (1993), proteínas essas que participam de um epítopo comum reconhecido por anticorpos líticos. Verificou-se, ainda, que uma proteína de 24 kDa, comum a todas as formas evolutivas de *T. cruzi* se liga a íons Ca^{2+} também é capaz de induzir a lise de formas tripomastigotas na presença de complemento (TAIBI *et al.*, 1995).

YOSHIDA (1986) encontrou proteínas de 77kDa, 82kDa e 88kDa que foram lisadas por soros de camundongos infectados com tripomastigotas, mas não por soro de camundongos imunizados com epimastigotas.

LANAR & MANNING (1984) identificaram proteínas de superfície de *T. cruzi* nas suas formas evolutivas. Por meio de imunoblot com soro de camundongos infectados, uma proteína de 90 kDa foi encontrada em tripomastigotas sangüícolas e de cultura, assim como em amastigotas, mas não em epimastigotas ou tripomastigotas metacíclicos. Os tripomastigotas apresentam proteínas de 135, 90, (esta última em diversos pontos isoelétricos) 68, 58 e 51 kDa. Os tripomastigotas de cultura, além das proteínas de 135 e 90, apresentam proteínas de 86 e 82 kDa, estas últimas correndo em pontos isoelétricos de 5,8 e 6,6. Os tripomastigotas metacíclicos apresentam proteínas de 85, 77, 76 (estas duas últimas em pontos isoelétricos de 5,6 a 6,9), 72, 66,55 e 50 kDa. Os epimastigotas apresentam as proteínas de 77, 76, 72, 57, 55, 43 e 33 kDa. Os amastigotas apresentam menos proteínas: 71, 68 e 62 kDa. Mostraram-se dominantes as proteínas de 90 kDa e a proteína de 72 kDa.

1.9 ESTRUTURAS DE TRIATOMÍNEOS RECONHECIDAS POR *T.cruzi*

Epítomos na superfície do intestino médio e posterior de *T. infestans* foram reconhecidos por soros de pacientes chagásicos (GUTIERREZ *et al.* 1991). Estes antígenos foram reconhecidos mediante técnicas de imunocitoquímica utilizando-se o soro de pacientes como primeiro anticorpo e proteína A conjugada com ouro coloidal como segundo anticorpo. Os autores levantaram a hipótese de que o parasita teria incorporado antígenos do vetor, que seriam reconhecidos pelo sistema imune do pacientes.

NASCIMENTO *et al.* (2001) verificaram a presença de altas taxas de anticorpos contra componentes de glândulas salivares e saliva em soros de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos, que viviam em áreas infestadas. Os autores compararam estes dados com soros de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos que viviam em áreas livres de triatomíneos. Os autores sugerem que a exposição a antígenos da glândula salivar em várias ocasiões (o momento da picada) teria originado estes anticorpos.

Afora o trabalho de GUTIERREZ *et al.* e o de NASCIMENTO *et al.* acima citados, nenhum outro autor estudou a interação entre soros de pacientes chagásicos e componentes de triatomíneos. RIBEIRO DOS SANTOS *et al.* (1990) verificaram que hemócitos de *R. prolixus* apresentavam receptores para a fração Fc de anticorpos anti-hemácias de carneiro. Estes receptores, entretanto, estavam ausentes em fitófagos. Os autores se interrogam sobre qual o papel desses receptores na fagocitose e se tais receptores teriam um papel na hematofagia.

Desde que a adição de hemolinfa ao meio de cultura pode induzir a produção de formas metacíclicas e o intestino de triatomíneos possui estruturas que reconhecem anticorpos dos soros de pacientes chagásicos, pareceu interessante verificar se os hemócitos de triatomíneos teriam receptores para Fab de anticorpos presentes nos soros de pacientes chagásicos. Este dado parece interessante, pois, desde que não foi confirmada a invasão de *T. cruzi* na hemocele de triatomíneos, a hipótese de incorporar antígenos comuns seria remota.

2.OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as possíveis interações imunológicas entre componentes naturais do triatomíneo e anticorpos originados pela infecção por *T. cruzi* na doença de Chagas crônica.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar se hemócitos de triatomíneos possuem receptores para soros de pacientes chagásicos.
2. Verificar se essa interação se dá entre várias espécies hematófagas.
3. Verificar, ainda, se essa interação é restrita às espécies hematófagas ou se é extensiva a outras espécies.
4. Determinar quais as proteínas são responsáveis por tal interação.
5. Determinar, por meio de ensaios de imunização de animais, se os hemócitos compartilham epítomos comuns com tripomastigotas.
6. Avaliar a resposta imune desenvolvida pela imunização de animais através da dosagem de citocinas, dosagem de óxido nítrico e lise mediada por complemento.
7. Verificar se a interação entre soros de indivíduos infectados se restringe aos hemócitos ou pode ser estendida a outros componentes biológicos, no caso a saliva.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SOROS

3.1.1.SOROS HUMANOS

O sangue de pacientes chagásicos crônicos matriculados no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia foi colhido antes e depois do tratamento específico. Estes soros acham-se armazenados na soroteca do laboratório de Xenodiagnóstico daquele hospital. Após a coleta de sangue, os soros são separados e congelados a -20°C. São descongelados para a realização dos exames de diagnóstico e avaliação do tratamento. Em seguida, uma alíquota é retirada e armazenada novamente a -20°C para possíveis contra-provas. Os soros colhidos após 1996, tiveram consentimentos prévios dos pacientes, que assinaram formulário pré-estabelecido pela Comissão de Ética da Instituição (Anexo 1). Foram utilizadas 52 amostras de pacientes chagásicos sendo 26 antes do tratamento etiológico e 26 após o tratamento.

O diagnóstico dos pacientes foi baseado em reações sorológicas convencionais (hemaglutinação indireta e/ou aglutinação direta, imunofluorescência indireta anti IgG com epimastigotas fixados com formol), tendo pelo menos uma prova parasitológica positiva de xenodiagnóstico ou hemocultura e reação de imunofluorescência indireta *in situ*. Os soros de pacientes tratados foram submetidos às mesmas provas. Os soros de indivíduos não chagásicos que funcionaram como controles negativos foram coletados de atletas que se submeteram a um “check-up” e foram submetidos às mesmas provas sorológicas além da reação de ELISA. Como foram coletados antes de 1996 não tiveram necessidade do consentimento prévio.

Os soros de pacientes com leishmaniose tegumentar foram obtidos do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo na pessoa da Dra. Beatriz Julieta

Celeste do. Os soros de pacientes portadores de infecção com HIV foram obtidos do Hospital Menino Jesus na pessoa da Dra. Maria Aparecida Daher. Os soros de portadores de doenças auto-imunes faziam parte da nossa soroteca, quando realizávamos exames para FAN no laboratório de Xenodiagnóstico da Seção Média de doenças Infecciosas e Autoimunes do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Todos os soros foram armazenados a -20° C no Laboratório de Xenodiagnóstico. Os títulos dos soros e demais informações sobre características e data de coleta acham-se dispostos no Anexo 2.

3.1.2.SOROS DE CAMUNDONGOS

Os soros de camundongos chagásicos crônicos foram obtidos inoculando-se camundongos Swiss com 10 formas de *T. cruzi* cepa Y. No 12° dia após o inóculo, foi examinado o sangue de cada animal colhido da veia caudal para certificar-se da presença de parasitas. Os animais foram anestesiados com éter etílico e o sangue colhido por punção cardíaca. O sangue foi levado a coagular e o soro resultante acondicionado em microtubos de polipropileno e armazenados a -20°C .

Os soros de camundongos A/Sn utilizados nos experimentos de imunização foram coletados da mesma forma nos dias indicados no item 3.10.2.

3.2. ANIMAIS

3.2.1.CAMUNDONGOS

Camundongos Swiss não isogênicos foram obtidos do biotério do Instituto Adolfo Lutz e mantidos em gaiolas plásticas com água e comida *ad libitum* à temperatura de 22-24°C. Camundongos A/Sn isogênicos foram obtidos do biotério do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e mantidos nas mesmas condições. Em ambos os casos, utilizaram-se fêmeas, pela sua maior resistência à infecção

com *T. cruzi*. Todos os animais foram criados de acordo com as normas internacionais (COBEA 1991, NIH 1995).

3.2.2. TRIATOMÍNEOS

3.2.2.1 HEMATÓFAGOS

Os triatomíneos foram mantidos no insetário do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia em cristalizadores de vidro a 28°C e 70% de umidade e alimentados com sangue de aves duas vezes por semana. A limpeza dos cristalizadores e coleta de ovos era semanal. As seguintes espécies foram utilizadas: *Triatoma infestans*, *Triatoma pallidipennis*, *Dipetalogaster maximus*, *Panstrongylus megistus*. As espécies de *Rhodnius prolixus* foram obtidas de colônias mantidas no insetário do Instituto Adolfo Lutz sob as mesmas condições de temperatura e umidade. Os insetos foram tratados de acordo com as normas internacionais acima citadas.

3.2.2.2 FITÓFAGOS

Foram utilizados fitófagos, ninfas de 5º estágio e adultos, de *Diactor billineatus*, um hemíptero fitófago comum em plantações de *Passiflora incarnata* (maracujá). Estes insetos foram coletados no município de Eldorado Paulista (região do vale da Ribeira) pelos técnicos de apoio à pesquisa Rui Larosa e Carlos Roberto Elias e identificados pela pesquisadora Helena Hilomi Taniguchi do Instituto Adolfo Lutz .

3.3. CEPA DE *Trypanosoma cruzi*

Todos os ensaios utilizando-se formas de *T. cruzi* fizeram uso da cepa Y isolada de um caso humano por SILVA & NUSSENZWEIG (1953) e mantida desde então em diferentes laboratórios. Em camundongos mostra-se como uma cepa reticulotrópica, com predominância de formas finas, pico parasitêmico no sétimo dia de infecção e mortalidade de 100% (BRENER, 1965).

3.3.1. TRIPOMASTIGOTAS DE CULTURA CELULAR

Tripomastigotas foram obtidos de cultura de células, cultivo este realizado gentilmente pela Dra Marilda Savoia do Nascimento no laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os parasitas foram cultivados em células LLC-MK2 (células de epitélio renal de macaco Rhesus – *Macaca mullata* – (HULL *et al.*, 1956) adquiridas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

As células foram mantidas em meio RPMI (Sigma Chemical Co, EUA 1640 “Automod”) suplementado com L-glutamina 2mM (Sigma Chemical Co, EUA) e adicionado de soro fetal bovino a 10% (Laborclin, Brasil) a temperatura de 37°C em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂. O repique das células foi realizado em média a cada cinco dias.

As células LLC-MK2 foram infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, provenientes do sobrenadante de outras garrafas com células previamente infectadas. A infecção original foi realizada com tripomastigotas sangüíneos provenientes de camundongos infectados. Para a infecção celular foi utilizado o meio RPMI suplementado com soro fetal bovino 2% contendo 40µg/mL de gentamicina.

As formas tripomastigotas cultivadas no sobrenadante de cultura de células foram coletadas por centrifugação a 2300g em centrífuga Eppendorf (mod 5804, Hamburgo, Alemanha) por 15 minutos a 4°C. O sedimento obtido foi lavado com PBS (solução salina tamponada com fosfato de sódio 0,01M pH 7,2) sob as

mesmas condições. Ao sedimento foi adicionado PBS com formol (Merck) a 2%. Após cerca de 15 minutos, examinou-se se os parasitas estavam devidamente fixados. Os parasitas foram lavados para retirada do formol e o sedimento ressuspenso em PBS pH7,2. Uma alíquota foi retirada e as células contadas em hemocítômetro de Neubauer e concentração ajustada para 20×10^6 parasitas /mL. A suspensão foi dividida em alíquotas e congelada até o momento de uso.

3.3.2.TRIPOMASTIGOTAS SANGÜÍNEOS

Os tripomastigotas sangüíneos foram obtidos de sangue de camundongos A/Sn no pico da parasitemia. O sangue foi coletado de animais previamente anestesiados e transferido para um tubo contendo citrato de sódio a 3,8% (Merck, Alemanha). Após a centrifugação por 3 minutos a 1000g em centrífuga Sorvall (modelo Biofuge-Primo R, Hanau, Alemanha) o sangue foi incubado por 15 minutos a 37°C e o plasma recolhido para a contagem de tripomastigotas em hemocítômetro de Neubauer .

3.3.3.EPIMASTIGOTAS

Epimastigotas foram obtidos de meio de cultura axênico, meio LIT, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Laborclin, Brasil) e glicose 5% (Synth, Brasil) (CAMARGO,1967). Na fase exponencial do crescimento (5 a 7 dias), os parasitas foram submetidos a centrifugação a 1500g em centrífuga refrigerada Sorvall por 15 minutos a 15°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com PBS pH 7,2 a 1500g por 15 minutos a 15°C. O processo foi repetido. Adicionou-se, então, ao sedimento solução de PBS-formol a 2% deixando-se em repouso por 10 minutos. A fixação dos parasitas foi observada sob microscopia de fase e os parasitas foram então novamente lavados com PBS sob as mesmas condições de tempo e temperatura. A concentração foi ajustada para 20×10^6 parasitas/mL e a suspensão repartida em alíquotas e congeladas até o momento do uso.

3.4.REAÇÃO DE LISE MEDIADA POR COMPLEMENTO

A reação de lise mediada por complemento foi realizada de acordo com a técnica descrita por Levy *et al.* (1988) com as modificações estabelecidas em PRADO JR. (1999). Camundongos A/Sn de cerca de 15g foram inoculados com 100.000 formas de tripomastigotas/0,2mL. No mesmo dia ou no dia seguinte, foram imunossuprimidos com injeção de ciclosfofamida(Genuxal ® Brasil) na dose de 200mg/kg de peso. No pico parasitêmico, os animais foram anestesiados e mortos e o sangue colhido em tubo contendo pérolas de vidro. O sangue foi centrifugado a 1500g por 3 minutos e incubado por 15 minutos a 37°C. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado, para evitar contato com as hemácias e lavado com meio Eagle (Instituto Adolfo Lutz) suplementado com soro fetal bovino a 10% (Laborclin, Brasil) por 15 minutos a 1500g. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento novamente lavado da forma acima descrita. O sobrenadante foi desprezado, e do sedimento reconstituído com 1mL de meio Eagle, uma alíquota foi retirada para a contagem em hemocitômetro de Neubauer. A concentração foi ajustada para 5×10^6 parasitas /mL. Os soros a serem testados foram inativados a 56°C. Em uma placa de poliestireno de 96 orifícios de fundo em “U” ou fundo chato, 50µL de soro diluído a 1:4 foram incubados com 100µL da suspensão de parasitas a 37°C por 30 minutos. Após este período, da mistura incubada retiraram-se duas alíquotas de 50µL às quais adicionou-se 50µL de soro humano normal como fonte de complemento. O número total de parasitas por amostra foi contado imediatamente após a adição de complemento (t_0) e novamente após 60 minutos de incubação a 37°C (t_{60}). A porcentagem de lise foi obtida por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ lise} = \frac{\text{número de parasitas no } t_0 - \text{número de parasitas no } t_{60}}{\text{número de parasitas no tempo zero}} \times 100$$

3.5 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA *In situ*

A reação de imunofluorescência *in situ* foi realizada de acordo com a técnica descrita por LEVY *et al.* (1996). Em resumo, tripomastigotas obtidos de camundongos imunossuprimidos foram colhidos com citrato a 3,8% e submetidos a duas lavagens com PBS pH 7,2 nas condições de rotação e tempo acima especificadas. Uma suspensão de 18×10^6 formas/mL foi obtida em PBS pH 7,2, e 3 μ L foram depositados sobre as áreas pré-demarcadas de lâminas de imunofluorescência. Após cerca de cinco minutos, uma gota de solução de glutaraldeído a 0,025% em PBS pH 7,4 foi depositada sobre cada área antigênica. Cerca de três a cinco minutos depois, a lâmina foi lavada em PBS, e o excesso de parasitas foi retirado e sobre a área, onde estavam os parasitas fixados, colocou-se uma gota de soroalbumina bovina a 1% (Laborclin, Brasil) por 15 minutos. Uma nova gota foi colocada e, então, foi adicionada uma gota de glicina a 0,1M (Synth, Brasil). As lâminas foram mantidas em repouso por cerca de 30 minutos, quando então se colocou uma nova gota de glicina. Após 30 minutos, as lâminas foram lavadas com PBS pH 7,2. Após as lâminas estarem secas, estas foram embrulhadas com papel de seda e papel alumínio e acondicionadas a -20°C até o momento de uso. No momento da reação as lâminas eram lavadas com água destilada para retirar o excesso de sais da solução salina fosfatada.

3.6 HEMÓCITOS

3.6.1 HEMÓCITOS DE HEMATÓFAGOS

Os hemócitos foram obtidos de ninfas de 5^o estágio das espécies anteriormente citadas. Antes da coleta de hemolinfa, os insetos foram alimentados e o tempo para a realização da coleta dependeu da espécie e das condições climáticas. Assim, à temperatura de $20-25^{\circ}\text{C}$ a coleta de hemolinfa foi realizada 48

a 72 horas após a alimentação, quando as espécies eram do gênero *Triatoma*. Espécies maiores como *P. megistus* e *D. maximus* foram submetidas à coleta 72 ou 120 horas após a alimentação. Tal alteração de protocolo se deveu ao objetivo de se obter a maior quantidade de hemolinfa, sem contaminação sangüínea. A obtenção das células foi realizada conforme a metodologia preconizada por AZAMBUJA *et al.* (1991) com modificações. Em resumo, após leve massagem do abdômen, uma ou mais patas do inseto foi amputada e a hemolinfa foi coletada com pipeta automática e colocada em um microtubo de polipropileno estéril cujo conteúdo variou conforme o destino das células: imunofluorescência ou reação de imunoblot.

Em nossas preparações de hemócitos de *T. infestans* foram comuns os plasmatócitos em metáfase. Como o objetivo deste estudo, não foi a classificação dos diferentes tipos de hemócitos de triatomíneos, classificamos os coagulócitos como plasmatócitos, uma vez que o processo de fixação alterava a forma dessas células. Da mesma maneira, adipo-hemócitos foram classificados como granulócitos degenerados. Demais a mais tais células ocorrem em pequeno número e a mudança na classificação não alteraria o resultado obtido.

3.6.2. OBTENÇÃO DE HEMÓCITOS PARA A REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para a reação de imunofluorescência, 400 a 800 μ L da suspensão de hemolinfa foram colocados em um tubo de polipropileno de 1,5 mL contendo 100 μ L de glutaraldeído grau I a 0,025% (Sigma Chemical Co, EUA) em PBS pH 7,4. A suspensão foi centrifugada a 2350 g 20°C em centrífuga refrigerada (Hermle, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o sedimento reconstituído com PBS pH 7,2 contendo soroalbumina bovina a 1%, de modo a bloquear os radicais aldeídicos. A concentração foi ajustada para 10^4 células/mL e 3 μ L dessa

suspensão foram colocados sobre as áreas pré-demarcadas de lâminas de imunofluorescência.

Os hemócitos de *R. prolixus* foram colhidos da mesma forma, porém a suspensão de hemolinfa foi colocada em um tubo de 1,5mL contendo solução anticoagulante (ácido etilenodiaminotetraacético 0,01M, glicose 0,1M, cloreto de sódio 0,062M, citrato trissódico 0,03M e ácido cítrico 0,026M pH 4,6) (Richards *et al.*, 1990), desde que o procedimento anterior provocava a ruptura das células. Após a centrifugação, as células foram fixadas com PBS/formol a 1% e distribuídas como descrito acima.

Após a secagem das lâminas, a temperatura ambiente, estas foram acondicionadas em cubas porta-lâminas e congeladas a -20°C até o momento do uso. Nunca se utilizaram lâminas com mais de sete dias de preparação.

3.6.3. HEMÓCITOS DE FITÓFAGOS

Para testar se o reconhecimento celular era restrito à família Reduviidae, utilizaram-se hemócitos do fitófago *Diactor billineatus*. Os hemócitos de *D. billineatus* foram utilizados apenas na reação de imunofluorescência. Como este inseto oferece pouca quantidade de hemolinfa, as células foram colocadas diretamente na lâmina de imunofluorescência e secas a temperatura ambiente. Após a amputação da pata, os animais foram imediatamente sacrificados. Antes do uso, as lâminas foram tratadas com acetona P.A. gelada por 10 minutos para fixação das células. A acetona remanescente foi desprezada. As lâminas foram secas a temperatura ambiente e acondicionadas em cubas porta-lâminas e congeladas a -20°C até o momento do uso. Observou-se o mesmo prazo de uso que as lâminas de hemócitos de hematófagos, ou seja, sete dias.

3.6.4.OBTENÇÃO DE HEMÓCITOS PARA A TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS PAGE) E IMMUNOBLOT

Para a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecilsulfato de sódio, os hemócitos foram colhidos como descrito acima e a suspensão de hemolinfa foi colocada em um microtubo de polipropileno de 1,5 mL contendo 200µL de solução anticoagulante gelada, para evitar os fenômenos de melanização e manter os hemócitos em estado quiescente.

A suspensão de hemolinfa foi centrifugada a 2350g a 15° em centrífuga refrigerada Sorval (Alemanha) por 7 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento novamente lavado em solução fisiológica 0,85%. Uma alíquota foi retirada para contagem em hemocitômetro de Neubauer. O sedimento que continha os hemócitos foi ressuspenso em água destilada estéril e a solução resultante submetida à ruptura em processador ultrasônico em banho de gelo (Ultrasonic Power Unit MSE , EUA) 20 kHz 1,4 mA por seis períodos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos. Após este período, a preparação foi visualizada em microscópio óptico comum a 40x, para verificar a presença de células íntegras. Em caso positivo, a amostra era submetida a um novo processo de ruptura.

Dosou-se, então, a quantidade de proteínas do extrato de hemócitos, utilizando-se o método de Lowry (LOWRY *et al.* 1951).

3.7 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HEMÓCITOS

Para a reação de imunofluorescência indireta os soros humanos foram diluídos seriadamente de 1:10 até 1:160 em PBS pH 7,2. Os soros de

camundongos, por apresentar reatividade mais baixa foram diluídos em série de 1:4 até 1:64. Os soros foram incubados com os hemócitos fixados nas lâminas de imunofluorescência por 30 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas três vezes por cinco minutos cada em jarras de Coplin e secas com jato de ar. Adicionou-se, então, o conjugado específico anti-IgG, procedendo-se a uma nova incubação por 30 minutos a 37°C. As lâminas foram novamente lavadas três vezes por cinco minutos cada e secas com jato de ar e finalmente montadas com glicerina tamponada. As preparações foram examinadas em microscópio de epi-iluminação Zeiss munido de lâmpada de halogênio com objetiva de 40 x e ocular de 10x.

3.8. INVESTIGAÇÃO DE CARBOIDRATOS

3.8.1. TRATAMENTO DE HEMÓCITOS COM PERIODATO DE SÓDIO

Para investigar se carboidratos eram responsáveis pela interação dos soros com os hemócitos, estas células de *T. infestans* e de *D. billineatus* foram tratados com metaperiodato de sódio a 10mM por 30 minutos no escuro em banho de gelo, de acordo com a técnica descrita por ABRAHAM *et al.* (1991) modificada. As células foram lavadas com PBS por cinco minutos e com PBS-BSA (soro albumina bovina) a 5% por mais 5 minutos. O sedimento foi reconstituído com PBS-BSA e lâminas de imunofluorescência foram preparadas com estas células. Antes do uso, as lâminas foram tratadas com acetona P.A. gelada por 10 minutos para fixação das células.

3.8.2 IDENTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR MEIO DE LECTINAS FLUORESCENTES

Para verificar a presença de carboidratos na superfície de hemócitos utilizou-se o método descrito por MIRANPURI & KACHATOURIANS (1993) com modificações.

Uma lâmina de microscópio foi dividida em dois lados. Duas coleções de suspensão de hemolinfa contendo hemócitos foram obtidas de 5 insetos. Uma parte foi centrifugada e 15µL de hemolinfa total foram colocados em um lado da lâmina de microscópio e, no outro lado, 15µL da suspensão de hemócitos. Esta metodologia permite verificar se a ligação com a lectina é devida à célula ou a algum açúcar presente na hemolinfa. Deixou-se que os hemócitos aderissem por 10 minutos e, em seguida, foram fixados com acetona gelada P.A. por mais 10 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS pH 7,2 e tratadas com a lectina conjugada com isotiocianato de fluoresceína diluída em PBS-azul de Evans a 10mg%. Foram utilizadas as seguintes lectinas (Sigma, EUA) : lectina de *Triticum vulgaris* com afinidade para resíduos de N acetil β D- glicosaminil e oligômeros de N acetil β D- glicosamina; lectina de *Canavalia ensiformis*, concanavalina A com afinidade para resíduos α D- manosil e α D glicosil; lectina de *Arachis hipogae*, com afinidade para resíduos β-galactosil de ácido N-acetil neuramínico; lectina de *Bandeiraea simplicifolia* com afinidade para resíduos α galactosil com afinidade para resíduos N acetil α-D-galactosaminil e lectina de *Tetragonobolus purpurea* com especificidade para resíduos α-L-fucosil.

A ligação de hemócitos com a lectina foi expressa como porcentagem da quantidade de hemócitos fluorescentes contados em relação à quantidade total de hemócitos. Os hemócitos apresentando uma coloração fluorescente devido à ligação com a lectina foram classificados como positivos, enquanto aqueles com fluorescência fraca foram considerados negativos. Como controle utilizaram-se os açúcares específicos como inibidores. Os seguintes inibidores foram utilizados: N

acetil D glicosamina (0,2M); metil α D manopiranosídeo (0,2M); D galactose (0,2M). Todos os açúcares foram de procedência Sigma Chemical Co, EUA. Não foi possível obter o inibidor para resíduos α L fucosil.

3.9.ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS PAGE)

O extrato de hemócitos contendo 180-190 μ g de proteína/0,5cm foi diluído em solução tampão de amostra e submetido a aquecimento em banho de água fervente durante 5 minutos, imediatamente antes da aplicação.

O padrão de peso molecular de 14,4kD a 94kD (Pharmacia) foi submetido ao mesmo tratamento redutor.

Os componentes dos hemócitos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) sob condições redutoras em sistema descontínuo descrito por LAEMMLI (1970) e por STUDIER (1973). Foram utilizados géis de separação em gradiente de 7 a 15% obtidos em sistema de vasos comunicantes com auxílio da força da gravidade e gel a 3% para empilhamento. Foram utilizadas placas de vidro de 14,5x 16,5 cm e 0,75cm de espessura. As corridas eletroforéticas foram realizadas utilizando-se fonte (BIO RAD) em solução tampão de corrida pH 8,3 e iniciadas a 60 V (cerca de 20 mA) até o empilhamento das amostras no início do gel de separação; a voltagem foi, então, aumentada e mantida a 150 V (cerca de 40 mA) até a chegada do marcador azul de bromofenol ao final do gel.

A coloração dos géis foi realizada por tratamento com solução fixadora (metanol [Synth, Brasil] 40% v/v) e ácido acético [Synth, Brasil] 10% v/v) e corados em azul de Coomassie R250 [Sigma Chemical Co. EUA] (01,% em metanol a 45% e ácido acético a 10% em água) e descorados com três trocas de 10 minutos cada em ácido acético em água (7% v/v) a 56°C .

3.10.IMUNOBLLOT

Os soros de pacientes chagásicos e controles não chagásicos foram submetidos ao teste de imunoblot, utilizando-se o extrato de hemócitos como antígeno.

Após a corrida eletroforética realizada como anteriormente descrito, os extratos antigênicos foram transferidos eletroforeticamente do gel para membranas de nitrocelulose de 0,2 μ m segundo a metodologia descrita por TOWBIN *et al.* (1979), utilizando-se solução tamponada de transferência pH 8,3. A transferência foi feita por 18 horas a 4°C. Após a transferência, as membranas foram coradas com corante Ponceau para visualização quantitativa e qualitativa da transferência e descoradas com água destilada. Após a secagem a temperatura ambiente, as membranas foram embaladas em sacos plásticos e mantidas em geladeira até o momento de uso.

Para a reação propriamente dita, as membranas foram cortadas em tiras de 0,3 a 0,4mm de largura, lavadas com água destilada para retirada do excesso do corante e bloqueadas com solução de leite desnatado em pó a 5% (Molico, Nestlé) diluída em tampão Tris pH 7,5.

Para a reação de imunoblot os soros foram absorvidos com suspensão de tripomastigotas e epimastigotas na quantidade de 20×10^6 formas/mL. Foram utilizados soros antes e após o tratamento quimioterápico específico. Os soros foram diluídos a 1:20 em microtubos de polipropileno de 1,5 mL na suspensão de parasitas formolizados. O soro sem absorção foi diluído em solução de Tris-leite a 1%. Os tubos foram mantidos sob agitação em agitador orbital de Kahn-Kline (Fanem, Brasil) por 30 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2000g a 15° C em centrífuga refrigerada Hermle (Alemanha). O sobrenadante foi retirado cuidadosamente, colocado em um microtubo de polipropileno e preenchido com igual quantidade de Tris-leite a 1%. Os soros, agora diluídos a 1:40, foram transferidos para mini-bandejas de

incubação onde estavam dispostas membranas de nitrocelulose que continham o extrato antigênico de hemócitos transferido através da técnica de *western blotting*. Procedeu-se à incubação por 18 horas em agitador do tipo gangorra (BioOficina, São Paulo) a temperatura ambiente.

Após este período, as tiras foram lavadas cinco vezes por cinco minutos com solução Tris-Tween-20. A seguir, cada soro recebeu o conjugado anti-IgG marcado com biotina (Sigma, EUA), diluído conforme o título. Incubou-se por uma hora a temperatura ambiente, sob agitação. Procedeu-se, então, a um ciclo de cinco lavagens de cinco minutos com solução de Tris-Tween-20. Adicionou-se a cada tira 1mL de avidina marcada com peroxidase diluída (Sigma,EUA) conforme o título e incubou-se novamente por uma hora sob agitação. Procedeu-se, então, a um novo ciclo de lavagens como acima. A revelação das bandas foi realizada através da incubação das tiras com 1mL de 4-cloro-1-naftol (Merck, Alemanha) a 0,3% em metanol (Synth, Brasil), Tris HCl 50mM pH 7,5, H₂O₂ a 0,1%. Após o desenvolvimento da cor, as tiras foram exaustivamente lavadas em água destilada.

3.11.OBTENÇÃO DE SALIVA DE *P. megistus*

A saliva de *P. megistus* foi colhida de acordo com a técnica descrita por AMINO (2001) com modificações. Os adultos, tanto machos quanto fêmeas do triatomíneo, foram alimentados com sangue de aves. Após quatro ou cinco dias, a saliva foi colhida com pipeta automática da probóscide, depois de uma leve massagem do abdômen. O ato de segurar o triatomíneo com a mão faz com que o mesmo distenda a probóscide e através de um mecanismo reflexo passe a salivar. A saliva era colocada em microtubo de polipropileno de 0,5 mL estéril e congelada até o momento de uso.

3.12.REAÇÃO DE DOT-ELISA COM SALIVA DE *P. megistus*

A reação de DOT-ELISA foi realizada da seguinte forma. Em membrana de nitrocelulose foram colocados “dots” de 1µL de saliva contendo 20-22µg de proteína dosada segundo BRADFORD (1976) . Como controle positivo, utilizou-se extrato alcalino de epimastigotas de *T. cruzi* obtidos de acordo com Hoshino-Shimizu *et al.*(1978). Após a secagem do antígeno, as membranas foram bloqueadas com solução de Tris-leite desnatado a 5% por duas horas. A seguir, 1µL de soros de pacientes chagásicos crônicos e soros negativos diluídos 1:40 em Tris-leite a 1% foram colocados e incubados por 18 horas em agitador orbital de Kahn-Kline a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas cinco vezes com Tris-Tween 20 a 0,05% e, em seguida, colocado o conjugado anti-IgG marcado com peroxidase diluído conforme o título previamente estabelecido. Procedeu-se a um período de incubação por uma hora sob agitação a temperatura ambiente. As membranas foram submetidas a um novo ciclo de lavagens, após o que foi adicionado o cromógeno, ou seja 4-cloro-1-naftol diluído em metanol, utilizando-se água oxigenada 30% como solução reveladora.

3.13.EXPERIMENTOS DE IMUNIZAÇÃO

3.13.1. PARASITEMIA E MORTALIDADE

Sob a hipótese de que tripomastigotas e hemócitos compartilham epítomos comuns, procederam-se os experimentos de imunização. Para tanto grupos de sete camundongos A/Sn foram imunizados com suspensão de hemócitos e hemolinfa colhidos com anticoagulante de ninfas de 5º estágio de *T. infestans*. Como adjuvante utilizou-se hidróxido de alumínio. O sedimento celular e o sobrenadante foram misturados com 0,5mg de hidróxido de alumínio e inoculados intraperitonealmente nos respectivos grupos de camundongos. Cada grupo de

sete camundongos recebeu três doses em intervalos de 15 dias. O primeiro grupo de camundongos recebeu 2, 3 e 4 x 10⁶ células/mL. O segundo grupo recebeu 188-200 mg% de proteínas do sobrenadante da hemolinfa e o terceiro grupo correspondente ao grupo controle foi inoculado apenas com o adjuvante.

Para verificar a resposta imune, o sangue foi colhido da veia caudal e os soros testados por imunofluorescência indireta, utilizando-se hemócitos como antígeno. Os camundongos do grupo hemócitos apresentaram alta quantidade de anticorpos contra plasmátócitos e granulócitos evidenciando a validade da imunização. Todos os animais foram desafiados com 500 formas de tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y 15 dias após a última imunização. A parasitemia foi estimada por meio do método descrito por BRENER (1962) do sexto dia até 15 dias após a imunização, quando não mais se observaram parasitas na circulação. A mortalidade foi avaliada até seis meses após o desafio.

3.13.2. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE

Para avaliar se a resposta imune induzida por hemócitos e pela hemolinfa era devida a mecanismos humorais ou celulares, três grupos de 12 camundongos fêmeas A/Sn cada foram imunizados como descrito no item 3.10.1. O soro foi colhido antes do desafio com *T. cruzi* (temp com os soros de todas as fases o zero), na fase ascendente da parasitemia, no pico da parasitemia e na fase crônica. Em cada dia determinado foram mortos três animais e o sangue foi colhido obtendo-se três amostras de soros. Com os soros no tempo zero, foram realizadas as reações de imunofluorescência indireta anti-IgM e anti-IgG indireta com epimastigotas fixados com formol e imunofluorescência *in situ* com os mesmos conjugados. Com os soros de todas as fases foram realizadas a reação de lise mediada por complemento, a dosagem de citocinas e a determinação de citocinas.

3.13.3 DOSAGEM DE CITOCINAS

Foram dosadas as seguintes citocinas: IFN γ e TNF α e IL-10, utilizando-se o teste de ELISA comercial (Biosource) seguindo-se as instruções do fabricante. Para estes ensaios, os soros foram colocados em duplicata em placas de fundo chato revestidas com o anticorpo anti-citocina correspondente. Após o período de incubação estipulado para ligação anticorpo/antígeno, foi adicionado o anticorpo específico conjugado à biotina. Durante a segunda incubação, este anticorpo liga-se à citocina de camundongo capturada durante a primeira incubação. Após a remoção do excesso do segundo anticorpo, adicionou-se streptoavidina ligada à peroxidase. Após uma terceira incubação e lavagens para remover toda a enzima não ligada, foi adicionada a solução de substrato. A leitura foi feita em leitor de ELISA a 450nm. As sensibilidades do ensaio para a dosagem das citocinas foram: interferon γ : < 1pg/mL (intervalo de 7,8 a 500pg/mL); TNF α : < 3pg/mL (intervalo de 19,5 a 1250pg/mL) e IL-10 < 13pg/ml (intervalo de 31,2 a 2000pg/mL)

3.14 DETERMINAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A determinação de óxido nítrico nos soros foi realizada determinando-se o conteúdo de nitrito nos soros dos camundongos imunizados e desafiados segundo TITHERADGE (1998) com modificações introduzidas pelo prof. Heitor Franco de Andrade Junior (comunicação pessoal). Os ensaios foram realizados, analisando-se duas amostras de cada dia de dois experimentos diferentes. Para tanto 100 μ L de cada soro foram diluídos com 100 μ L de ácido tricloroacético a 5% e incubado em banho de gelo por 15 minutos. Após este período, o soro foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 15°C por 6 minutos. O sobrenadante foi aspirado. A seguir, 50 μ L do soro tratado foram colocados em uma placa de fundo chato para ELISA e adicionaram-se 50 μ L de reagente de Griess (sulfanilamida a 1%;naftiletilenodiamina 2HCl a 0,1%; ácido fosfórico a 2,5%). A mistura foi

incubada a dez minutos a temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas por comparação com as absorbâncias de uma curva-padrão de nitrito em soro fetal bovino a 20% em água destilada. A concentração mínima que este ensaio permite detectar é de $0,5\mu\text{M}$ de nitrito. A leitura foi efetuada em leitor de ELISA (Multiskan, EUA) a 540 nm.

4.RESULTADOS

4.1 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA COM SOROS HUMANOS

A figura 1 representa a média dos títulos ($\log_2$ do título/5) obtidos com hemócitos de diferentes espécies de triatomíneos testadas contra soros de pacientes chagásicos crônicos e soros de indivíduos não infectados. As reatividades observadas nas subpopulações de hemócitos (pró-hemócitos, plasmatócitos e granulócitos) foram destacadas

Pode-se notar pela figura 1 que a espécie não hematófaga apresentou títulos sensivelmente mais baixos do que as espécies hematófagas. Dentre estas, os hemócitos menos sensíveis foram os de *Dipetalogaster maximus*. Efeito inverso foi observado quando os soros foram testados com as espécies do gênero *Triatoma*. Resultados mais altos foram alcançados com hemócitos de *T. palidipennis*. Os hemócitos de *P. megistus* apresentaram alta sensibilidade e alta especificidade, dado que os soros não reagentes apresentaram títulos mais baixo do que os observados com as outras espécies de triatomíneos.

Figura 1

Média dos títulos $\log(2)$ de soros reagentes e não reagentes para doença de Chagas por meio da reação de imunofluorescência indireta frente a subpopulações de hemócitos de diferentes espécies.

a PR POS anti pró-hemócito pos; a PR NEG anti pró-hemócito negativo; a PL POS anti-plasmatócito positivo; a PL NEG anti-plasmatócito negativo; a GRPOS anti-granulócito positivo; a GR NEG anti-granulócito negativo

4.2 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA COM SOROS DE CAMUNDONGOS

A figura 2 mostra os resultados obtidos, quando se testou soros de camundongos crônicos infectados e não infectados com *T. cruzi* contra as diferentes subpopulações de hemócitos de *T. infestans* utilizando-se conjugado anti-IgG.

FIGURA 2

Imunofluorescência indireta anti IgG de soros de camundongos cronicamente infectados com *T. cruzi* cepa Y contra hemócitos de *Triatoma infestans*
anti PR anti pro-hemócitos; anti-PL anti-plasmatócitos; anti-GR anti- granulócitos

Pode-se observar a diferença nos resultados obtidos e que estes resultados são diferentes no que concerne às populações de plasmatócitos e granulócitos.

4.3 “ESPECIFICIDADE” DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA ANTICORPOS ANTI-HEMÓCITOS

Buscou-se saber se soros de pacientes com outras patologias poderiam apresentar reatividade positiva com as subpopulações de hemócitos. Para tanto foram examinados soros de pacientes com leishmaniose, soropositivos para HIV, portadores de doenças autoimunes e indivíduos saudáveis. A figura 3 apresenta a média geométrica dos títulos obtidos

Figura 3

Imunofluorescência indireta anti-hemócitos de *T. infestans* com soros de pacientes com diferentes patologias e indivíduos sãos.

4.4. IDENTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS NA SUPERFÍCIE DA MEMBRANA DE HEMÓCITOS

Para saber se a fluorescência poderia ser atribuída a epítomos cuja estrutura química seria constituída de carboidratos, a suspensão de hemócitos foi tratada com solução de metaperiodato de sódio. Os resultados acham-se expressos na Figura 4.

FIGURA 4

Efeitos da ação de metaperiodato de sódio em hemócitos de *T. infestans* analisados por meio de imunofluorescência com soros de pacientes chagásicos crônicos.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR MEIO DA REAÇÃO COM LECTINAS MARCADAS

As subpopulações de hemócitos foram testadas com diferentes lectinas para saber a constituição de carboidratos na sua membrana. A tabela 1 mostra a avaliação qualitativa dos resultados obtidos

TABELA 1
INTERAÇÃO ENTRE LECTINAS MARCADAS COM ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEÍNA E HEMÓCITOS

LECTINA MARCADA	ESPECIFICIDADE	HEMÓCITOS		
		PRO-HEMÓCITOS	PLASMATÓCITOS	GRANULÓCITOS-
WGA	(glcNAc) ₂ NeuNAc	++++	++++	++++
CON A	α man α glc	++	+++	++++
PNA	β gal(1 $\rightarrow$ 3)galNAc	NEGATIVO	NEGATIVO	++++
BSI	α gal, α galNAc	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
<i>T.purpurea</i>	α -L-fuc	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Legenda:WGA wheat germ agglutinin lectina de *Triticum vulgaris* (germe de trigo); CONA concavalin A lectina de;PNA peanuts agglutinin lectina de *Arachis hipogae* (amendoim); BS-I lectina de *Bandeirae simplicifolia*; T. purpurea lectina de *Tetragonobolus purpurea*

4.6 EXPERIMENTOS DE IMUNIZAÇÃO DE ANIMAIS COM HEMÓCITOS

4.6.1. PARASITEMIA E MORTALIDADE

Partindo-se do pressuposto que os hemócitos compartilhariam epítomos comuns com o protozoário *T. cruzi*, foram realizados experimentos de imunização de camundongos com hemócitos e hemolinfa, utilizando-se o adjuvante (hidróxido de alumínio) como controle. Posteriormente os camundongos foram desafiados com 500 formas do parasita. Os dados da observação da parasitemia acham-se expostos na figura 5.

FIGURA 5

Parasitemia em camundongos A/Sn imunizados com hemócitos e sobrenadante de hemolinfa inoculados com hidróxido de alumínio como adjuvante após o desafio com 500 formas sangüícolas de *T. cruzi*.

Pode-se observar a diferença entre os animais controles e os camundongos imunizados. Os camundongos imunizados com hemolinfa apresentaram uma parasitemia mais precoce que os camundongos imunizados com hemócitos, embora no pico parasitêmico a parasitemia observada nos camundongos com hemolinfa tenha sido levemente menor (571 formas) do que nos camundongos inoculados com hemócitos (608 formas).

Foi observada a sobrevivência dos camundongos até o 30º dia. Os resultados acham-se representados na figura 6.

FIGURA 6

Porcentagem de sobrevivência em camundongos A/Sn imunizados com hemócitos e hemolinfa inoculados com hidróxido de alumínio como adjuvante e desafiados posteriormente com 500 formas de *T. cruzi*

Após 30º dia, os camundongos controle e imunizados com hemolinfa morreram, ao passo que os camundongos imunizados com hemócitos sobreviveram até seis meses depois.

4.6.2. REAÇÃO DE SOROS DE ANIMAIS IMUNIZADOS COM HEMÓCITOS E SOBRENADANTE DE HEMOLINFA COM EPIMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS

Para saber se os animais imunizados com hemócitos e sobrenadante de hemolinfa estimulavam a imunidade humoral e pensando-se numa reação cruzada, os soros foram testados no tempo zero com epimastigotas por meio da reação de imunofluorescência convencional. Tripomastigotas também foram testados através da reação de imunofluorescência *in situ*. Todos os resultados foram negativos (dados não apresentados)..

4.6.3 REAÇÃO DE LISE MEDIADA POR COMPLEMENTO

A reação de lise mediada por complemento foi realizada, para investigar a cinética humoral dos diferentes grupos imunizados e desafiados com *T. cruzi*. Os dados acham-se expostos na figura 7.

FIGURA 7

Lise mediada por complemento em soros de camundongos imunizados com hemolinfa e hemócitos, utilizando-se hidróxido de alumínio como adjuvante e desafiados com 500 formas de *T. cruzi*.

0: fase inicial antes da infecção; A: fase ascendente da parasitemia; P: pico da parasitemia; C: fase crônica da parasitemia (nenhum parasita observado na circulação); 180d soros de camundongos inoculados com hemócitos após 180 dias de infecção; 270d soros de camundongos inoculados com hemócitos após 270 dias de infecção.

4.6.4 DOSAGEM DE CITOCINAS

Para saber se a resistência induzida pelo inóculo de hemócitos e hemolinfa era mediada por citocinas procedeu-se a dosagem de algumas citocinas, a saber:

interferon γ , IL-10 e TNF α . A dosagem de interferon γ acha-se representada na figura 8.

FIGURA 8

Dosagem de Interferon γ em camundongos imunizados com hemócitos e hemolinfa e controle e desafiados com 500 formas de *T. cruzi* cepa Y.

O: fase inicial antes da infecção; A: fase ascendente da parasitemia; P: pico da parasitemia; C: fase crônica da parasitemia (nenhum parasita observado na circulação).

A dosagem de TNF α acha-se exposta na Figura 9.

Figura 9

Dosagem de $\text{TNF}\alpha$ em camundongos imunizados com hemócitos e hemolinfa e controle e desafiados com 500 formas de *T. cruzi* cepa Y

0: fase inicial antes da infecção; A: fase ascendente da parasitemia; P: pico da parasitemia; C: fase crônica da parasitemia (nenhum parasita observado na circulação).

A dosagem de IL-10 acha-se exposta na figura 10.

FIGURA 10

Dosagem de IL-10 em camundongos imunizados com hemócitos e hemolinfa e controle e desafiados com 500 formas de *T. cruzi* cepa Y

0: fase inicial antes da infecção; A: fase ascendente da parasitemia; P: pico da parasitemia; C: fase crônica da parasitemia (nenhum parasita observado na circulação).

4.6.5 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

Foi avaliado o conteúdo de nitrito nos soros dos camundongos imunizados, visando investigar a resposta dessa substância na capacidade de eliminar o parasita.

Os resultados acham-se expostos na figura 11.

FIGURA 11

Dosagem de óxido nítrico convertido em nitrito em soros de camundongos imunizados com hemócitos e hemolinfa por meio de reagente de Griess comparado com curva-padrão em leitura de 540 nm.

0: fase inicial antes da infecção; A: fase ascendente da parasitemia; P: pico da parasitemia; C: fase crônica da parasitemia (nenhum parasita observado na circulação).

4.7 DOT ELISA COM SALIVA DE *Panstrongylus megistus*

Para averiguar se a resposta a componentes do triatomíneo era restrita a hemócitos, procedeu-se à reação de DOT ELISA com saliva utilizando-se As amostras de soros de pacientes chagásicos crônicos e sem infecção com conjugado anti-IgG . Os resultados estão expostos na figura 12.

FIGURA 12

A: soros não reagentes para doença de Chagas com extrato alcalino de epimastigotas de *T. cruzi*;

B: soros reagentes para doença de Chagas com extrato alcalino de epimastigotas de *T. cruzi*;

C: soros não reagentes para doença de Chagas com extrato de hemócitos de *P. megistus* não infectados;

D: soros reagentes para doença de Chagas com extrato de hemócitos de *P. megistus* não infectados;

E: soros não reagentes para doença de Chagas com saliva de *P. megistus* não infectados.

F1 e F2: soros reagentes para doença de Chagas com saliva de *P. megistus* não infectados.

4.8 IMUNOBLOT DE SOROS DE PACIENTES CHAGÁSICOS COM EXTRATO DE HEMÓCITOS DE *P. megistus*

Os soros dos pacientes foram separados em dois grupos: antes e depois do tratamento e absorvidos com tripomastigotas ou epimastigotas. A figura 13 mostra o perfil típico de bandas com um soro antes e após o tratamento frente aos extratos antigênicos de hemócitos.

FIGURA 13

Imunoblot de soro de soros de pacientes chagásicos e controle normal contra extrato sonicado de hemócitos de *P. megistus*

1: soro de paciente chagásico não tratado sem absorção; 2: soro de paciente chagásico não tratado absorvido com epimastigotas; 3: soro de paciente chagásico não tratado absorvido com tripomastigotas; 4: soro de paciente chagásico submetido ao tratamento específico sem absorção; 5: soro de paciente chagásico submetido ao tratamento específico absorvido com epimastigotas; 6: soro de paciente chagásico submetido ao tratamento específico absorvido com tripomastigotas; 7: soro controle não absorvido; 8: soro controle absorvido com tripomastigotas

Após a reação, puderam ser evidenciadas as proteínas agrupadas na Tabela 2.

TABELA 2

Frequência das proteínas reveladas por imunoblot em soros de pacientes chagásicos crônicos com extrato antigênico de hemócitos antes e após o tratamento quimioterápico

Peso molecular (kDa)	Sem absorção antes do tratamento	Absorção c/ epimastigota antes do tratamento	Absorção c/ tripomastigota antes do tratamento	Sem absorção após o tratamento	Absorção c/ epimastigota antes do tratamento	Absorção c/ tripomastigota após o tratamento
131-135		1				
121-130	11	9	8		5	6
111-120		1				
91-100	4	2	4		1	
81-90	2	1	1		1	
71-80						
61-70	14	10	7	3	5	4
51-60	4	4	5			
41-50	8	4	5	6	2	1
31-40	18	16	9	8	3	4
21-30	17	16	16	10	3	3
11-20	1					
Total	78	65	55	27	20	18

A tabela 3 mostra a frequência das proteínas evidenciadas pela técnica de imunoblot em soros de pacientes não chagásicos sem absorção e absorvidos com solução de tripomastigotas ou epimastigotas.

Tabela 3

Frequência de proteínas reveladas por imunoblot em extrato antigênico de hemócitos em soros de controle pacientes não chagásicos

Peso molecular (kDa)	Sem absorção	Absorção c/ epimastigota	Absorção c tripomastigota
120	2	2	2
70	2	2	1
62	1	1	1
51	1	1	
47	1	3	1
40	1	1	1
37	1	1	1
34	1	1	2
28	2	1	1
23	1	3	3
Total	16	19	13
Sem bandas	3	3	3

A Figura 14 mostra as frequências das bandas obtidas antes do tratamento e após o tratamento específico em soros de pacientes chagásicos crônicos com absorção de epimastigotas e absorção de tripomastigotas.

figura 14

Distribuição de proteínas(kDa) detectadas por imunoblot com soros de pacientes chagásicos crônicos não tratados absorvidos com epimastigotas e tripomastigotas contra hemócitos de *P. megistus*

FIGURA 14 A

Distribuição de proteínas (kDa) detectadas por imunoblot com soros de pacientes chagásicos crônicos submetidos à quimioterapia absorvidos com epimastigotas e tripomastigotas contra hemócitos de *P. megistus*

A Figura 14 mostrada anteriormente permite visualizar que tripomastigotas absorveram mais proteínas do que epimastigotas. A Tabela 4 mostra resumidamente essa absorção em termos de porcentagem.

Tabela 4

Porcentagem de proteínas absorvidas em soros de pacientes chagásicos crônicos por meio de imunoblot com hemócitos de *P. megistus* não infectados.

Absorção (forma do parasita)	Fase da doença	
	Antes do tratamento	Após o tratamento
Tripomastigota	30%	33%
Epimastigota	16%	26%

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho detectou-se o reconhecimento de hemócitos de triatomíneos não infectados por soros de pacientes chagásicos tanto por meio de imunofluorescência quanto por imunoblot. GUTIERREZ *et al.* (1991) já haviam relatado reconhecimento do intestino médio e posterior de *Triatoma infestans* não infectado por soros de pacientes chagásicos.

Verificamos que esse reconhecimento não está limitado a uma espécie, mas possivelmente se estende por toda a família *Triatominae*. Foram testadas espécies dos principais gêneros que ocorrem no Brasil (*Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*), além de uma espécie que ocorre na América Central (*Dipetalogaster*). Os soros de pacientes chagásicos apresentaram sempre títulos altos, quando testados com as espécies hematófagas. Para verificar se este reconhecimento era limitado a espécies hematófagas, utilizamos hemócitos de fitófagos de *D. billineatus*, uma espécie que ocorre nas plantações de maracujá. Estes hemócitos nunca ofereceram resultados positivos com soros de pacientes chagásicos, chegando a apresentar títulos abaixo daqueles apresentados pelos soros não reagentes, quando testados com as espécies hematófagas. Pela análise da figura 1 verifica-se que os soros de pacientes não chagásicos reagiram de forma semelhante, porém em títulos baixos.

AMINO (2002) supõe que as espécies hematófagas sejam originárias de uma evolução das espécies predadoras. O hematofagismo ofereceria múltiplas

vantagens aos insetos tais como uma fonte praticamente inesgotável de alimento, escape dos predadores naturais e um isolamento das intempéries naturais. Infelizmente, no decorrer deste trabalho, não nos foi possível obter um número suficiente de exemplares de *Triatoma sordida*. Esta espécie é encontrada naturalmente em copas de árvores e tem como fonte alimentar o sangue de aves. Como as aves são refratárias à doença de Chagas, seria interessante observar o comportamento dos hemócitos desta espécie frente a soros de pacientes chagásicos. GUTIERREZ *et al.*(1991) levantaram a hipótese de que o reconhecimento de estruturas do intestino por soros de pacientes chagásicos se deveria à incorporação de estruturas químicas do vetor pelo parasita no decorrer do processo evolutivo.

A análise da figura 1 ainda permite mostrar que a diferença maior de reconhecimento se dá em relação aos plasmatócitos. Anticorpos anti-pró-hemócitos aparecem em títulos muito baixos em soros positivos bem como nos negativos. Relação inversa se observa no que concerne aos anticorpos anti granulócitos. Estas células mostram um reconhecimento sempre mais alto. No entanto em relação a plasmatócitos, o reconhecimento se mostrou sempre muito mais alto em todas as espécies hematófagas, ao passo que na espécie fitófaga os títulos sempre foram baixos e praticamente iguais tanto em soros positivos quanto em soros negativos.

A metodologia empregada neste trabalho foi requereu a obtenção de hemócitos de triatomíneos *in vivo*. As tentativas de cultura celular se mostraram pouco produtivas. Seria interessante um melhor desenvolvimento dessas técnicas,

o que possibilitaria separar as diferentes células através de gradiente com Percoll (SMITH & SÖDERHALL,1983). Além deste fato, o uso de triatomíneos para obtenção de hemócitos implica na morte de um grande número de insetos, que também são utilizados no laboratório para a prova de xenodiagnóstico.

Com o objetivo de verificar se o reconhecimento era restrito aos soros humanos, utilizamos soros de camundongos cronicamente infectados com *T. cruzi*. Na figura 2 podemos verificar igual reconhecimento de hemócitos por soros desses camundongos.

Na suspeita de que simples reações cruzadas estariam ocorrendo, utilizaram-se soros de outras patologias contra hemócitos na reação de imunofluorescência. Escolheram-se soros de pacientes infectados com *Leishmania* sp. e HIV. Os soros de leishmaniose foram selecionados, pois estes costumam apresentar sempre reações cruzadas, quando se usam epimastigotas ou tripomastigotas fixados com formol. Os soros de pacientes portadores de HIV foram escolhidos, pois freqüentemente as amostras desses pacientes apresentam reações inespecíficas e são ricos em anticorpos anticardiolipina. Os soros de pacientes acometidos por doenças autoimunes foram escolhidos, pois essas amostras apresentam anticorpos contra múltiplas estruturas celulares. A figura 3 mostra essa interação. Embora os soros de pacientes portadores de leishmaniose apresentassem títulos mais altos do que os portadores de HIV, foram bem mais baixos do que aqueles obtidos com soros de pacientes chagásicos principalmente contra os plasmátócitos. Interessantemente, pro-hemócitos responderam melhor à diferenciação entre os soros das patologias testadas. À guisa de hipótese, talvez

esse fato se dê, porque sejam células não diferenciadas e só tenham epítomos do parasita que vive dentro de seu vetor.

Buscamos, então, a identificação dos possíveis epítomos envolvidos nesta reação, lançando-se mão do recurso de tratamento dos hemócitos com metaperiodato de sódio. O processo de periodatação ao remover os açúcares, eliminou também a fluorescência, demonstrando o envolvimento de antígenos contendo carboidratos.

A utilização de lectinas marcadas permitiu identificar alguns dos açúcares envolvidos. O ácido acetil-neuramínico foi o açúcar mais comum encontrado fartamente em todas as células analisadas. A utilização de ConA permitiu salientar a presença de manose e glicose que são açúcares amplamente distribuídos na natureza.

Os trabalhos de Galili (revistos em GALILI, 1993) e os de Gazzinelli (vide GAZINELLI, 1990) levantaram a importância dos anticorpos anti-Gal nos soros de pacientes chagásicos. A estrutura $\alpha\text{Gal}1\rightarrow3\text{ Gal}$ foi encontrada em vários tecidos de não primatas, assim como em primatas do novo mundo. Por outro lado, os anticorpos anti-Gal estão presentes em soros de macacos do velho mundo e em humanos, mas não no soro de não primatas do novo mundo. A distribuição do epítomo $\alpha\text{Gal}1\rightarrow3\text{ Gal}$ não está restrita ao tecido de mamíferos. Indivíduos normais possuem anticorpos anti-Gal, o que é explicado pelo contato humano com a flora gastrointestinal normal e a microflora pulmonar, tais como *Escherichia coli* e *Salmonella* sp que abrigam antígenos com o terminal $\alpha\text{Gal}1\rightarrow3\text{ Gal}$.

Os soros de pacientes chagásicos apresentam títulos de anticorpos anti-Gal 4 a 5 vezes mais altos do que os soros de indivíduos sãos. ALMEIDA *et al.* (1994) demonstraram que os anticorpos anti α Gal1 $\rightarrow$ 3 Gal são mais potentes em mediar a lise em soros de pacientes chagásicos de fase aguda. Exatamente por sugestão do Professor Igor Almeida (atualmente, ICB USP) testou-se a afinidade de hemócitos com lectina de BS-I que possui especificidade para α gal, α galNAc. Ideal seria testar a lectina de *Euonymus europaeus* que possui afinidade para α Gal1 $\rightarrow$ 3 Gal [α L Fuc (1 $\rightarrow$ 2)], porém o uso de BS-I já seria indicador da presença de resíduos α -Gal. Os resultados foram negativos com todos os tipos de células, indicando a ausência desse açúcar na superfície dos hemócitos. Para verificar a presença de resíduos de fucose, utilizou-se a lectina de *Tetragonobulus purpurea* que possui especificidade para α L Fuc. Os resultados também foram negativos. Além da pesquisa de um possível epítipo α Gal, orientávamo-nos pela existência de uma glicoproteína de 85 kDa descrita por COUTO *et al.*(1990), presente em tripomastigotas que contém unidades sialil, fucosil e gactosil (α 1 $\rightarrow$ 3) galactose.

Dado que os experimentos de imunofluorescência indicavam a existência de epítipos comuns entre hemócitos e tripomastigotas, pensamos em imunizar camundongos com hemócitos e desafiá-los com *T. cruzi*. Como a cepa Y induz uma alta mortalidade, estudos iniciais foram feitos quanto ao número ideal de parasitas que poderia ser utilizado. A figura 5 mostra a curva de parasitemia, quando os animais foram inoculados com 500 formas. O mesmo perfil de curva foi observado, quando se utilizaram 5000 ou 2.500 formas/mL (dados não

apresentados), porém a mortalidade foi mais exacerbada. Pôde-se observar que, quando os camundongos foram inoculados com o sobrenadante da hemolinfa, apresentaram uma parasitemia menor do que o controle, porém o pico da parasitemia ocorreu no mesmo dia. Os camundongos inoculados com hemócitos, entretanto, apresentaram uma parasitemia mais baixa durante todo o processo da infecção, embora no pico parasitêmico, a quantidade de parasitas observados tenha sido levemente maior do que a quantidade observada nos camundongos inoculados com o sobrenadante de hemolinfa. Note-se que o pico da parasitemia nos camundongos inoculados com hemócitos foi mais tardio em relação aos outros dois grupos.

A observação da mortalidade oferece dados, a nosso ver, profundamente interessantes sobre a proteção conferida por hemócitos. Enquanto observaram-se mortalidades de 65% dos camundongos controles e 42% dos camundongos inoculados com o sobrenadante de hemolinfa, apenas 22% dos camundongos morreram após 30 dias de observação e os restantes foram mortos após seis meses e nove meses depois pois estavam muito debilitados pela idade. Nossa experiência com camundongos inoculados com a cepa Y mostra que mesmo inóculos baixos têm a capacidade de causar a morte em camundongos suscetíveis como os camundongos A/Sn, embora essa morte ocorra mais tardiamente. Assim, além dos hemócitos favorecerem uma menor parasitemia, provocaram menor mortalidade mostrando uma proteção parcial. Este experimento reforça mais a hipótese de epítomos comuns entre hemócitos e a forma infectante do parasita,

As reações de imunofluorescência realizadas com epimastigotas ou com tripomastigotas fixados *in situ*, utilizando soros antes do inóculo com *T. cruzi* não revelou qualquer reação cruzada com ambas as formas: epimastigotas e tripomastigotas.

A reação de lise mediada por complemento mostra a cinética da resposta humoral nos camundongos. Não houve um aumento espontâneo de anticorpos protetores no tempo zero, o que está de acordo com a alta sensibilidade da reação (LEVY *et al.* 1996). Na fase ascendente, os camundongos imunizados com o sobrenadante de hemolinfa começam a apresentar níveis altos de anticorpos, mais altos do que os do grupo controle, muito embora a parasitemia deste grupo fosse menor do que o grupo que recebeu apenas adjuvante. Os soros de camundongos imunizados com o sobrenadante de hemolinfa continuaram apresentando níveis altos de anticorpos até a fase crônica da infecção, quando normalmente estes níveis costumam cair, como pode ser visto pela curva do grupo controle. Note-se que no pico parasitêmico, o grupo controle apresenta níveis de anticorpos mais altos do que o grupo imunizado com o sobrenadante de hemolinfa, o que se explica pela alta parasitemia daquele grupo. Surpreendentemente, o grupo imunizado com hemócitos apresentou níveis de anticorpos sempre menores do que os camundongos imunizados com o sobrenadante de hemolinfa. Este fato poderia ser explicado pela menor parasitemia apresentada por este grupo. Como no grupo imunizado com o sobrenadante hemolinfa, os soros dos camundongos inoculados com hemócitos apresentam taxas crescentes de anticorpos mesmo na fase crônica, o que reforça

a hipótese de que a imunidade humoral desempenha um importante papel na defesa contra a infecção. Dado que os camundongos inoculados com hemócitos sobreviveram de seis a nove meses depois, a reação de lise mediada por complemento foi realizada com os soros desses dias. Pode-se observar que a quantidade de anticorpos aumentou com o passar da infecção. Como a parasitemia foi inaparente, acreditamos que o inóculo com hemócitos teve a capacidade de estimular a imunidade humoral, colaborando para diminuir o número de parasitas circulantes. Infelizmente, os soros de 180 dias e 270 dias estavam muito hemolisados, impedindo o seu uso para reações colorimétricas como as que envolveram a dosagem de citocinas e determinação de óxido nítrico.

Para avaliar os mecanismos da resposta imune desenvolvida pelos hemócitos e pelo sobrenadante de hemolinfa dosaram-se as seguintes citocinas: $IFN\gamma$, $TNF-\alpha$ e IL-10. A dosagem de $IFN\gamma$ mostrou que o inóculo do sobrenadante de hemolinfa estimulou a produção desta interleucina em níveis elevados, bem acima dos obtidos nos soros de camundongos inoculados com hemócitos, ambas as taxas acima daquela observada no grupo controle. Entretanto, passada a fase ascendente da parasitemia, enquanto os níveis de $IFN\gamma$ dos camundongos inoculados com o sobrenadante de hemolinfa tenderam a cair quase que se sobrepondo ao do controle, os níveis de $IFN\gamma$ dos camundongos inoculados com hemócitos passaram a subir.

Uma curva semelhante foi obtida quando se quantificou $TNF-\alpha$. Tanto o grupo inoculado com hemócitos quanto o grupo inoculado com o sobrenadante de

hemolinfa apresentaram altos valores comparados com o grupo controle. Como ocorre na doença de Chagas, as duas citocinas colaboram no controle da parasitemia, favorecendo uma diminuição da mortalidade.

A dosagem de IL-10 mostra bem a importância da proteção exercida por hemócitos no controle da parasitemia. Os camundongos controles apresentam uma curva típica, onde os níveis de IL-10 sobem de acordo com a evolução do estado infeccioso. Deve-se lembrar que camundongos A/Sn são camundongos suscetíveis à infecção por *T. cruzi*. Os níveis iniciais de IL-10 foram semelhantes nos três grupos. Nos camundongos inoculados com o sobrenadante de hemolinfa, o nível baixo se mantém nas fases ascendente e no pico da parasitemia, subindo logo a seguir. Nos camundongos inoculados com hemócitos, entretanto, os níveis da interleucina caem logo após a fase ascendente. A imunização com hemócitos diminuiu, assim, os efeitos deletérios provocados por IL-10 favorecendo uma maior sobrevivência dos animais. Esta seria uma das razões pelas quais os camundongos inoculados com hemócitos apresentaram baixa parasitemia e os camundongos inoculados com o sobrenadante de hemolinfa apresentaram uma parasitemia maior e mais prolongada (figura 9) .

A dosagem de óxido nítrico mostrou que não houve um aumento espontâneo desta substância antes do desafio com *T. cruzi*. De fato, é sabido que IFN γ sozinho é pobre estimulador da síntese de NO pelos macrófagos (DING *et al.*, 1988; FERNANDEZ –GOMEZ *et al.* 1996). Na fase ascendente da infecção os níveis de IFN γ e TNF- α foram baixos nos três grupos, e o óxido nítrico aumentou

nos três grupos em valores semelhantes. A partir do pico parasitêmico, as mudanças ocasionadas pelas diferentes imunizações se fizeram notar. O grupo inoculado com hemócitos apresentou níveis de óxido nítrico extremamente elevados, ao passo que o grupo inoculado com o sobrenadante de hemolinfa e o grupo controle apresentam níveis bem mais baixos (quatro vezes menor). Um sinergismo entre as citocinas que favorece a resposta Th1, uma menor resposta Th2 como observado pela baixa produção de IL-10 e a resposta de óxido nítrico favorecendo a eliminação de parasitas mostra algumas das razões pelas quais a imunização com hemócitos conseguiu induzir uma proteção parcial.

Em síntese, o grupo imunizado com hemócitos apresenta uma série de vantagens sobre o grupo imunizado com o sobrenadante de hemolinfa. Se ambos apresentam semelhante aumento de $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$, o grupo imunizado com hemócitos apresentou uma menor expressão de IL-10. As citocinas que favorecem uma resposta Th-1 favoreceram a síntese de óxido nítrico contribuindo assim na eliminação do parasita. Para esta eliminação ainda concorreu a lise mediada por complemento.

A análise das proteínas identificadas por imunoblotting mostra que a absorção maior se deu, quando tanto os soros antes do tratamento quanto as amostras após o tratamento específico foram absorvidos com tripomastigotas. Houve uma diminuição de 30% nas bandas observadas em relação aos soros antes do tratamento quando a absorção foi com tripomastigotas, ao passo que quando a absorção foi feita com epimastigotas obteve-se apenas 16% de redução.

Em relação aos soros antes do tratamento, as maiores quedas para absorção com epimastigotas e tripomastigotas foram com os grupos de proteínas entre 121-130 kDa: 19% e 28%; 61-70kDa 29 % e 50%; 41-50 kDa: 50 e 38% e 31-40 kDa 25 e 50%.

Interessantemente, os soros após o tratamento, quando reagiram com hemócitos sem qualquer absorção mostraram uma queda de bandas evidenciadas, mostrando que a ausência do parasita na circulação diminui a reação com hemócitos. Em relação aos soros após o tratamento, as maiores quedas pela absorção com epimastigotas e tripomastigotas foram com os grupos de proteínas entre 41-50 kDa: 67 e 84% respectivamente; 31-40 kDa 37,5 e 50% respectivamente e 21-30 kDa 50%, quando a absorção foi feita com ambas as formas.

Após o tratamento, muitos soros tornaram-se totalmente negativos. Outros soros precipitaram com antígenos de hemócitos, revelando outras bandas que não haviam sido reveladas antes do tratamento. Houve precipitação com bandas entre 21 a 30 kDa de 43,75% dos soros testados, sendo que 25% dos soros reagiram com uma proteína de 22,5 kDa e 18,75% com uma proteína de 26kDa.

Os ensaios preliminares com saliva por meio da reação de DOT-ELISA permitiram observar que o reconhecimento de anticorpos desenvolvidos pela infecção com *T. cruzi* pode se dar com outras estruturas dos triatomíneos. Não foi notada uma reatividade com soros não reagentes para doença de Chagas com a saliva de triatomíneos, diferentemente do observado por NASCIMENTO *et al.*

(2001). Acreditamos que tal fato tenha se dado por uma escolha inadequada do “cut-off” na reação de ELISA utilizada por aqueles autores.

Em resumo, podemos dizer que os objetivos gerais deste trabalho foram alcançados . De forma geral, podemos concluir que existem de fato relações imunológicas entre as células normais do vetor triatomíneo e as formas parasitárias de *T. cruzi*, assim como com o hospedeiro mamífero, quando infectado. Os dados apontam sobretudo sobre para a potencialidade de epítomos de hemócitos tanto em relação à imunoproteção, quanto ao imunodiagnóstico e, também para o acompanhamento terapêutico na doença de Chagas.

Durante o decorrer deste trabalho alguns dados foram apresentados em Congressos (Levy *et al.*, 1997; Levy *et al.*, 1998) sendo sempre destacados para apresentação oral, o que mostra a originalidade do trabalho. Acreditamos que esta pesquisa também possa servir de modelo para outras infecções, cujos parasitas sejam albergados em alguma fase em insetos.

A questão que este trabalho levanta é se o ciclo biológico de *T. cruzi* estabeleceu-se por causa da existência prévia dessas relações, ou então, o parasita foi geneticamente se adaptando às condições adversas encontradas nos seus hospedeiros para a sua própria sobrevivência.

6. CONCLUSÕES

Foi demonstrada a existência de relações imunológicas entre células normais do vetor triatomíneo, as formas parasitárias de *T. cruzi*, fazendo com que anticorpos de hospedeiros infectados reconheçam epítomos de hemócitos, reconhecimento esse que cessa, quando o indivíduo é submetido à quimioterapia. Os hemócitos de triatomíneos guardam um potencial quanto à sua aplicação na imunoproteção, imunodiagnóstico e avaliação terapêutica. Tais conclusões se sustentam nos seguintes dados:

1. Os hemócitos dos vetores hematófagos foram reconhecidos por anticorpos de pacientes chagásicos crônicos, o que não aconteceu com os hemócitos de fitófagos. Constatação semelhante foi realizada com soros de camundongos infectados experimentalmente com *T. cruzi*.
2. Houve uma interação de forma reduzida com os soros de pacientes portadores de leishmaniose. Essa interação, entretanto, foi praticamente ausente com soros de pacientes com infecção por HIV, doenças autoimunes e indivíduos clinicamente sadios.
3. O tratamento dos soros com metaperiodato levou à indicação de que carboidratos são epítomos envolvidos neste reconhecimento.
4. Camundongos previamente inoculados com hemócitos, quando infectados com *T. cruzi*, apresentam baixa parasitemia, com pico tardio e alta sobrevivência em relação aos animais controles.
5. As citocinas $IFN\gamma$ e $TNF\alpha$ estavam em níveis mais elevados nos camundongos inoculados com hemócitos do que nos animais controles.
6. A citocina IL-10 manteve-se em níveis baixos nos camundongos inoculados com hemócitos em contraste com os animais controle.
7. O teor de óxido nítrico (NO) aumentou consideravelmente nos animais inoculados com hemócitos, durante a infecção por *T. cruzi*, diferindo dos animais controles.

8. Os anticorpos líticos encontrados nos animais inoculados com hemócitos apresentaram níveis crescentes com o decorrer da infecção, em contraste com os animais controles quando tendem a cair na fase crônica da parasitemia, o que mostra que hemócitos também favorecem a imunidade humoral.
9. Os hemócitos apresentaram maior número de epítomos comuns com as formas tripomastigotas do que com as formas epimastigotas de *T. cruzi* na técnica de imunoblot após as absorções de soros de pacientes chagásicos antes e após a quimioterapia.;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM R., MOELLER P., GABEL D., SENTER P., HELLSTROM I., HELLSTROM K.E. The influence of periodate oxidation on monoclonal antibody and immunoreactivity. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.144, p.77-86, 1991.
- ABRAHAMSOHN I.A. & COFFMAN R.L. *TRYPANOSOMA CRUZI*: IL-10, TNF α , IFN γ and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection . *Exp. Parasitol.* Orlando, v.84, p.231-244, 1996.
- ALIBERTI J.C.S., CARDOSO M.A.G., MARTINS G.A., GAZZINELLI R.T., VIEIRA L, SILVA J.S. Interleukin 12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. Immun.*, Washington , v.64, p.1961-1967, 1996.
- ALVARENGA N.J., BRONFEN E., ALVARENGA R.J., BARRACCO M.A. Triatomine's hemocytes and granuloma formation around biological and non-biological material. *Mem. Inst Oswaldo Cruz* ,Rio de Janeiro 85:377-379, 1990.
- ALVARENGA N.J., BRONFEN E. Incapacidade da evolução do *Trypanosoma cruzi* na hemocelule de triatomíneos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* , Rio de Janeiro 77: 431-436, 1982.
- ALMEIDA I.C., FERGUSON M.A.J., SCHENKMAM S., TRAVASSOS L.R. Lytic anti- α galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas'disease recognize novel O linked oligosaccharides on mucin like glicosyl

phosphatidylinositol anchors glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.*, 304: 793-802,1994.

ALMEIDA I.C., COVAS D.T., SOUSSUMI L.M., TRAVASSOS L.R. A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion*, Bethesda, v.37, p.850-857,1997.

AMINO R. *Interações parasita hospedeiro na tripanosomíase americana. O papel da saliva de Triatoma infestans*. São Paulo, 2002. Tese de. Doutorado. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo.

AMINO R., TANAKA A.S., SCHENCKMAN S. Triapsin, an unusual activable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease triatoma infestans (Hemiptera:Reduviidae). *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, Oxford, v. 31, p.465-472,2001.

AMINO R., MARTINS R.M., PROCÓPIO J., HIRATA I.Y., JULIANO M.A., SCHENCKMAN S. Trialysin a novel pore forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, Alabama, v.273, p.24575-24582, 2002.

ASHIDA M. The prophenoloxidase cascade in insect immunity. *Res. Immunol.*, Paris, v.41, p.908-910, 1990.

AVILA J.L. Molecular mimicry between *Trypanosoma cruzi* and host nervous tissues. *Acta Cient. Venez.*, Caracas, v.43, p.330-340, 1992

- AZAMBUJA P., GARCIA E.S., RATCLIFFE N.A. Aspects of classification of hemiptera hemocytes from six triatomines species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 86:1-10 1991
- BACH- ELIAS M., BAHIA D., TEIXEIRA D.C., CICARELLI R.M.B. Presence of autoantibodies against small nuclear ribonucleoprotein epitopes in Chagas'patients sera. *Parasitol. Res.*, Berlin, v.84, p. 796-799, 1998.
- BARRACO M.A., OLIVEIRA R., SCHLEMPER JR B. The hemocytes of *Panstrongylus megistus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.82, p.431-438, 1987.
- BARRACO M.A., LOCH C.T. Ultrastructural studies of the hemocytes of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.84, p.171-188, 1989.
- BARRACO M.A.A.M. *Estudo dos hemócitos e hemolinfa de Trichosia pubescens (Diptera: Sciaridae)* São Paulo, 1982. Tese de doutorado. Instituto de Biociências USP.
- BARRETO M.P. Epidemiologia in BRENER Z. & ANDRADE Z.A. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979, p. 89-151.
- BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analyt Biochem.*, Orlando, v.72, p.248-254, 1976.

- BRENER Z., GAZZINELLI R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas'disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, Basel, v.114, p.103-110, 1997.
- BRENER Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* *Rev. Inst. Med. Trop. S Paulo*, São Paulo, v.4, p.389-396, 1962.
- BURGOS M.H. GUTIERREZ L.S., LAMMEL E. ISOLA E.L.D. Midgut extract rich on peritrophic membrane from *Triatoma infestans* induces differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc.r. Electron. Biol. Cel.*, Mendoza, v.13, p.151-166, 1989
- CAMARGO E. P. Growth and diferentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst. Med. Trop. S. Paulo*, São Paulo, v.6, p.93-100, 1964.
- CAMARGO M.E. TAKEDA G.K.F. Diagnóstico de laboratório in BRENER Z.& ANDRADE Z. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979, p.175-198.
- CHIARI E. Diferentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. In: NEW APPROACHES IN AMERICAN TRIPANOSOMIASIS RESEARCH , Belo Horizonte, 1975. Proceedings, Washington, PAHO,WHO,1976, p.144-45 (Scient. Publ. n°318).
- COBEA Os princípios éticos da experimentação animal Colégio Brasileiro de Experimentação Animal 1991.

- COSTA F., PEREIRA-CHIOCCOLA V.L., RIBEIRÃO M., SCHENCKMAN S. RODRIGUES M.M. Trans-sialidase as a naked DNA vaccine elicits an immunological response similar to a *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz. J. Biol. Research*, Ribeirão Preto, v. 32, p.235-239, 1999
- COSSIO P.M., LAGUENS R.P., DIEZ C., SZARFMAN A., SEGAL A., ARANA R.M. Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation*, Baltimore, v.50, p.1272-1277, 1974.
- COUTO A., GONÇALVES M.F., COLLI W. LEDERKREMER R.M. The N linked carbohydrate chain of 85 kilodalton glycoprotein from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes contains sialyl, fucosyl and galactosyl ($\alpha 1 \rightarrow 3$) galactose units. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v.39, p.101-108, 1990.
- CUBA C.A.C. Study of a Peruvian strain of *Trypanosoma rangeli*. IV Observation sobre seu desenvolvimento na hemocélula e na glândula salivar de *Rhodnius equatoriensis* *Rev. Inst. Med Trop São Paulo.*, São Paulo, v.17, p.283-297, 1975.
- DING A.H., NATHAN C.F., STUER D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production *J. Immunol.*, Bethesda, v.141, p.2407-2412, 1988.
- DUNN P.E. Biochemical aspects of insect immunology. *Annu. Rev. Entomol.*, Palo Alto, v.31, p.321-39, 1986.
- FERNANDEZ-GOMEZ R., ESTEBAN S., GOMEZ-CORVERA R., ZOULOKA K., OUAISSI, A. *Trypanosoma cruzi*: Tc 52 released protein-induced increased

expression of nitric oxide synthase and nitric oxide production by macrophages. *J. Immunol.*, Bethesda, v.160, p.3471-3479,1998.

FISCHER E., OUAISSI M.A., VELGE P., CORNETTE J., KAZATCHIKIN M.D. GP 58/68 a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. *Immunol.*, 65: 299-303,1988.

FUJIMURA A.E., KINOSHITA S.S., PEREIRA-CHIOCCOLA V.L., RODRIGUES M. DNA sequences encoding CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes are important for efficient protective immunity induced by DNA vaccination with a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect. Immun.*, Washington, v.69, p.5477-5486, 2001.

FRAGATA FILHO A.A. Miocardiopatia Chagásica. In Dias da Silva M.A. *Doenças do miocárdio.*, São Paulo, Sarvier,1995,p.162-170.

GALILI U. Interaction of the natural anti-Gal antibody with α galacosil epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol. Today*, Oxford, v. 14, p.480-482,1993.

GARCIA E.S., AZAMBUJA P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*, Oxford, v.7, p.240-244, 1991.

GARCIA E.S., GONZÁLEZ M.S., FLAWIA M., AZAMBUJA P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector: some facts and ideas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.88: Suppl.,p.11-12,1993

- GARCIA E.S. GONZÁLEZ M.S., AZAMBUJA P., BARALLE F.E., FRAIDENRAICH D., TORRES H.N., FLAWIA M. Induction of *Trypanosoma cruzi* metaciclogenesis in the gut of hematophagous insect vector, *Rhodnius prolixus*, by hemoglobin and peptides carrying α -d-globin sequences. *Exp. Parasitol.*, Orlando, v.81, p.255-261, 1995.
- GAZZINELLI R.T. Natural anti-Gal antibodies prevent rather than cause autoimmunity in human Chagas'disease. *Res. Immunol.*, Paris, v.142, p.164-167, 1991
- GILLESPIE J.P., KANOST M., TRECZEK T. Biological mediators of insect immunity *Annu. Rev. Entomol.*, Palo Alto, v.42, p. 611-43,1997.
- GRAUERT M.R., HOUDAYER M., HONTEBERIE-JOSCKOWICZ M *Trypanosoma cruzi* infection enhancer polyreactive antibody response in acute case of human Chagas'disease. *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v.93, p.85-92, 1993.
- GUTIERREZ, L.S., BURGO M., BRENGIO S.D.R. Antibodies from Chagas patients serum bind to the gut epithelial cell surface of *Triatoma infestans*. *Microsc. Electron. Biol. Cel.*, Mendoza, v.15, p.145-158, 1991
- GUTIERREZ L.S., BURGOS, M.H. The surface extracelular coat of the midgut in *Triatoma infestans*. Mechanim of development. *J. Ultrastruct. Molec. Res.* ,v. 95,p.75-83, 1986.
- HOFFMAN D., HOFFMAN J.A. Cellular and molecular aspects of insect immunity *Res. Immunol.*, Paris, v.41, p.895-896, 1990.
- HOSHINO-SHIMIZU S., CAMARGO M.E., NAGASSA T.K. A stable polysaccharide hemmagglutination reagent for the diagnosis of acute or recent

Trypanosoma cruzi infection. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.20, p.208-212, 1978.

HULL R.N., CHERRY W.R., JOHNSON I.S. The adaptation and manutenance of mammalian cells to continous growth in tissue culture. *Anat. Rec.*, New york v. 124,p. 490-493, 1956.

ISOLA E.L., LAMMEL E.M., GONZALEZ CAPPA S.M. Efecto de la hemolinfa de *Triatoma infestans* en la morfogenese de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Argent Microbiol*;Buenos Aires, v.15, p.181-5, 1983

JOINER K.A., DA SILVA W.D., RIMOLDI MT, HAMMER C.H., SHER A, KIPNIS T.L. Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelarates the decay of complement C3 convertases. *J.Biol. Chem.*, Birmingham, Alabama, v.263, p.11327-35, 1988.

JUAREZ E. Comportamento de *Triatoma infestans* sob várias condições de laboratório. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v.4, p.147-166, 1970.

KHOURY E.L., RITACCO V., COSSIO P.M., LAGUENS R.P., SZARFMAN A., DIEZ C., ARANA R.M. Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v.36, p.8-13, 1979.

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

- KIRCHOFF L.V. Chagas disease American trypanosomiasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, Chicago, v.7, p.487-502, 1993.
- KOLLIEN A.H., SCHIMIDT J., SCHAUB G.A. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta Tropica*, Amsterdam, v.70: p.127-141, 1998.
- KOLLIEN A.H., SCHAUB G.A. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: effects of blood ingestion by starved vector. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.59, p.166-70, 1998.
- KRETTLI A.U. & BRENER Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.*, Bethesda, v.116, p.755-760, 1976
- KRETTLI A.U., CANÇADO J.R., BRENNER Z. Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas' disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.76, p.334-337, 1982.
- KRETTLI A.U. & BRENNER Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigotes antibodies. *J. Immunol.*, Bethesda, v.128, p.2009-2012, 1982.
- LACKIE A.M. Immune mechanisms in insects *Parasitol. Today*, Oxford, v.4, p.98-105, 1988.
- LACOMBE D. Fase extra-intestinal do ciclo evolutivo de *Trypanosoma cruzi* em *Triatoma infestans*. *Rev. Bras. Biol.*, Rio de Janeiro, v.40, p. 525-535, 1980.

- LANAR D.E. & MANNING J.E. Major surface proteins and antigens on the different *in vivo* and *in vitro* forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v.11, p.119-131, 1984.
- LARANJA F.S., DIAS E., NOBREGA G., MIRANDA A. Chagas' disease . A clinical, epidemiologic pathologic study. *Circulation* , Baltimore, v.14, p.1035-1060, 1956.
- LEVY A.M.A., PEREIRA V.L. Boainain E. Avaliação da técnica de lise mediada por complemento em pacientes chagásicos tratados com drogas tripanosomicidas. *Rev Inst. Med. Trop. S. Paulo, São paulo*, v.30,32-39,1988.
- LEVY A.M.A., BOAINAIN E., KLOETZEL J.K. *In situ* indirect fluorescent antibody: a new specific test to detect ongoing chagasic infections. *J. Clin. Lab. Anal.*, New York, v.10, p.98-103, 1996.
- LEVY A.M.A., HOSHINO-SHIMIZU, S., NUNES E.V., TANIGUCHI H.H., OKUMURA M. Interaction of hemocytes from native triatoma infestans with sera from humans and mice with *Trypanosoma cruzi* In 9th International Congress of Parasitology, Chiba, Japão, Monduzzi, 1297-1301, 1998.
- LEVY A.M.A., TOLEDO JR R.A.S, HOSHINO-SHIMIZU S., LOURENÇO A.M., PEREIRA-CHIOCCOLA.V.L., MAIFRINO L.B.M. Hemocytes from uninfected T. Infestans can protect partially mice from *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de janeiro*, v.92 Suppl 1, 1997.
- MARTINS R.M., SILVA L.S. AZEVEDO, E.B., SCHENCKMAN S., AMINO, R. Killing of *Trypanosoma cruzi* by saliva of its vector in AMINO (2002)

- MATSUMOTO T.K., HOSHINO-SHIMIZU S., NAKAMURA P.M., ANDRADE JR H.F., UMEZAWA E.S. High resolution of *Trypanosoma cruzi* amastigote antigen in serodiagnosis of different clinical forms of Chagas disease. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.31, p.1486-92, 1993.
- MELLO C.B., GARCIA E.S., RATCLIFFE N.A. AZAMBUJA P. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with components of *Rhodnius prolixus*. *J Invertebr. Path.*, Orlando, v.65, p.261-268, 1995.
- MELLO C.B., AZAMBUJA P., GARCIA E.S., RATCLIFFE N.A. Differential *in vitro* and *in vivo* behavior of three strains *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.*, Orlando, v.82, p.112-121, 1996.
- MELLO C.B., NIGAN Y., GARCIA E.S., AZAMBUJA P., NEWTON R.P., RATCLIFFE N.A. Studies of a Haemolymph lectin isolated from *Rhodnius prolixus* and its interaction with *Trypanosoma rangeli*. *Exp. Parasitol.*, Orlando, v.91, p.289-296, 1999.
- MINOPRIO P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int. J. Parasitol.*, Amsterdam, v.31, p.588-591, 2001.
- MINOPRIO P., ITOHARA S., HEUSSER C., TONEGAWA S., COUTINHO A. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-non-specific responses and the activation of TcRI T cells. *Immunol. Rev.*, Copenhagen, v.112, p.183-207, 1989.
- MINOPRIO P., EISEN H., JOSKOWICZ M., PEREIRA P. COUTINHO A. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi* infected mice by

treatment with L3T4 antibodies. J. Immunol., Bethesda, v. 132, p.546-550, 1987.

MIRANPURI G.S., KACHATOURIANS G.G. Hemocyte surface changes in the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes* in response to wounding and infection with *Beauveria bassiana*. *Entomol. Exp. Appl.*, Dordrecht, v.68, p.157-164, 1993.

MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro.,v. 94, Suppl.1, p.401-404, 1999.

MUNIZ J. & SANTOS M.C.F. Heterophile antibodies in American Trypanosomiasis. The presence of heterogenetic components in the antigenic structure of *Schizotrypanum cruzi* shown by conditioned hemolysis. *Hospital Rio de Janeiro*, v.38, p.601-616, 1950.

NASCIMENTO R.J., SANTANA J.M., LOZZI S.P., ARAÚJO C.N. TEIXEIRA A.R.L. Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) salivary glands proteins. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.65, p.219-226, 2001.

NIH Principles of animal care. U.S.National Institutes of Health Publicação 86,1995.

NOGUEIRA N., BIANCO C., COHN Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.*, New York, v.142, p.224-229, 1975.

NORRIS, K.A. Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigotes specific complement regulatory protein cDNA confers

complement resistance. *Infec. Immun.*, Washington, v.66, p. 2460-2465, 1998.

PEREIRA M.E.A., ANDRADE A.F.B., RIBEIRO J.M.C. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science*, New York, v.211, p.597-600, 1981.

PERLOWAGORA SZUMLEWICZ A., MÜLLER C.A. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease 1. Comparative xenodiagnosis with nine triatomine species of animals with acute infections by *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.77, p.37-53, 1982.

PICK P.F. Sur la cristallization biologique du sang ingeré par des reduvides du genre *Triatoma* (*T. Infestans*, *T megista* ,*T rubrovaria* ,*T brasiliensis*). *Bull. Soc. Path. Ex.* 45: 326-328,1952, cit. em Schaub ,1992.

PORTELA-LINDOSO, A.A., SHIKANAI-YASUDA M.A. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase *Rev Saúde Pública* São Paulo, v.37, p. 107-115, 2003.

PRADO JR J.C., LEVY A.M.A., LEAL M.P., BERNARD E. ,KLOETZEL J.K. Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.*, Berlin, v.85, p.826-829, 1999.

PRIMAVERA K.S., UMEZAWA E.S., PEREZ B.A., CAMARGO M.E., HOSHINO-SHIMIZU S. Chagas'disease IgA,IgM and IgG antibodies to *T. cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in

different chronic forms of the disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.32, p.172-80, 1990.

RATCLIFFE N.A., NIGAN, Y., MELLO C.B., GARCIA E.S., AZAMBUJA P. *Trypanosoma cruzi* and erythrocyte agglutinins: a comparative study of occurrence and properties in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.*, Orlando, v.83,p.83-93, 1996.

RATCLIFFE N.A., GÖTZ P. Functional studies in insect haemocytes including non self-recognition. *Res. Immunol.*, Paris, v.41, p.919-922,1990.

RASSI A.,LUQUETTI A.O., RASSI JR. A., RASSI S.G., RASSI A.G.Chagas'disease clinical features. In WENDEL S., BRENER Z., CAMARGO M.E., RASSI A. (eds) *Chagas'disease* (American Trypanosomiasis) its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo, ISBT Brasil, 92, 1992,p.81-101.

RICHARDS E.H., RATCLIFFE N.A. Direct binding and lectin mediated binding of erythrocytes to haemocytes of the insect *Extatosoma tiatarum*. *Dev. Comp. Immunol.*, Orlando, v.14, p.269-281, 1990

RIBEIRO DOS SANTOS R., ESTE M.M.G., GARCIA E.S., AZAMBUJA P. Binding sites for IgG-Fc in hemocyte adherent cells of hematophagous bugs (*Rhodnius neglectus*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.85, p.469-470, 1990.

RUIZ A.M., ESTEVA M., SUBIA E., MORENO M., DE CAMPANINI A.R., VELASQUEZ 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.*, Amsterdam, v.39, p.117-126, 1990.

SEGURA E.L., BUA J., DE CAMPANINI A.R., SUBIAS E., ESTEVA M., MORENO M., RUIZ A.M. Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* : complement mediated lytic activity against trypomastigotes and passive immunoprotection in mice. *Immunol. Lett.*, Amsterdam, v.13, p.165-171, 1986.

SCHAUB, G.A. *Trypanosoma cruzi*: quantitative studie of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.*, Orlando, v.68, p.260-273, 1989 a.

SCHAUB G.A. Does *Trypanosoma cruzi* stress its vectors? *Parasitol. Today*, Oxford, v.5, p.185-188, 1989b.

SCHAUB G.A. The effects of trypanosomatids on insects. *Adv. Parasitol.*, London, v.31, p.255-319, 1992.

SCHAUB G.A. & LÖSCH P. Parasite/host interrelationships of the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Blastocrithidia triatomae* and the reduviid bug *Triatoma infestans*: influence of starvation of the bug. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* v.83, p.215-223, 1989.

SCHMIDT J., KLEFFMANN T., SCHAUB G.A. Hydrophobic attachment of *Trypanosoma cruzi* to superficial layer of rectal cuticle in the bug *Triatoma infestans*. *Parasitol. Res.*, Berlin, v.84, p.527-536, 1998.

- SILVA L.H.P., NUSSENZWEIG V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.*, Rio de Janeiro, v.20, p.191-208, 1953.
- SILVA J.S., VESPA G.N., CARDOSO M.A., ALIBERTI J.C., CUNHA F.Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon activates macrophage. *Infect. Immun.*, Washington, v. 63, p.4862-4867, 1995.
- SMITH V & SÖDERHALL K. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. *Cell tissue Res* 233: 295-303,1983.
- SÖDERHALL K., ASPÁN A., DUVIC B. The proPo system and associated proteins;role in cellular communication in arthropods. *Res. Immunol.*, Paris, v.41, p. 919-922, 1990.
- SULLIVAN J.J. Metacylogenesis of *Trypanosoma cruzi in vitro*: a simplified procedure. *Trans. Roy. Soc. Trp. Med. Hyg.*, London, v.76, p.300-303, 1982.
- TAIBI A., ESPINOSA A.G., OUAISSI A. *Trypanosoma cruzi*: analysis of cellular and humoral response against a protective recombinant antigen during experimental Chagas'disease. *Immunol. Lett.*, Amsterdam, v.48, p.193-200, 1995.
- TAKEHARA H.A., CARDOSO D.F., SILVA A.M.M., MOTA I. Lytic antibodies elicited by *Trypanosoma cruzi* infection recognizes epitopes present on

both bloodstream trypomastigotes and epimastigotes forms of parasite. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.30, p.351-356, 1988.

TAKLE, G.B. Studies on the cellular immune responses of insects toward the insect pathogen *Trypanosoma rangeli*. *J. Invertebr. Pathol.*, Orlando, v.51, p.64-72, 1988.

TAKLE G.B. ,LACKIE A.M. Investigation of the possible role of hemocyte and parasite surface charge in the clearance of *Trypanosoma rangeli* from the insect hemocoel. *J. Invertebr. Pathol.*, Orlando, v.50, p.336-338, 1987.

TAMBOURGI D.V., CAVINATO R.A., DE ABREU C.M. PERES B.A., KIPNIS T.L. Detection of *Trypanosoma* decay accelerating factor antibodies in mice and humans infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.*, Northbrook, v.52, p. 516-20, 1995.

TAN E.M. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.*, San Diego, v.44, p.93-151, Washington 1989.

TITHERADGE M.A. The enzymatic measurement of nitrate and nitrite. In TITHERADGE M.A(ed) *Methods in Molecular Biology* , New York, 100, 1998, p.83-91.

TORRICO F., HEREMANS H., RIVERA M.T., MARCK E.V., BILLIAU A., CARLIER Y. Endogenous IFN γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.*, Bethesda, v.146, p.3626-3632, 1996.

TOWBIN H., STAEBILIN T., GORDON J. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some

aplications. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA.*, Washington, v.76, p.4350-4354, 1979.

VESPA G.N.R., CUNHA F.Q., SILVA J.S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infect. Immun.*, Washington, v.62, p. 5177-5182, 1994.

VILLALTA F., KIERZENSBAUM F. Cross reactivity of vector borne metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* with mammalian and culture stages. *J. Protozool.*, Lawrence, v.30, p.329-331, 1983.

WATKINS R. Host parasite interaction between *Trypanosoma* species and *Rhodnius prolixus*, Tese de doutorado, Universidade de Bekerley, 1969 cit em Schaub, G.A. 1992.

WHO Chagas disease 2002 http://www.who.int/ctd/chagas_disease.htm Ref.Type Internet Communication.

UMEZAWA E.S., STOLF A.M.S., ZINGALES B. *Trypanosoma cruzi* ; different surface antigens of trypomastigotes are target of lytic antibodies. *Acta Trop.* Amsterdam, v.54,p.42-53, 1993.

YOSHIDA N. *Trypanosoma cruzi* recognition of trypomastigote surface antigens by lytic antisera from mice resistant to acute infection. *Exp. Parasitol.* Orlando, v.61, p.184-191, 1986.

anexo 1

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SAÚDE DA REGIÃO
METROPOLITANA DA GRANDE SÃO PAULO
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
AV. DR. DANTE PAZZANESE, 500 - PRÉDIO I - MACKSQUID - IBIRAPUERA - 04012-180 - S.P.

FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP -N.º DO PROTOCOLO NO CEP: **3121/2002**

(ESTE N.º DEVERÁ CITAR NAS CORRESPONDÊNCIAS REFERENTES A ESTE PROJETO)

INVESTIGADOR PRINCIPAL: **Antonio Marcos de A Levy****TÍTULO DO PROTOCOLO:** "Interação entre Componentes Biológicos de Triatomíneos não Infectados e Soros de Pacientes Chagásicos Crônicos".

O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou o Protocolo de Estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declarando que as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais das resoluções CNS 196/96 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos. Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Solicitamos que enviem relatórios periódicos no decorrer da pesquisa, informando através de relatório final dos resultados obtidos.

Situação: **Aprovado**

São Paulo, 30 de Dezembro de 2002

MEMBROS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DR. PEDRO SILVIO FARSKY	PRESIDENTE
ENFª FERNANDA ANAJAS CALDAS FARIAS	SECRETÁRIA
DR. ANDRÉ ARPAD FALUDI	MEMBRO EFETIVO
PSICª. ANA AUGUSTA MARIA PEREIRA	MEMBRO EFETIVO
ENFª CÉLIA HIROMI SHIOTSU	MEMBRO EFETIVO
DRª CLÁUDIA GRAVINA TADDEI	MEMBRO EFETIVO
SR. HUGO VLADIMIR CAGNONI	MEMBRO EFETIVO
DR. JOÃO MANOEL ROSSI	MEMBRO EFETIVO

Dr. Pedro Silvio Farski
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE

**INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE
CARDIOLOGIA**

ANEXO 1
TERMO DE CONSENTIMENTO

São Paulo, de de

Eu, _____
portador do RG _____ autorizo o pesquisador Antonio Marcos de A.
Levy a utilizar parte do meu sangue que será utilizado para as reações sorológicas
para acompanhamento do meu tratamento em sua pesquisa "Interação entre
componentes biológicos de triatomíneos e soros de pacientes chagásicos"

Fui informado que esta pesquisa pode colaborar para melhorar o diagnóstico
da doença de Chagas em pacientes tratados.

Fui informado, também, que estas pesquisas não modificarão o tratamento
que será realizado dentro da rotina normal.

Se for do meu interesse, poderei ser informado dos resultados que serão
mantidos sob sigilo (segredo) através de código.

Caso não autorize a utilização de meu sangue para esta pesquisa, o
tratamento não será interrompido.

PACIENTE

ANTONIO MARCOS DE A LEVY

RELAÇÃO DE SOROS DE PACIENTE CHAGÁSICOS CRÔNICOS ANTES E APÓS O TRATAMENTO
USADOS NESTE TRABALHO

ANEXO 2

NÚMERO	NOME	DATA	HAI	AD	IFC	IFS	TRAT	PP
220	ARRG	03/12/87		128	1280	160	NT	POSITIVO
7873	ARRG	11/09/02		16	40	80	ROB87	NEGATIVO
2076	AFR	10/03/93	64	32	320	160	NT	NEGATIVO
6432	AFR	19/02/01	32	16	80	20	ROD93	NEGATIVO
2502	^a M.S	05/01/94	64	128	640	320	NT	POSITIVO
7403	^a M.S	08/04/02	32	8	40	20	ROB94	NEGATIVO
2703	BCFS	21/07/94		64	320	320	NT	POSITIVO
7693	BCFS	11/07/02		32	160	40	ROB94	NEGATIVO
2252	CBS	24/06/93	32	128	160	80	NT	NEGATIVO
7220	CBS	07/02/02		16	40	20	ROD93	NEGATIVO
1974	CCS	30/11/92		128	320	320	ROD91	NEGATIVO
2282	CFS	07/07/93	64	128	1280	160	NT	POSITIVO
7964	CFS	17/10/02		64	80	80	ROB93	NEGATIVO
3278	DAD	06/03/96	32	32	320	320	NT	POSITIVO
7090	DAD	18/12/01		64	320	160	ROB96	NEGATIVO
2047	ELJ	17/02/90	32	64	40	20	NT	POSITIVO
7603	ELJ	13/06/02		32	40	20	ROB90	NEGATIVO
3801	E.MS	12/03/97	32	128	320	320	NT	NEGATIVO
6857	E.MS	27/08/01		64	320	80	ROD96	NEGATIVO
2833	EMA	27/01/95		64	1280	320	NT	POSITIVO
7845	EMA	02/09/02		8	20	20	ROB95	NEGATIVO
2249	HLM	23/06/93	64	128	80	160	NT	NEGATIVO
6220	HLM	23/11/00	32	8	40	40	ROD91	NEGATIVO
2837	HGSM	09/02/95	64	64	160	160	NT	NEGATIVO
3294	HGSM	15/03/96	32	16	80	40	ROD95	NEGATIVO
3120	HSM	30/11/95	32	128	320	80	NT	NEGATIVO
5143	HSM	12/08/99	16	64	160	40	ROD95	NEGATIVO
2791	JO	25/11/94	64	128	640	320	NT	POSITIVO
7594	JO	10/06/02		64	160	40	ROB94	NEGATIVO
1994	JLO	16/12/92	64	64	640	320	NT	POSITIVO
7163	JLO	24/01/02		16	80	20	ROB92	NEGATIVO
997	JCR	10/05/89	32	128	2560	160	NT	POSITIVO
7365	JCR	25/03/02		32	80	40	ROB 89	NEGATIVO
2310	JGS	04/08/93	64	128	320	160	NT	POSITIVO
6918	JGS	26/09/01	32	32	160	40	ROB93	NEGATIVO
2339	JCS	02/09/93	64	128	320	160	NT	POSITIVO
6693	JCS	11/06/01		64	40	20	ROB93	NEGATIVO
3099	JAM	22/11/95	32	8	320	320	NT	NEGATIVO
7268	JAM	25/02/02		16	10	10	ROD95	NEGATIVO
2704	LJA	21/07/94		64	320	320	NT	POSITIVO
6477	LJA	08/03/01		32	160	80	ROB94	NEGATIVO
2234	MTF	16/06/93		32	1280	320	NT	POSITIVO
6216	MTF	23/11/00		8	40	20	ROB93	NEGATIVO
2838	NMF	09/02/95		64	320	320	NT	NEGATIVO
7450	NMF	24/04/02		16	40	20	ROD95	NEGATIVO
2708	RP	03/08/94		128	1280	320	NT	POSITIVO
7056	RP	12/12/01		128	160	40	ROB94	NEGATIVO
3746	RR	03/02/97		64	160	160	NT	NEGATIVO
7231	RR	14/02/04		64	160	10	ROD97	NEGATIVO
2887	RRSC	29/03/95		64	320	320	NT	POSITIVO
7055	RRSC	10/12/01		64	80	40	ROB95	NEGATIVO

NÚMERO: NÚMERO DE REGISTRO NO LABORATÓRIO; HAI REAÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA; AD: REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO DIRETA; IFC: IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA COM EPIMASTIGOTAS; IFS: IMUNOFLUORESCÊNCIA In sil tu; PP: PROVA PARASITOLÓGICA XENODIAGNÓSTICA DO INÍCIO DO TRATAMENTO;

ANEXO 2

Doenças autoimunes					
n°	padrão	ifc	ifs		
1	homogêneo	negativo	negativo		
2	fil. Fino	negativo	negativo		
3	fil. Fino	negativo	negativo		
4	fil. grosso	negativo	negativo		
5	homogêneo	negativo	negativo		
6	homogêneo	negativo	negativo		
7	fil. Fino	negativo	negativo		
8	fil. Grosso	negativo	negativo		
soros colhidos entre 1992-1994; glicerinados 1:1					

leishmaniose			HIV		
n°	ifc	ifs	n°	ifc	ifs
43	80	negativo	1	negativo	negativo
64	20	negativo	2	negativo	negativo
72	20	negativo	3	negativo	negativo
5	20	negativo	4	negativo	negativo
95	20	negativo	5	negativo	negativo
62	negativo	negativo	6	negativo	negativo
77	negativo	negativo	7	negativo	negativo
61	negativo	negativo	8	negativo	negativo
73	negativo	negativo	9	negativo	negativo
90	negativo	negativo			

ifc: imunofluorescência com epimastigotas; ifs imunofluorescência in situ com tripomastigotas

DATA DE COLETA SOROS DE HIV 1995 LEISHMANIOSE 1992-1994