

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA INFECÇÃO DE SEIS LINHAGENS ISOGÊNICAS DE CAMUNDONGOS POR TRÊS DIFERENTES CEPAS DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

VIRGINIA ANDRADE, MANOEL BARRAL-NETTO, SONIA G. ANDRADE
& JURACY B. MAGALHÃES

Foram avaliados aspectos da imunidade humoral e celular em seis linhagens de camundongos isogênicos (BALB/c, B-10, C3H, A/J, AKR e DBA) infectados por três cepas do Trypanosoma cruzi, representantes dos três tipos de cepas da classificação de Andrade (cepas Peruana, 21SF e Colombiana). A imunidade celular, avaliada pelo teste de hipersensibilidade cutânea tardia contra antígenos do parasita, estava suprimida. A avaliação dos níveis de imunoglobulinas (imunodifusão radial), mostrou queda precoce de IgG₁ e elevação de IgM em praticamente todas as linhagens infectadas por qualquer das cepas estudadas. A elevação de IgG_{2a} e/ou IgG_{2b} foi mais intensa nas linhagens mais resistentes. Os níveis de anticorpos anti-T. cruzi (Imunofluorescência indireta e ELISA) não se correlacionam com a sobrevivência dos animais. Apesar de diferenças entre as linhagens observou-se uma regularidade na resposta do hospedeiro e a manutenção dos padrões biológicos que caracterizam os tipos de cepa.

Diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*, na sua interação com o animal experimental, provocam manifestações distintas da doença no que diz respeito à parasitemia, à mortalidade e ao quadro histopatológico (Andrade & Figueira, 1970). Isto demonstra uma heterogeneidade no comportamento de diferentes cepas do *T. cruzi* que se manifesta na sua virulência e patogenicidade para o animal experimental. Utilizando diversos parâmetros morfológicos Andrade (1974) propôs a classificação das diferentes cepas em três tipos, segundo as suas características comuns. Verificou-se, também, através da imunoeletroforese, que representantes de cada um dos três tipos de cepas apresentavam grande quantidade de antígenos comuns, mas diferiam entre si em alguns antígenos (Andrade, 1979). Recentemente foi demonstrada uma correlação entre diferenças isoenzimáticas e o comportamento biológico do parasita (Andrade et al., 1981; Andrade, Brodskyn & Andrade, 1983).

As características básicas de uma determinada cepa se mantêm constantes, independente do grau de resistência do hospedeiro (Andrade, Carvalho & Figueira, 1972), bem como do tipo de animal experimental utilizado no estudo (Andrade & Andrade, 1978).

Por outro lado, tem sido visto que linhagens diferentes de camundongos isogênicos diferem quanto à susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (Trischmann et al., 1978; Pecora, 1979; Pecora & Barcinski, 1979; Corsini et al., 1980; Wrightsman, Krasner & Watson, 1982; Trischmann & Bloom, 1982). Ressalta todavia a inexistência de estudos no sentido de verificar se o grau de resistência de uma determinada linhagem sofre influência do tipo de cepa utilizada na infecção.

Na infecção pelo *T. cruzi* há indicações de que diferentes cepas determinam em camundongos suíços não isogênicos, graus diversos de resposta imune (Andrade et al., 1985).

Devido à variação do comportamento biológico de diferentes cepas do *T. cruzi* e à heterogeneidade de linhagens de camundongos, decidimos estudar a evolução da resposta imunológica de diferentes linhagens isogênicas de camundongos no decorrer da infecção por diferentes cepas do *T. cruzi*.

MATERIAL E MÉTODOS

T. cruzi: foram utilizadas três cepas dos tipos: I (Cepa Peruana), Tipo II (Cepa 21 SF) e Tipo III (Cepa Colombiana), de acordo com classificação proposta por Andrade (1974). As características e procedências das mesmas já foram descritas anteriormente (Andrade, Brodskyn & Andrade, 1983).

Animais: foram utilizados camundongos isogênicos de ambos os sexos, com peso entre 13 e 17g, provenientes e mantidos na colônia do CPqGM/FIOCRUZ, e alimentados livremente com ração comercial. As cepas utilizadas foram A/J (H-2^a), AKR (H-2^k), C3H/He (H-2^k), BALB/c (H-2^d), C57B1/10 (B-10; H-2^b) e DBA/1 (H-2^q). De cada linhagem foram infectados 60 animais (20 para cada cepa do *T. cruzi*).

Infecção experimental: camundongos foram inoculados intraperitonealmente com 10⁵ tripomastigotas sangüícolas obtidos de camundongos suíços. Os parasitos foram separados dos elementos figurados do sangue citratado por centrifugação e lavados três vezes em salina tamponada pH 7.2. Análise diária da parasitemia foi feita em amostra de cinco animais por grupo experimental, a partir do terceiro dia de infecção,

através do método de Pizzi & Prager (1952), modificado por Brener (1961); foi feito o registro diário do número de animais mortos e o cálculo da mortalidade com exclusão dos animais sacrificados.

Os animais foram sacrificados nos dias 7, 10, 12, 14, 20, 25 e 27 pós-infecção. O sangue obtido através da secção dos vasos axilares foi deixado coagular durante 30 minutos em temperatura ambiente e o mesmo tempo a 4°C. Os soros foram separados após centrifugação (1.000 g por 5 min.) e armazenados a -20°C até o uso. Amostras de cada dia foram testadas em "pool" para cada grupo experimental. Fragmentos de miocárdio, músculo esquelético, baço e fígado foram retirados nos mesmos períodos, incluídos em parafina e secções de 4 µm de espessura, foram coradas pela Hematoxilina-Eosina, para estudo histopatológico.

Teste de hipersensibilidade cutânea tardia: o antígeno utilizado foi obtido de epimastigotas, das mesmas cepas do *T. cruzi* utilizadas para a infecção, através de cultivo em meio de Warren. Após lavar três vezes em salina tamponada com fosfato, os parasitos foram submetidos a congelamento, descongelamento em nitrogênio líquido e utilizado o sobrenadante da centrifugação a 200x g por 5 minutos. A concentração proteica foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) e ajustada para 2 mg/ml. Cada animal recebeu 50 µg do antígeno, injetados subcutaneamente na face ventral da pata trazeira. Igual volume de salina foi injetada na pata contra-lateral. A espessura das patas foi avaliada com micrômetro (Starret, Athol, Mass.) antes da injeção do antígeno e 24 e 48 horas após.

Dosagem de imunoglobulinas: a determinação dos níveis séricos de IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgM foi feita pela técnica de imunodifusão radial, (Mancini, Carbonara & Heremans, 1965; Fahey & Mc Kelvey, 1965) utilizando-se placas adquiridas no Meloy Laboratories Inc., USA. Para obtenção da curva de referência foi utilizado soro padrão do mesmo fornecedor (j-401). Para análise determinou-se a razão entre os resultados obtidos e os valores normais para cada linhagem (ambos em mg/dl) expressando-os como índice de elevação.

Titulação de anticorpos específicos anti-*T. cruzi*: imunofluorescência indireta foi feita segundo técnica descrita por Camargo (1979). Foi utilizado anti-soro fluoresceinado anti-IgG e anti-IgM adquirido da Cappel Laboratories, USA. O antígeno de parasita, preparado como para o teste de hipersensibilidade cutânea tardia, foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,06M; pH 9,5) para a concentração de 10 µg/ml e empregado no teste de ELISA. Utilizaram-se 100 µl por poço (3 horas a 37°C, e a 4°C até a hora de uso) para a sensibilização das placas de microtítulo (Limbro, Hamden, CT). Diluições dos soros foram incubadas em volumes de 0,1 ml/poço, a 37°C por uma hora. IgG de coelho anti-IgG de camundongo conjugada à peroxidase (Sigma, St. Louis, MO) foi utilizada na diluição de 1:1000. Ortofenilenediamina serviu como substrato. Após a incubação no escuro por 30 minutos, acrescentou-se 0,05 ml/poço de ácido sulfúrico (8N) para interrupção da reação. A densidade óptica (492 nm) foi lida em espectrofotômetro apropriado (Titertek multiskan).

Análise estatística: associação de parâmetros foi investigada pelo teste de adequação da curva para uma correlação linear. A parasitemia sofreu transformação logarítmica e com os dados de mortalidade calculou-se a média harmônica da sobrevivida em cada grupo.

RESULTADOS

Variação dos níveis de Ig no curso da infecção: níveis normais de imunoglobulinas (Ig) nas diversas linhagens de camundongos foram obtidos após a dosagem em placa de Mancini, utilizando-se camundongos não infectados da mesma colônia. Os dados da Tabela I expressam a realização de quatro testes, nos quais foram utilizados cerca de cinco animais por teste, para cada linhagem. Nos animais infectados os níveis de Ig foram analisados após transformação para índice de elevação. A infecção pelo *T. cruzi* leva a variações nos níveis de Ig circulantes em todas as linhagens, qualquer que seja a cepa empregada (Tabelas II, III, IV).

TABELA I

Valores das imunoglobulinas, em mg/dl obtidos através do teste de imunodifusão radial quantitativa em seis grupos de cinco camundongos normais por linhagem

Imunoglobulinas (mg/dl)	Linhagens	Grupos					
		AKR	A/J	BALB/c	C3H	DBA	B10
IgG ₁	X(a)	272.1	697.8	237.9	180.1	497.8	310.0
	s (b)	42.6	144.6	5.9	40.9	138.2	127.3
IgG _{2a}	X	179.8	227.1	146.7	105.64	227.1	120.6
	s	26.8	133.8	20.1	78.1	133.8	56.9
IgG _{2b}	X	57.9	58.8	14.34	14.17	14.17	78.9
	s	2.4	3.6	0.0	0.25	0.25	50.7
IgM	X	7.96	5.79	5.79	5.79	7.7	11.4
	s	0.8	0.15	0.15	0.15	0.47	0.45

(a) média; (b) desvio padrão.

TABELA II

Variação temporal dos níveis de imunoglobulinas (índice de elevação) de camundongos infectados pela cepa peruana

Dias infecção	IgG ₁						IgG _{2a}					
	C3H	DBA	AKR	B10	BALB/c	A/J	C3H	DBA	AKR	B10	BALB/c	A/J
7	0.30	0.42	0.21	0.71	0.23	0.16	1.52	0.71	0.70	1.33	0.41	0.27
10	0.12	0.18	0.21	0.35	0.07	0.13	1.52	1.42	0.70	1.33	1.64	0.71
12	0.12	0.18	0.17	0.27	0.07	0.16	3.04	2.83	1.72	2.67	1.10	1.06
15			0.21	0.17	0.07	0.16			3.45	5.34	0.82	0.42

Dias infecção	IgG _{2b}						IgM					
	C3H	DBA	AKR	B10	BALB/c	A/J	C3H	DBA	AKR	B10	BALB/c	A/J
7	0.76	3.24	0.85	0.73	0.75	0.13	0.59	4.58	5.15	0.30	0.59	2.03
10	0.76	3.24	1.02	0.36	1.00	0.31	0.59	4.58	5.15	0.52	1.02	2.03
12	0.76	4.21	1.62	0.54	1.00	0.39	1.02	4.58	5.15	2.06	2.03	3.04
15			1.92	0.54	0.50	0.31			5.15	2.06	1.02	2.01

TABELA III

Variação temporal dos níveis de imunoglobulinas (índice de elevação) de camundongos infectados pela cepa São Felipe

Dias infecção	IgG ₁						IgG _{2a}					
	C3H	DBA	AKR	B10	BALB/c	A/J	C3H	DBA	AKR	B10	BALB/c	A/J
7	2,44	0,33	0,15	0,71	0,92	0,06	0,40	N.D.	0,42	1,29	1,10	0,09
10	0,31	0,33	0,07	0,17	0,92	0,04	0,59		0,31	0,63	1,64	0,13
12	0,23	0,22	0,10	0,13	1,85	0,07	0,76		0,86	2,67	2,19	0,19
14	0,31	0,16	0,10	0,26	0,69	0,06	0,76		3,58	5,34	3,29	0,27
20	0,61	0,22		0,13	1,84	0,32	1,52		3,58	2,67	4,39	0,71
25	1,83	0,22		0,35	1,39	1,26	6,09			24,54	4,39	5,67
27	1,22	0,44		1,42	2,77	1,26	6,09			10,67	3,29	5,67

Dias infecção	IgG _{2b}						IgM					
	C3H	DBA	AKR	B10	BALB/c	A/J	C3H	DBA	AKR	B10	BALB/c	A/J
7	3,16	6,07	1,68	2,53	1,28	0,47	5,7	2,73	3,84	3,71	3,04	1,84
10	1,94	7,34	1,45	1,45	2,12	0,47	5,7	1,30	3,84	2,47	3,04	1,84
12	2,35	6,07	1,68	1,45	2,12	0,47	5,7	2,73	3,84	4,95	8,11	2,64
14	2,87	8,04	2,93	2,18	2,12	0,47	5,7	5,97	5,25	6,60	4,06	2,64
20	3,16	10,16	2,93	1,24	4,0	0,95	7,96	3,64	7,08	3,71	4,06	4,06
25	3,93	12,14		2,91	3,20	1,95	5,7	1,69		11,54	6,09	8,12
27	3,93	12,21		2,91	16,0	0,95	7,96	3,64		11,54	16,23	5,68

Em todos os casos ocorre queda da IgG₁ a níveis abaixo do normal. Esta diminuição, na maioria dos casos, é precoce (entre o 3º e 7º dia), observando-se uma tendência à recuperação nas cepas cuja infecção é mais prolongada (25 a 30 dias), como nas cepas 21 SF e Colombiana.

Os níveis de IgG_{2a} mostram uma queda no início da infecção (até 10-14 dias pós infecção), seguida de um aumento progressivo, chegando a atingir níveis muito elevados. Análise do ponto de vista da cepa infectante mostra que a 21 SF induz altos níveis de IgG_{2a}. Em relação às linhagens de camundongo observa-se que os animais B-10 produzem os níveis mais altos (com qualquer cepa), e que os animais A/J têm sempre níveis abaixo do normal (exceto na infecção pela cepa 21 SF).

A infecção pela cepa Peruana determina um decréscimo inicial nos níveis de IgG_{2b}, com uma tendência de aumento nos AKR. Na infecção por esta cepa somente os animais DBA apresentam elevação dos níveis de IgG_{2b}. A cepa São Felipe determina um aumento inicial e constante dos níveis de IgG_{2b}. Na infecção pela cepa Colombiana os camundongos A/J e C3H apresentam níveis baixos de IgG_{2b}. Os outros animais apresentam uma elevação precoce e constante dos níveis desta subclasse.

A IgM apresenta, na maioria dos casos, um aumento precoce e mantido no decorrer da infecção.

TABELA IV

Variação temporal dos níveis de imunoglobulinas (índice de elevação) de camundongos infectados pela cepa colombiana

Dias infecção	IgG ₁						IgG _{2a}					
	C3H	DBA	AKR	B10	BALB/c	A/J	C3H	DBA	AKR	B10	BALB/c	A/J
7	0.12	0.42	0.34	1.42	0.46	0.06	0.76	0.70	0.89	0.63	1.10	0.09
10	2.44	0.98	0.77	0.35	0.40	0.03	2.28	0.53	0.89	0.63	1.10	0.07
12	0.12	0.66	0.77	0.35	0.92	0.03	0.76	0.88	0.67	0.63	2.19	0.07
15	0.30	0.42	1.21	0.71	1.35	0.04	2.28	2.13	2.68	1.29	4.39	0.19
20	0.61	0.24	1.21	0.35	1.85	0.08	3.04	2.82	1.19	2.67	4.39	0.71
25	1.22	0.98		0.35			6.09	4.23		10.67		

Dias infecção	IgG _{2b}						IgM					
	C3H	DBA	AKR	B10	BALB/c	A/J	C3H	DBA	AKR	B10	BALB/c	A/J
7	0.50	3.18	1.30	2.18	1.60	0.39	0.59	4.42	4.34	1.84	4.06	2.64
10	0.76	3.46	1.63	1.45	1.28	0.33	1.02	4.41	4.43	1.84	3.04	1.84
12	0.50	4.16	2.50	1.45	2.12	0.39	1.02	5.19	5.14	1.84	4.06	2.64
15	0.76	4.23	2.50	1.74	3.20	0.47	1.02	6.10	8.86	2.47	4.06	2.64
20	1.01	5.29	3.69	2.53	8.00	0.76	0.59	6.10	8.86	4.95	6.09	4.06
25	2.02	5.93		1.74			2.03			4.95		

Comparando-se numa mesma linhagem a infecção pelas três diferentes cepas verifica-se que os maiores níveis de imunoglobulinas são encontrados quando da infecção pela cepa 21 SF, em todos os casos com exceção da linhagem AKR, na qual as imunoglobulinas aumentam mais na infecção pela cepa Colombiana.

Quando são comparadas as diferentes linhagens entre si observa-se que os camundongos A/J apresentam sempre os níveis mais baixos de imunoglobulinas (com exceção de IgM) na infecção por qualquer das três cepas. A linhagem B-10 responde com os maiores níveis de IgG_{2a}, enquanto que os camundongos DBA apresentam mais respostas de IgG_{2b}, qualquer que seja a cepa utilizada na infecção.

Estudo histopatológico – Infecção pela cepa Peruana: em todas as linhagens observou-se parasitismo precoce e predominante de macrófagos em baço, fígado e tecido adiposo de sustentação. O parasitismo e o infiltrado inflamatório de coração e de músculo esquelético variam de discreto a moderado durante a evolução da infecção nos diversos grupos. **Infecção pela cepa 21 SF:** parasitismo de miocárdio e de músculo esquelético foi sempre discreto a moderado nas diversas linhagens sendo que as lesões inflamatórias variaram de intensidade e de constituição celular de uma linhagem para outra, com acentuadas lesões necróticas de fibras musculares esqueléticas independentes do grau de parasitismo. Nas linhagens A/J e AKR a necrose de fibra não parasitada ocorre sem reação ou corresponde a infiltrado mononuclear; nas linhagens DBA, BALB/c e B-10, ao lado de extensas áreas de necrose de fibras musculares sem parasitos, há intenso processo inflamatório com mononucleares e polimorfonucleares neutrófilos. Em todas as linhagens a destruição de fibras parasitadas corresponde à presença de exsudato de polimorfonucleares neutrófilos. **Infecção pela cepa Colombiana:** as lesões foram semelhantes nas seis linhagens, variando apenas o grau de parasitismo e a intensidade do processo inflamatório. O menor parasitismo e menor reação foram observados nas linhagens C3H e DBA. Nas linhagens BALB/c, AKR e B-10, o parasitismo variou de moderado a intenso com acentuada resposta inflamatória à rotura de ninhos parasitários, com exsudato de polimorfonucleares neutrófilos. A linhagem A/J, apesar do intenso parasitismo, apresentou infiltrado inflamatório mononuclear discreto.

Estado reacional do baço: em todas as linhagens, à infecção pelas três diferentes cepas, observou-se um estado reacional do baço, caracterizado por aumento da celularidade da polpa vermelha por infiltração de linfócitos, plasmócitos e macrófagos e hiperplasia dos centros germinais dos folículos linfóides com a presença de células blásticas e macrófagos. A intensidade da hiperplasia dos centros germinais variou de acordo com a cepa do parasito e com a linhagem do camundongo: na infecção pela cepa Peruana a reação foi mais intensa nas linhagens BALB/c, C3H, AKR e A/J e moderada nas linhagens DBA e B-10; na infecção pela cepa 21 SF, foi intensa nas linhagens C3H, BALB/c e AKR e moderada nas linhagens DBA, B-10 e A/J; na infecção pela cepa Colombiana, a hiperplasia dos centros germinais foi intensa nas linhagens C3H, BALB/c e AKR e discreta nas linhagens DBA, B-10 e A/J. Nos camundongos das linhagens C3H, DBA e BALB/c, infectados com a cepa Peruana, foi observada reação granulomatosa epitelióide na polpa vermelha do baço (Fig. 1a). Observou-se em todos os animais infectados, depleção de linfócitos do manguito periarteriolar dos folículos linfóides (Fig. 1b).

Correlação entre níveis de Ig e parasitemia: analisou-se através do teste de correlação linear, os dados de variação da parasitemia e das imunoglobulinas. Na infecção pela cepa Peruana, na maioria dos casos, não se pôde estabelecer uma correlação significativa. Na infecção pela cepa Colombiana, em todas as linhagens, pôde-se encontrar uma relação significativa ($p < 0.05$) entre aumento do número de parasitos circulantes e aumento da concentração sérica de uma ou mais subclasses de imunoglobulina. Em relação à cepa 21

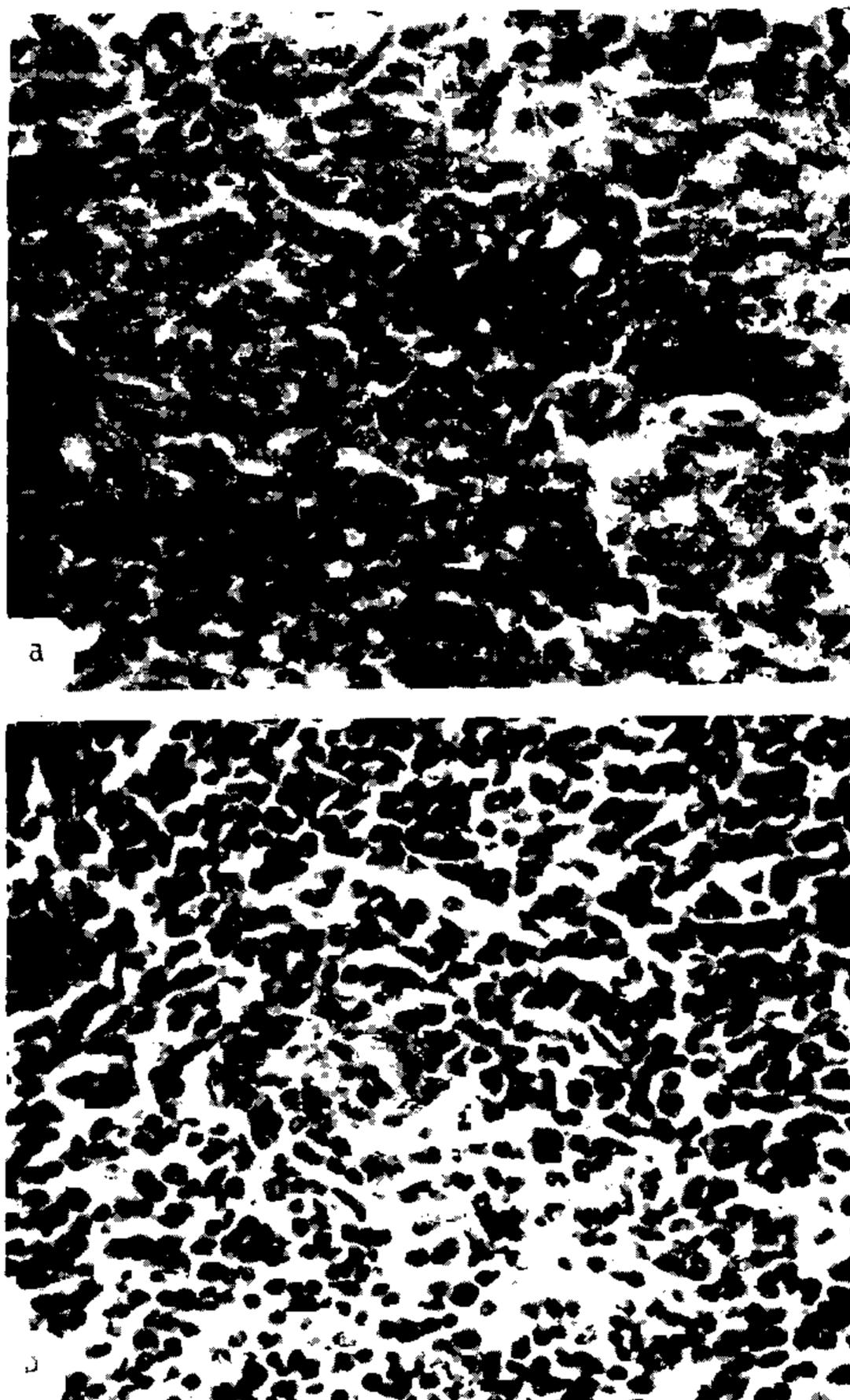


Fig. 1: a – Cepa Peruana – reação granulomatosa epitelióide da polpa vermelha do baço (400X); b – Cepa Peruana – depleção de linfócitos do manguito periarteriolar do folículo linfóide.

SF a correlação entre os níveis de Ig e a parasitemia foi significativa nas linhagens DBA e AKR. É interessante notar que, em quase todos os casos em que foi observada correlação entre variação do IgG_1 e de parasitemia, nas cepas Peruana e São Felipe, esta foi uma correlação negativa. Isto é, o aumento da parasitemia se correlaciona com uma diminuição da imunoglobulina.

Índices de mortalidade: considerando-se o tempo médio de sobrevivência dos camundongos nas diversas linhagens, infectados por cada uma das cepas, foi possível determinar um espectro resistência-susceptibilidade das linhagens estudadas. Foi exceção a infecção pela cepa do Tipo I (Peruana), a qual determinou mortalidade de 100% em todas as linhagens no mesmo período de tempo. Na infecção pela cepa do Tipo II (21 SF) os camundongos AKR foram extremamente susceptíveis (100% de mortalidade até o 20º dia de infecção) enquanto os B-10 sobreviveram à fase aguda. Já na infecção pela cepa Colombiana (Tipo III) a linhagem A/J foi a mais susceptível, enquanto os animais DBA foram os mais resistentes.

Correlação entre níveis de Ig e sobrevivência – Cepa Peruana: em vista da mortalidade precoce, os animais foram acompanhados somente até o 12º dia, quando ainda não havia níveis apreciáveis de elevação das subclasses de imunoglobulinas. *Cepa 21 SF:* há nítida correlação entre os níveis mais elevados das IgG_{2a} e IgG_{2b} com o maior grau de resistência, nas linhagens B-10 e DBA, sendo que o maior grau de correlação está relacionado com a fração IgG_{2a} . *Cepa Colombiana:* observou-se uma nítida correlação entre o maior grau de resistência da linhagem DBA e os níveis mais elevados das imunoglobulinas das classes IgG_{2a} e IgG_{2b} .

Os níveis de IgM estão elevados em todas as linhagens infectadas com qualquer das cepas, não parecendo haver nenhuma correlação entre esta imunoglobulina e o grau de resistência à infecção.

Os níveis de IgG₁ se mantiveram sempre abaixo do normal, não se podendo fazer qualquer correlação com o grau de resistência.

Correlação entre níveis de Ig e lesões tissulares: considerando-se a infecção por cada uma das cepas do *T. cruzi*, em relação às diferentes linhagens de camundongos, foi observado um certo grau de correlação entre a elevação das frações IgG_{2a} e a intensidade das lesões. *Cepa Peruana*: pôde-se verificar que à elevação dos níveis de IgG_{2a} nas linhagens C3H, DBA, BALB/c e B-10 correspondeu uma fase de intensificação do parasitismo tissular e do maior grau de lesão inflamatória no 10º e 12º dias de infecção. O aumento de IgG_{2b} não parece ter correlação com o grau de lesão, pois, nos camundongos DBA, o aumento desta imunoglobulina ocorre antes de haver lesão tissular. Também não parece haver correlação entre o aumento de IgM e as lesões tissulares pois esta aumenta apenas na linhagem DBA e AKR, em uma fase precoce, antes do aparecimento das lesões; parece entretanto se correlacionar com o grau de reação do baço, que apresenta o máximo de intensidade na linhagem AKR, coincidindo com os maiores níveis de IgM. *Cepa 21 SF* (São Felipe): observa-se que as lesões tissulares mais intensas coincidem com os níveis elevados de IgG_{2a}, a partir do 20º dia na linhagem C3H; do 15º dia na linhagem BALB/c; no 14º dia na linhagem AKR, no 20º dia na linhagem A/J; na linhagem B-10, o aumento de IgG_{2a} ocorre a partir do 14º dia coincidindo com a acentuação das lesões, na linhagem A/J o aumento de IgG_{2a} ocorre a partir do 23º dia concomitantemente com lesões tissulares intensas sendo que a IgG_{2b} não mostra qualquer aumento. Não parece haver coincidência entre aumento de IgG_{2b} e o grau de lesão tissular, observando-se com as demais linhagens, aumento desta, sem coincidente lesão tissular, nas fases iniciais da infecção. O nível de IgM está elevado em todo o curso da infecção com as diferentes linhagens e parece estar correlacionado com o estado reacional do baço. *Cepa*

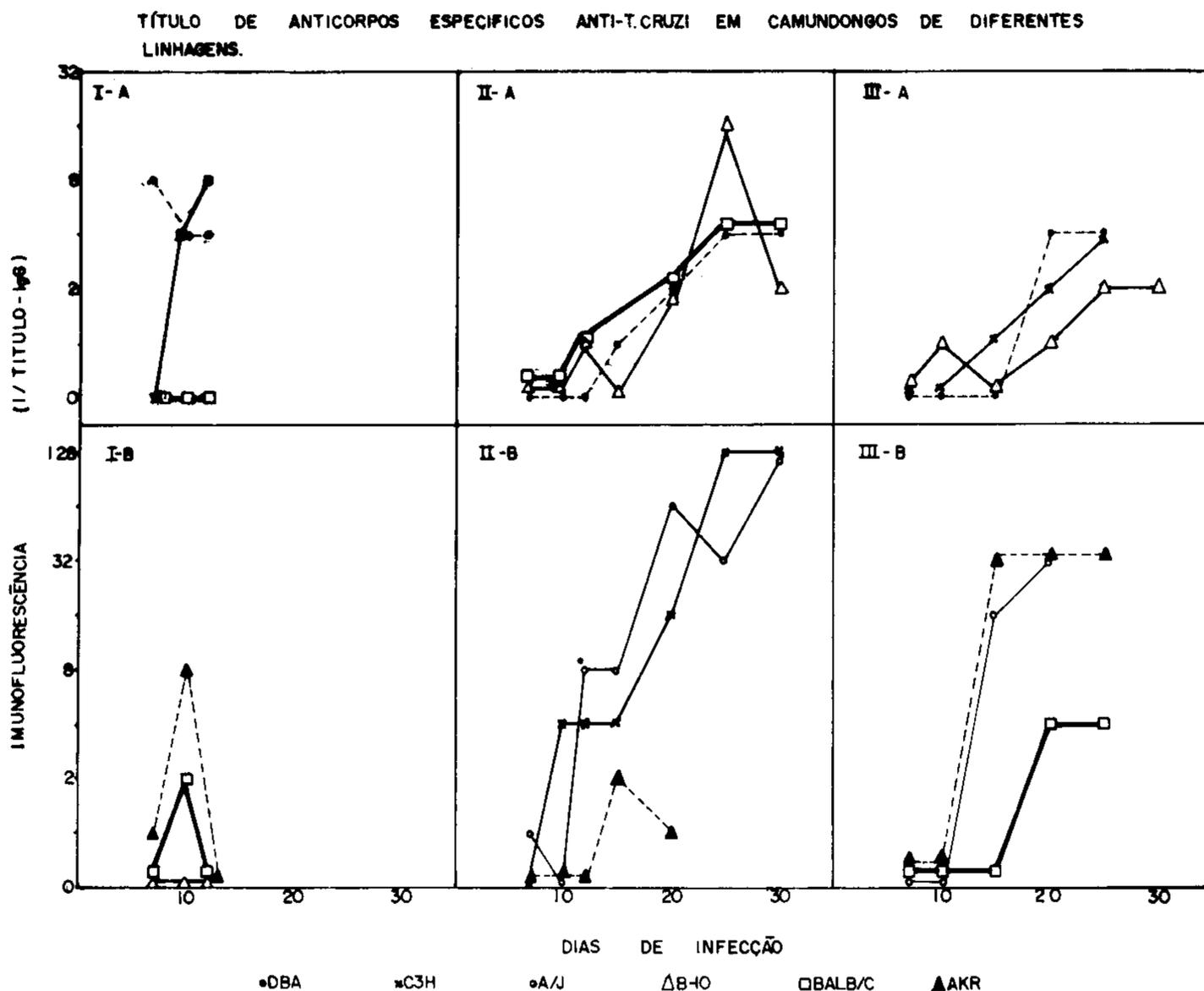


Fig. 2: variação temporal do título de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* (imunofluorescência indireta) em seis linhagens de camundongos infectados pelas cepas Peruana (I-A e I-B), 21 SF (II-A e II-B) e Colombiana (III-A e III-B). Painéis A representam as linhagens resistentes, e B as susceptíveis (em relação à média de sobrevivência dos animais).

Colombiana: o maior parasitismo tissular e o maior grau de lesão coincidem com a elevação das frações IgG_{2a} e IgG_{2b}, nos animais das linhagens C3H, DBA, BALB/c, B-10 e AKR. (O aumento de IgG_{2b} coincide em muitos casos com ausência de lesões, numa fase precoce.) Os níveis de IgM estão elevados desde as fases iniciais da infecção, não mostrando correlação com as lesões tissulares; há entretanto uma correlação entre os níveis de IgM e o estado reacional do baço.

Teste de hipersensibilidade cutânea tardia: o teste foi negativo em todas as linhagens no curso da fase aguda da infecção pelas três cepas do *T. cruzi*.

Anticorpos anti-*T. cruzi*: a infecção pelas diferentes cepas do *T. cruzi* induz títulos variáveis de anticorpos específicos em todas as linhagens de camundongos estudados. De maneira geral a cepa do Tipo II, 21 SF, induz títulos de anticorpos mais elevados, em qualquer uma das linhagens, que as cepas dos Tipos I e III (Fig. 2).

Os níveis de anticorpos específicos (IFI e ELISA) não demonstraram relação com os níveis de Ig total verificados pelo teste de Mancini. Em alguns casos foram verdadeiramente contrastantes. Por exemplo, os camundongos A/J, com menores médias de imunoglobulinas, são os que apresentam os maiores títulos de anticorpos específicos na infecção pela cepa 21 SF, tanto para IgM quanto para IgG.

No teste de ELISA os melhores resultados foram obtidos quando as placas foram sensibilizadas com antígenos da cepa 21 SF independentemente da cepa infectante.

Não se observou correlação entre a resistência das diversas linhagens e os títulos de anticorpos específicos. A Fig. 3 mostra que camundongos resistentes, como o B-10 podem desenvolver níveis bem menores de anticorpos anti-*T. cruzi* (IFI e ELISA) que camundongos A/J, altamente susceptíveis.

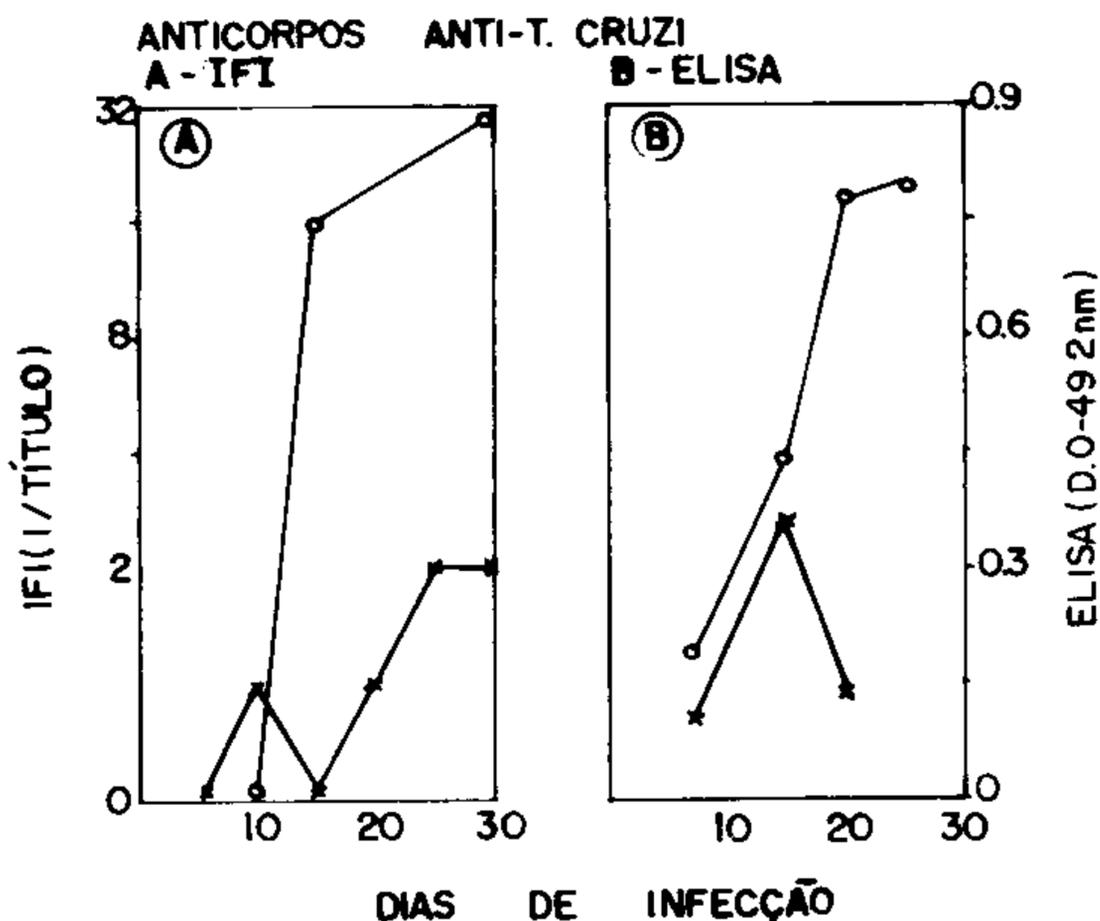


Fig. 3: comparação dos níveis de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* obtidos pelo método de IFI (painel A) ou ELISA (painel B) em camundongos susceptíveis, A/J (0), ou resistentes, B-10 (x), infectados pela cepa Colombiana.

COMENTÁRIOS

Através do estudo da variação dos níveis de quatro subclasses de imunoglobulinas e dos títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* no curso da infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos por cepas de três diferentes tipos do *T. cruzi*, podemos concluir que a resposta imune do hospedeiro é influenciada por características do parasita, confirmando observação anterior de que embora determinem o mesmo tipo de resposta no camundongo suíço, as diferentes cepas determinam acentuadas diferenças no início, na intensidade e na evolução destas alterações (Andrade et al., 1985). Baseados na observação de que os tipos de cepas deste parasita possuem constituição antigênica diferente (Andrade et al., 1981) uma estimulação diferenciada do sistema imune é um resultado esperado.

As observações de que predominam os níveis mais baixos de imunoglobulina na infecção pela cepa Peruana ao tempo em que os níveis mais elevados ocorrem na infecção pela cepa 21 SF apontam para a importância da cepa do parasito no curso da infecção.

Os aumentos dos níveis de Ig não se correlacionam de maneira segura com os níveis de anticorpos específicos. Provavelmente o parasita determina uma ativação inespecífica de clones de linfócitos B, produtores de anticorpos não relacionados. Na infecção pelas cepas 21 SF ou Colombiana os níveis de IgG_{2a} e IgG_{2b}, na maioria dos casos são mais elevados que os de IgG₁. Isto sugere uma participação de células T auxiliaadoras na estimulação inespecífica de linfócitos B (Mongini, Stein & Paul, 1981; Mongini, Paul & Metcalf, 1982).

Nossos dados mostram que níveis elevados de IgG_{2a} e/ou IgG_{2b} se correlacionam com uma maior sobrevivência dos animais infectados por qualquer uma das três cepas do *T. cruzi*. É importante ressaltar que IgG_{2a} e IgG_{2b} são as subclasses que parecem estar envolvidas na proteção humoral contra o *T. cruzi* (Takehara, 1980) e são capazes de mediar a lise de *T. cruzi* pela ativação do sistema Complemento (Stefani, Takehara & Mota, 1983). É possível que a estimulação preferencial, mesmo inespecífica, deste setor da resposta humoral, indique uma tendência a montar uma resposta protetora, a qual pode ser importante na passagem da fase aguda para a crônica.

A nossa observação de que níveis elevados de IgG_{2a}, mas não de IgG_{2b}, coincidem, cronologicamente, com o aparecimento e o aumento da intensidade das lesões necróticas-inflamatórias nos tecidos ainda não havia sido estabelecida e merece investigação a possibilidade de que a IgG_{2a} seja mais eficiente na ativação do sistema Complemento ou de que seja mais ativa em mediar reações de citotoxicidade.

A diminuição de IgG₁ como fenômeno constante em todas as linhagens infectadas pelas três cepas do *T. cruzi* é um dado interessante. Diminuição dos níveis de IgG₁ e IgE havia sido observada no curso da fase aguda experimental da doença de Chagas (Pereira Mendes, Takehara & Mota, 1979). Diminuição desta subclasse poderia ser explicada por uma absorção pela superfície do parasita, ou uma ausência de atividade auxiliadora do linfócito T, já que IgG₁ é a única subclasse das imunoglobulinas de camundongos com características de produção timo-dependente (Torrighiani, 1972).

Nossos dados demonstram uma ausência de resposta imunocelular específica contra antígeno do parasita. Imunossupressão na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, é um achado constante e vários mecanismos têm sido propostos para sua explicação (Reed, Larson & Speer, 1977; Clinton et al., 1975; Cunningham, Craig & Kuhn, 1978). Em trabalho anterior (Andrade et al., 1985) observamos também uma marcante depleção do setor T-dependente a nível do baço.

O presente trabalho confirma observações anteriores de que as características intrínsecas do parasito se constituem em importante fator no curso da infecção pelo *T. cruzi*, condicionando a resposta do hospedeiro no que diz respeito à sua resistência, ao quadro anátomo-patológico e ao quadro humoral. Prova disto é o comportamento das cepas Peruana (Tipo I) e Colombiana (Tipo III) que reproduziram em todas as linhagens, o seu padrão de comportamento, não só quanto ao padrão da parasitemia e da mortalidade como ao quadro das lesões histopatológicas. A cepa 21 SF (Tipo II) conservou também o seu padrão geral de comportamento porém sem reproduzir o intenso miocardiotropismo observado na infecção de camundongos suíços e, além disto, determinando em todas as linhagens lesões musculares necróticas (não vistas nos suíços). Estas peculiaridades, observadas em todas as linhagens, parecem estar na dependência da própria cepa.

Chama a atenção a observação de que uma mesma linhagem isogênica pode apresentar diferentes graus de resistência de acordo com o tipo de cepa utilizado na inoculação. Entretanto os nossos dados também evidenciam o importante papel do hospedeiro e a análise das diferentes linhagens, à infecção pelos três tipos de cepas, mostra uma certa regularidade de comportamento e assim é que as linhagens DBA e B-10 são em geral mais resistentes enquanto os AKR e A/J são mais susceptíveis. Estes graus de resistência até certo ponto estão relacionados com os níveis de IgG_{2a} e IgG_{2b} produzidos pelas diferentes linhagens e com o tipo intensidade do exsudato inflamatório que as mesmas desenvolvem.

SUMMARY

We evaluated humoral and cellular immune responses in 6 inbred mouse strains (BALB/c, B-10, C3H, A/J, AKR and DBA) infected with 3 *Trypanosoma cruzi* strains (Peruvian, 21 SF and Colombian), which are the standards for the 3 strains Types of Andrade's classification. Negative delayed-type hypersensitivity reactions to parasite antigens were evidence of suppressed cell-mediated immunity. An early drop of IgG₁ and rise of IgM levels were observed in almost all mouse strains infected by any *T. cruzi* strain. Elevation of IgG_{2a} and/or IgG_{2b} levels was higher in resistant mouse strains. Anti-*T. cruzi* antibody levels (Indirect immunofluorescence and ELISA) did not correlate with survival. Despite some differences among mouse strains there was a definition of an overall pattern of host response and the maintenance of biological standards which characterize the basic types of *T. cruzi* strains.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, S.G., 1974. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isolados no Recôncavo Baiano (contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). *Rev. Pat. Trop.*, 3 :65-121.
- ANDRADE, S.G., 1979. Patologia da doença de Chagas experimental: o problema das cepas do *T. cruzi* e sua relação com a resposta aos quimioterápicos. *Rev. Med. Bahia*, 25 :256-261.
- ANDRADE, S.G. & ANDRADE, Z.A., 1978. Estudo comparativo das lesões produzidas por uma cepa do *T. cruzi* no homem e em outros vertebrados. Anais da V Reunião Anual sobre pesquisa básica em doença de Chagas, Caxambu-MG.
- ANDRADE, S.G.; ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; MAGALHÃES, J.B. & BARRAL NETTO, M., 1985. Immunological response of swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* Vol. 79(3), in press.
- ANDRADE, S.G.; ANDRADE, V.; ROCHA FILHO, F.D. & BARRAL NETTO, M., 1981. Análise antigênica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 23 :245-250.
- ANDRADE, S.G.; CARVALHO, M.L. & FIGUEIRA, R.M., 1972. Comportamento de uma cepa do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros com baixa resistência. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 14 :154-161.
- ANDRADE, S.G. & FIGUEIRA, R.M., 1970. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gaz. Méd. Bahia*, 70 :32-42.
- ANDRADE, V.; BRODSKYN, C. & ANDRADE, S.G., 1983. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *T. cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77 :796-799.
- BRENER, Z., 1961. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. Tese. Belo Horizonte.

- CAMARGO, M.E., 1979. Diagnóstico de laboratório. In: Brener, Z. & Andrade, Z.A., eds. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 175-198.
- CLINTON, B.A.; ORTIZ-ORTIZ, L.; GARCIA, W.; MARTINEZ, T. & CAPIN, R., 1975. *Trypanosoma cruzi*: early immune response in infected mice. *Exper. Parasitol.*, 37 :417-425.
- CORSINI, A.C.; COSTA, M.G.; OLIVEIRA, O.L.P.; CAMARGO, I.J.B. & STELINI JR., A., 1980. Susceptibility of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* strain Y. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 22 :192-196.
- CUNNINGHAM, D.S.; CRAIG, W.H. & KUHN, R.E., 1978. Reduction of complement levels in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.*, 64 :1044-1049.
- FAHEY, J.L. & MC KELVEY, E.M., 1965. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immunol.*, 94 :84.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 :265-275.
- MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMANS, J.F., 1965. Immunological quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2 :235.
- MONGINI, P.K.A.; PAUL, W.E. & METCALF, E.S., 1982. T cell regulation of immunoglobulin class expression in the antibody response to trinitrophenyl-ficoll. Evidence for T cell enhancement of the immunoglobulin class switch. *J. Exper. Med.*, 155 :884-902.
- MONGINI, P.K.A.; STEIN, K.E. & PAUL, W.E., 1981. T cell regulation of IgG subclass antibody production in response to T-independent antigens. *J. Exper. Med.*, 153 :1-12.
- PÉCORA, I.L., 1979. Susceptibilidade e resistência à infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*: aspectos genéticos e quantitativos da interação parasito/hospedeiro. Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- PÉCORA, I.L. & BARCINSKI, M.A., 1979. Genetic control of the mechanisms of resistance against experimental *T. cruzi* infection. I. Role of the macrophages in resistant and susceptible strains of mice. *Rev. Bras. Biol.*, 39 :445-450.
- PEREIRA MENDES, R.; TAKEHARA, H.A. & MOTA, I., 1979. *Trypanosoma cruzi*: homocytotropic antibody response in mice immunized with unrelated antigens. *Exper. Parasitol.*, 48 :345-351.
- PIZZI, T. & PRAGUER, R., 1952. Inmunidad a la sobreinfección induzida mediante cultivos de *Trypanosoma cruzi* de virulência atenuada. *Bull. Inf. Parasitol. Chilenas*, 7 :20-21.
- REED, S.G.; LARSON, C.L. & SPEER, C.A., 1977. Suppression of cell-mediated immunity in experimental Chagas' disease. *Z. Parasitenk.*, 52 :11-17.
- STEFANI, M.M.A.; TAKEHARA, H.A. & MOTA, I., 1983. Isotype of antibodies responsible for immune lysis in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Immunol. Letters*, 7 :91-97.
- TAKEHARA, H.A., 1980. Anticorpos na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*: função das diferentes classes e sub-classes no mecanismo de proteção. Tese. São Paulo.
- TORRIGIANI, G., 1972. Quantitative estimation of antibody in the immunoglobulin classes of the mouse. II. Thymic dependence of the different classes. *J. Immunol.*, 108 :161-164.
- TRISCHMANN, T.M. & BLOOM, B.R., 1982. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, 35 :546-551.
- TRISCHMANN, T.; TANOWITZ, H.; WITTNER, M. & BLOOM, B., 1978. *T. cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exper. Parasitol.*, 45 :160.
- WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S. & WATSON, J., 1982. Genetic control of response to *T. cruzi* in mice. Multiple genes influencing parasitemia and survival. *Infect. Immun.*, 36 :637-644.