

PHILENO PINGE FILHO

ASPECTOS IMUNOHISTOLÓGICOS DAS  
PLACAS DE PEYER DE CAMUNDONGOS  
NORMAIS E INFECTADOS COM  
Trypanosoma cruzi.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção  
do título de mestre em Ciências Biológicas na  
área de Imunologia.

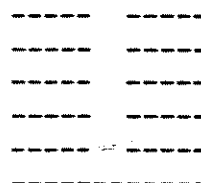
ORIENTADOR: PROF. Dr. PAULO M.F. ARAÚJO

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato a)  
PHILENO PINGE FILHO  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Departamento de Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Biologia  
Universidade Estadual de Campinas  
Campinas - São Paulo  
1993

*Paulo M.F. Araújo*  
19-07-93

"Ao término de um período de decadência sobrevém o ponto de mutação. A luz poderosa que fora banida ressurge. Há movimento, mas este não é gerado pela força... O movimento é natural, surge espontaneamente. Por essa razão, a transformação do antigo torna-se fácil. O velho é descartado, e o novo é introduzido. Ambas as medidas se harmonizam com o tempo, não resultando daí, portanto, nenhum dano".



I Ching

A

Marli e Philipi

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo, pela orientação científica e pelo apoio e amizade demonstrados durante a realização deste trabalho, assim como ter me permitido vivenciar a importância de se olhar não só para as coisas que são vistas (transitórias), mas também e principalmente para as coisas que não são vistas (eternas).

Aos meus pais, Phileno (em memória) e Francisca, pelo exemplo de perseverança e honradez, minha eterna gratidão

À minha esposa Marli e ao meu filho Philipi, por trazerem luz nos momentos mais obscuros.

À Sra. Deolinda e Sr. José de Matos, meus sogros, pelo apoio constante dado durante a realização deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Oswaldo Sant'Anna (Instituto Butantan), Humberto de Araújo Rangel e Nora T. M. N. Sakamoto (I.B. - UNICAMP) pela análise crítica e sugestões.

Aos Profs. Drs. Irineu B. Camargo, Júlia K. Sakurada (I.B. UNICAMP) e às suas respectivas equipes de pesquisa, pela colaboração e amizade.

Às Profas. Dras. Nora T. M. N. Sakamoto e Iara Maria Silva De Luca (Depto. de Histologia e Embriologia da UNICAMP) pela orientação na realização das análises histológicas e no preparo das micrografias.

Aos colegas Maria Teresa e Roberto Japim pela amizade e ajuda na realização de PFCs.

Aos colegas de Pós - Graduação em Imunologia pelo apoio e amizade. Um agradecimento especial ao Rovilson e a sua equipe de trabalho pela

descontração e companheirismo, tão importantes na convivência diária.

Aos funcionários Teresa Pinto Toniatti ( Depto. de Histologia e Embriologia da UNICAMP) e Isaias José Corrêa ( Depto. de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP), pela amizade e o auxílio técnico constante.

Ao Sr. Marco Antonio Stephano por sua disposição no auxílio em computação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Aos Funcionários da Biblioteca do Instituto de Biologia da UNICAMP pela amizade e colaboração na pesquisa bibliográfica.

Ao Biotério Central da UNICAMP (CEMIB) e aos seus técnicos e funcionários pelo pronto atendimento aos nossos pedidos de camundongos.

Aos camundongos utilizados por doarem suas vidas para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a elaboração e êxito deste trabalho, meus agradecimentos.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1. Animais.....	10
2.2. Estimulação dos animais com <u>Trypanosoma cruzi</u> .....	10
2.3. Retirada de órgãos e obtenção de células.....	10
2.4. Análise macroscópica das placas de Peyer (PP).....	12
2.5. Determinação do número de células secretoras de anticorpos.....	12
2.5.1. Conjugação das hemácias à proteína A de <u>Staphylococcus aureus</u> .....	12
2.5.2. Preparação do ágar.....	13
2.5.3. Antisoros de coelho anti- <u>imunoglobulinas</u> de camundongo (anti-Ig totais e anti-IgM).....	13
2.5.4. Complemento.....	14
2.5.5. Obtenção de células e preparação das placas de petri.....	14
2.6. Dosagem de proteínas.....	15
2.7. Imunodifusão.....	15
2.8. Análises histológicas.....	15
2.9. Análises estatísticas.....	16
3. RESULTADOS.....	17
3.1. Análise macroscópica das placas de Peyer.....	17
3.2. Análise histológica das placas de Peyer e do baço pela coloração de hematoxilina - eosina.....	18
3.3. Avaliação da expansão policlonal em camundongos infectados com <u>Trypanosoma cruzi</u> .....	20

3.4	Análise do número total de células nucleadas do baço, de PPDJ e PPI	21
3.5	Dosagem de proteínas e imunodifusão	21
4	DISCUSSÃO	48
5	CONCLUSÕES	53
6	RESUMO	54
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

## ABREVIACÕES

- BC - Biotério convencional
- BSS - Solução de salina balanceada
- GUT - Tecido linfóide associado ao intestino
- MALT - Tecido associado as mucosas
- PP - Placas de Peyer
- PPT - Placas de Peyer totais
- PPDJ - Placas de Peyer do duodeno e jejuno
- PPI - Placas de Peyer do íleo
- TCA - cido tricloactico
- SPF - Livre de patógenos específicos



## 1. INTRODUÇÃO

Nascida dentro de uma ciência médica preocupada com a cura das doenças, a Imunologia se desenvolveu dando ênfase à existência de formas específicas de resistências às infecções (SILVERSTEIN, 1979; SILVERSTEIN, 1991). Os estudos com soros imunes, obtidos da imunização natural ou artificial de animais, confirmaram que os anticorpos possuem propriedades altamente específicas. Isto permitiu uma grande expansão do conhecimento dentro da imunologia, o que culminou com o surgimento de uma metodologia sorológica voltada para testes de diagnósticos de doenças (SILVERSTEIN, 1991). Colocada neste trajeto, a imunologia desenvolveu modelos experimentais que ressaltaram a precisão e a especificidade das reações sorológicas e estas idéias foram estendidas ao sistema imune como um todo.

As respostas específicas que um organismo fosse capaz de executar eram resultado da ativação específica de clones definidos de linfócitos por um dado antígeno (JERNE, 1955). Como resultado de uma expansão dos princípios seletivos de formação de anticorpos proposto por JERNE, BURNET (1957) propôs a teoria da seleção clonal.

BURNET foi o primeiro a propor que a reatividade imunológica está fragmentada em clones linfocitários, fato hoje amplamente confirmado. Esta teoria propunha que, no período de embriogênese, o organismo formaria uma grande variedade de linfócitos, havendo em seguida um processo de eliminação daqueles que reagissem com autoantígenos: materiais provenientes do próprio organismo. Em qualquer contato com o antígeno haveria uma expansão dos clones correspondentes ao material detectado; caso contrário, eles permaneceriam com poucas células. Com o desaparecimento, ainda na vida

embrionária dos correspondentes aos constituintes do próprio organismo ficaria impedida a formação de anticorpos contra eles, desenvolvendo-se, nos termos desta teoria, uma tolerância do organismo aos autoconstituintes. Desarranjos nestes mecanismos causariam agressões imunológicas ao próprio corpo, as chamadas doenças autoimunes.

Esta visão clonal sustentou toda uma teoria de que as atividades imunológicas são centradas nos antígenos. Estas idéias tiveram muita aceitação e, de certa forma, ainda dominam o pensamento imunológico atual.

Um início de mudança desse pensamento imunológico centrado no antígeno, surgiu com JERNE (1974) que propôs a primeira teoria sobre atividade imunológica a se opor à teoria clonal: a teoria da REDE IDIOTÍPICA. Esta teoria se baseou na existência dos anticorpos que reconhecem determinantes em moléculas de outros anticorpos formados pelo mesmo organismo. Dando destaque a evidências anteriores de que os anticorpos eram capazes de reagir uns com os outros (OUDIN & MICHEL, 1963; KUNKEL, 1970), em interações denominadas idiotípicas.

JERNE (1974), mostrou a possibilidade de se estabelecer uma extensa rede de conexões dentro do sistema imune. Através da complementariedade entre paratopos e idiotopos (porções características dos anticorpos), todos os anticorpos poderiam estar unidos numa rede idiotípica. Durante uma resposta imune, o organismo poderia formar anticorpos capazes de induzir o aparecimento de anti-anticorpos e, estes, de outros anti-anticorpos. Desta maneira, afirmou que a reatividade imunológica não está voltada para fora do organismo à espera de contatos eventuais com corpos estranhos, mas está voltada para si mesma (VAZ, 1980; 1988; VAZ and FARIA, 1990).

É provável que o organismo só registre perturbações na harmonia de seu próprio funcionamento, sem discriminar se o que está interagindo é estranho ou não (VAZ & VARELA, 1978).

Após a introdução da teoria da rede idiotípica de JERNE, visões modernas a respeito do sistema imune tem sido fortemente influenciadas pelas idéias de Autonomia previamente desenvolvida por aqueles que trabalham com sistemas complexos como o cérebro. De acordo com estas idéias, o significado de uma interação com um ser vivo é resultante da própria organização do sistema e de sua história (COUTINHO et alii, 1985).

A detecção de anticorpos naturais reagindo à auto-componentes do organismo, em indivíduos humanos normais adultos (GILBERT et alii., 1982) e em camundongos (DIGHIERO et alii, 1983; ACHTNICH & ZOLLER, 1991), bem como os dados indicando que a maioria dos anticorpos naturais são multiespecíficos (ARAÚJO et alii, 1987) indicam que o sistema imune possui autonomia quanto à sua organização e re-organização de seus componentes; que são características de um sistema voltado para si mesmo (VAZ & VARELA, 1978), capaz de manter sua atividade independente da presença de antígeno, reforçando a idéia da existência de uma conexidade interna do sistema imune (COUTINHO et alii, 1984; COUTINHO, 1989; VAZ & FARIA, 1990).

A principal consequência desta nova visão da imunologia foi o direcionamento da discussão sobre a atividade imunológica e o surgimento de novas maneiras de se elaborar os protocolos de investigação. Dentro desta perspectiva, o estudo da atividade interna do sistema imune poderá gerar informações mais relevantes a respeito da fisiologia do sistema do que o estudo com largas doses de antígeno, como as realizadas em abordagens

tradicionais (COUTINHO et alii, 1985). Esta atividade pode ser medida pelo nível de produção e declínio de linfócitos, como também pela geração de células efectoras.

De fato, nesse contexto de um sistema fisiológico pouco tem sido explorado sobre a funcionalidade global da atividade imunológica. Isto fica mais evidente com respeito ao papel do tecido linfóide associado às mucosas, que já se demonstrou em camundongos representar o maior potencial da produção total de anticorpos (VAN DE HEIJDEN, et alii, 1987).

O sistema imune das mucosas é constituído por tecidos linfóides associados às superfícies mucosas (MALT = Mucosa-Associated Lymphoid Tissues) das vias intestinais, respiratórias e urogenitais (STROBER & JAMES, 1991).

O tecido linfóide associado ao intestino (GALT = Gut-Associated Lymphoid Tissue) consiste de dois agregados linfóides: o primeiro formado por tecido linfóide organizado e conhecido como placas de Peyer; o segundo definido como tecido linfóide difuso e composto de linfócitos intraepiteliais e da lâmina própria (BIENENSTOCK et alii, 1987; DOE, 1989; STROBER & JAMES, 1991; HOLMGREEN et alii, 1992).

A primeira descrição das placas de Peyer (PP) data de 1677 e foi estabelecida pelo anatomista J.C. PEYER, o qual foi o primeiro a observar essa estrutura em humanos (MESTECKY & MCGHEE, 1987; GEBBERS & LAISSUE, 1989).

A análise histológica das PP de diferentes espécies de mamíferos (FAULK et alii, 1971; ABE & ITO, 1977; LANDSVERK et alii, 1991; HOGENESCH & FELSBURG, 1992) tem permitido reconhecer no folículo quatro regiões: centro germinativo, área folicular, parafolicular e de cúpula (Figura 1 e 2).

Os centros germinativos nas PP são geralmente largos e bem

desenvolvidos. Eles apresentam zonas claras e escuras semelhantes à topografia apresentada pelos órgãos linfóides secundários (baço, linfonodos, etc). Nesta região predominam células B, embora células T dispersas também estão presentes (ABE & ITO, 1977). Assim como em outros centros germinativos, as células B são altamente diferenciadas e expressam IgD de superfície; entretanto, ao contrário de células B de outros centros germinativos, uma grande fração (cerca de 40%) expressam IgA (STROBER & JAMES, 1991).

A área folicular circunda o centro germinativo e está densamente povoada por pequenos linfócitos. Esta área é similar na topografia e nos constituintes celulares, às áreas timo-independentes presentes no baço e linfonodos (ABE & ITO, 1977). Esta área corresponde aproximadamente a um terço (1/3) do volume da placa e contém metade do total de pequenos linfócitos (ABE & ITO, 1977).

A área parafolicular localiza-se entre e ao redor dos folículos e é rica em linfócitos T (ABE & ITO, 1977; STROBER & JAMES, 1991). A grande maioria dos linfócitos T CD8+ presentes nos agregados linfóides de mucosas são encontrados nestas áreas (STROBER & JAMES, 1991). A área imediatamente abaixo do epitélio do agregado linfóide compreende a cúpula (ABE & ITO, 1977). Esta área é rica em células que expressam antígenos de histocompatibilidade (MHC = Major Histocompatibility Complex) de classe II (macrófagos, células dendríticas e células B) e em linfócitos T. A maioria destes linfócitos são CD4+, um número pequeno destes linfócitos não expressam nem CD4+ ou CD8+ (STROBER & JAMES, 1991).

O epitélio localizado logo acima da cúpula possui algumas características importantes e tem sido denominado como

epitélio associado ao folículo linfóide (FAE= Follicle-Associated Epithelium) (MESTECKY & MCGHEE, 1987). Este epitélio contém células cubóides, poucas células globóides, e células especializadas na tomada de antígenos denominada célula epitelial associada ao folículo (FAE Cell) ou simplesmente células membranosas (células M) (BOCKMAN & COOPER, 1973).

As células M exibem microvilosidades curtas e irregulares, citoplasma rico em vesículas pinocitóticas e glicocálix fino (OWEN & JONES, 1974). A tomada de proteínas pelas células M não resulta de uma degradação enzimática lisossomal, e proteínas intactas, provavelmente imunógenas, alcançam a região de cúpula das placas de Peyer (DUCROC et alii, 1983; NEUTRA et alii, 1987). As células M não expressam antígenos de histocompatibilidade (MHC) de classe II e parecem não estar envolvidas no processo de apresentação de antígenos (STROBER & JAMES, 1991). A ocorrência de linfócitos CD4<sup>+</sup> e células dendríticas expressando MHC de classe II, adjacentes à células M de indivíduos humanos (BJERKE et alii, 1988), sugere que as células M podem ter importante papel na indução da resposta imunológica.

A participação dos tecidos linfóides associados ao intestino (GUT) na produção de IgA já está bem estabelecida (MESTECKY & MCGHEE, 1987). Os plasmócitos produtores de IgA da mucosa intestinal são derivados de células B provenientes de PP (CEBRA et alii, 1977; CEBRA et alii, 1980).

Com relação a células B produtoras de IgA em PP, a região de cúpula é desprovida de plasmócitos produtores de IgA (CRABE et alii, 1970; BIENENSTOCK & DOLEZEL, 1971; SMINIA & PLESH, 1982), indicando que a maturação de linfócitos B não ocorre naquele local. Em contraste, as PP do homem contém plasmócitos produtores de IgA (SPENCER et alii, 1986).

A síntese de IgA é altamente dependente de linfócitos T (ELSON et

alii, 1979; McGHEE et alii, 1989). Diversas citocinas produzidas por linfócitos T e outros tipos celulares, influenciam no processo de diferenciação de linfócitos B para a produção de IgA. Nos estágios iniciais subpopulações de células B que estão expressando IgM, sob a influência de células T passam a expressar IgA de superfície, fenômeno conhecido como "switch". O fator de crescimento beta ( $TGF\ \beta$ ) e a interleucina IL-4 têm sido identificados como importantes citocinas para este "switch" específico, e nos estágios finais, há influência principalmente de interleucinas IL-5 e IL-6, de  $TGF\ \beta$  e provavelmente de interferon gama ( $INF\ \gamma$ ) (McGHEE et alii, 1989).

A participação das PP na atividade do sistema imunológico tem sido investigada, e algumas hipóteses sobre seu papel na resposta imunológica tem sido apresentadas: 1 - indução de resposta imune local no intestino (COOPER & TURNER, 1967; HENRY et alii, 1969; POLLARD & SHARON, 1970; FAULK et alii, 1971; CRAIG & CEBRA, 1971; LEVIN et alii, 1973; HUSBAND & GOWANS, 1978; RICHMAN, et alii, 1981; KAWANISHI, et alii, 1983; KAWANISHI & MIRABELLA, 1988; ENDERS et alii, 1988); 2 - desenvolvimento de tolerância sistêmica (MATTINGLY & WAKSHAN, 1978; NGAN & KIND, 1978; CHALLACOMBE & TOMASI, 1980; MACDONALD, 1982, 1983).

Alguns pesquisadores têm estudado os efeitos da inativação das placas de Peyer sobre a resposta imune local e sistêmica (HEATLE et alii, 1981; ENDERS et alii, 1986; SOESATO et alii, 1990), sugerindo que as placas de Peyer, participam de maneira importante na regulação da resposta imune sistêmica, quando antígenos T dependentes são administrados intragastricamente. A inativação destas, poderia acarretar mudanças na tomada e apresentação de antígenos à nível do intestino delgado, remoção de células T

supressoras e conseqüentemente uma extensa reação imunológica no baço.

Um aspecto central da abordagem de Jerne ao sistema imunológico, é que um distúrbio desencadeado pelo antígeno afeta muito mais linfócitos que aqueles capazes de interagir diretamente com o antígeno, e a ativação policlonal é um bom exemplo disso.

A ativação policlonal de células B e/ou T é muito freqüente em diferentes processos infecciosos, causados por exemplo, por protozoários (D' IMPERIO LIMA et alii, 1985), por vermes (CRANDALL & CRANDALL, 1971; LOPES et alii, 1991), por bactérias (MEDEIROS et alii, 1991), etc. A fase aguda da doença de Chagas em camundongos é caracterizada por uma maciça proliferação de linfócitos T e B que continua na fase crônica (MINOPRIO et alii, 1986); uma alta e persistente produção de autoanticorpos tem sido observada em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e parte destes são similares aos anticorpos naturais (TERNYNK, et alii, 1990). Anticorpos poliespecíficos encontrados na fase crônica da doença no homem, são provavelmente decorrentes da ativação policlonal de células B como observada em camundongos (TERNYNK et alii, 1990). A origem da ativação policlonal de células B não é conhecida, é possível que este processo dependa de células T, já que o tratamento de camundongos infectados com anticorpos anti L3T4 elimina células T auxiliares, e também a ativação policlonal (MINOPRIO et alii, 1987).

O alto nível de ativação de linfócitos aparece muito cedo na fase aguda da doença e é observado em órgãos linfóides periféricos, como o baço e linfonodos (MINOPRIO et alii, 1986; D' IMPERIO LIMA et alii, 1985, 1986). Não se tem informações do que se passa a nível das mucosas, especialmente nas placas de Peyer, durante esta ativação.



Considerando os seguintes fatos: a) o trato gastrointestinal é um local de intensa atividade imunológica; b) as placas de Peyer participam na realização destas atividades e c) os eventos iniciados ao nível do trato gastrointestinal podem ser importantes na atividade global do sistema imunológico, utilizando camundongos isogênicos C57BL/6, normais e infectados com *Trypanosoma cruzi*, os objetivos deste trabalho foram :

- 1) - Determinar o número, tamanho e distribuição das placas de Peyer ao longo do intestino delgado;
- 2) - Analisar histologicamente o baço e as placas de Peyer do duodeno - jejuno e do íleo;
- 3) - Determinar o número total de células formadoras de imunoglobulinas, presentes no baço e nas placas de Peyer do duodeno - jejuno e íleo;
- 4) - Análisar os líquidos intestinais.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - ANIMAIS

Utilizamos camundongos da linhagem C57Bl/6, fêmeas, com 8 semanas de idade, obtidos a partir de colônias SPF, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP).

Após a retirada dos animais das condições SPF, estes eram imediatamente sacrificados ou então alojados no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biologia, da UNICAMP, em gaiolas coletivas, comportando de 6 até 25 animais cada. Água e ração foram distribuídos "ad libitum".

Os animais foram distribuídos em 2 grupos experimentais: controle e infectado, onde os mesmos eram mantidos ou não em condições SPF.

### 2.2 - ESTIMULAÇÃO DOS ANIMAIS COM *Trypanosoma cruzi*

Os animais foram infectados por via intraperitoneal, com  $10^5$  formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (PEREIRA DA SILVA e NUSSENZWEIG, 1953), obtidos por sangria axilar de camundongos CBA, mantidos no Depto de Micro-Imunologia. Após a contagem pelo método de BRENER (1968), os parasitas foram mantidos em solução salina tamponada com fosfatos (pH 7.2), de modo a conter  $10^5$  tripomastigotas por 0,1 ml de inóculo.

### 2.3 - RETIRADA DE ÓRGÃOS E OBTENÇÃO DE CÉLULAS

Os camundongos do grupo controle e infectado (no sétimo dia) foram sacrificados sob efeito do éter. O baço e o intestino delgado foram retirados, sendo o baço transportado para um frasco pequeno estéril, contendo

meio BSS, pH 7.2, imerso em banho de gelo. O intestino foi transferido para uma placa de Petri, contendo salina fisiológica, pH 7.2, também imersa em banho de gelo. A seguir o baço foi macerado delicadamente para liberação de células. A suspensão de células obtidas foi homogeneizada várias vezes, utilizando uma pipeta Pasteur, e após a sedimentação dos grumos, o sobrenadante foi transferido para tubos cônicos graduados, sendo então centrifugados (5 a 8 minutos, 1500 rpm). Após a centrifugação, as células eram ressuspendidas em meio BSS, pH 7.2. Esse processo foi repetido por três vezes. No final as células eram recuperadas em um volume de 10 ml de meio BSS e mantidos em banho de gelo.

Os intestinos obtidos de camundongos normais e infectados foram submetidos a uma lavagem do lumen com salina fisiológica estéril, pH 7.2, volume constante ( $V = 3$  ml). Os líquidos derivados desta lavagem foram reunidos em função da sua origem e centrifugados (20 minutos a 10.000 rpm) à temperatura de  $0^{\circ}\text{C}$ . Os sobrenadantes obtidos foram mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Após a lavagem do lumen intestinal, as placas de Peyer (PP) foram enumeradas e delicadamente retiradas do intestino delgado. As PP localizadas no duodeno - jejuno e íleo foram respectivamente transferidas para frascos contendo meio BSS, pH 7.2, mergulhado em gelo. A seguir eram desmanchadas delicadamente para liberação de células. A partir desta fase, o procedimento utilizado para obtenção de suspensões celulares de placas de Peyer, foi o mesmo seguido para as células do baço. No final, as células eram recuperadas em um volume 2 ml de meio BSS, pH 7.2, e mantidas em banho de gelo.

## 2.4 - ANÁLISE MACROSCÓPICA DAS PLACAS DE PEYER (PP)

As placas de Peyer do duodeno-jejuno e íleo de camundongos normais e infectados, foram imersas em ácido acético a 2% por um período de 24 horas (CARLENS, 1928). Assim evidenciadas (placas brancas), os diâmetros de todas as PP localizadas ao longo de intestino delgado foram determinados sem o estiramento do mesmo. Em adição determinou-se o comprimento do intestino delgado. Após a compactação do tecido linfóide pelo ácido acético pôde-se determinar o número de folículos das PP.

## 2.5 - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICORPOS

O número de células secretoras de imunoglobulinas nos baços e nas PP do duodeno-jejuno e íleo, foi determinado segundo o método de PFC reverso utilizando hemácias sensibilizadas com proteína A, descrito por BERNABÉ et alii (1981), que permite a enumeração de células secretoras de Igs, independente da especificidade antigênica dos anticorpos secretados.

### 2.5.1 CONJUGAÇÃO DAS HEMÁCIAS À PROTEÍNA A DE *Staphylococcus aureus*

Hemácias de carneiro mantidas em Alsever, entre uma e duas semanas, foram lavadas três vezes com solução salina. Em presença de 2ml de solução 0.05 M de cloreto de cromo ( $CrCl_3$ ), cada alíquota de 100 $\mu$ l de papa de hemácias de carneiro, foi misturada com igual volume de proteína A na concentração de 0,5 mg/ml. Esta preparação foi incubada em "banho Maria" a 30° C por uma hora. Após o período de incubação, as hemácias foram novamente lavadas em solução salina e a seguir em BSS contendo glicose, prontas para

uso, sendo mantidas a 4°C até a utilização. As hemácias podiam ser conservadas em solução 1% de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), por um período máximo de uma semana.

#### 2.5.2 - PREPARAÇÃO DO ÁGAR

Foi usado Bacto-Agar a 0.5% em meio BSS. Após a completa dissolução do ágar ( por fervuras consecutivas ), este foi adicionado de uma solução de DEAE-DEXTRAN, na concentração final de 0.75 mg/ml. O ágar foi mantido em "banho Maria" a 46°C, até o uso.

#### 2.5.3 ANTISOROS DE COELHO ANTI - IMUNOGLOBULINAS DE CAMUNDONGO

( ANTI - Ig TOTAIS, ANTI - IgM )

Os imunossoros de coelho dirigidos contra diferentes isótipos de imunoglobulinas de camundongo, foram preparados conforme esquemas de imunização convencionais, tendo sido produzidos por imunização com uma mistura contendo adjuvante completo de Freund, injetado 0,5 ml em uma das coxas do animal. Uma injeção "booster" de 10 mg da mistura foi realizada após 30 dias, pela via venosa. A sangria foi realizada 15 dias após a última injeção. Injeções contendo 1 mg de Imunoglobulinas totais de camundongo emulsificadas em adjuvante de Freund, foram aplicadas em 2 coelhos intramuscularmente e após 30 dias submetidos a sangria. O soro obtido foi utilizado como anti - Ig total de camundongo. A obtenção de antisoro anti - IgM foi realizada com a imunização de coelhos com proteínas de mieloma de IgM desenvolvido em camundongos; o soro resultante desta operação foi submetido a uma absorção por afinidade em coluna de Sephadex - Proteína A, para eliminar IgG contaminante. A seguir foram determinadas as especificidades e titulações para a realização

do ensaio de PFC. Para uso os antisoros foram diluídos em meio BSS, conforme a indicação dos títulos obtidos.

#### 2.5.4 COMPLEMENTO

Como fonte de complemento, foi utilizada a mistura do soro de 20 cobais normais. Esta mistura de soros era liofilizada e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. O título do complemento determinado era expresso em 50 CH unid./ml.

#### 2.5.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS E PREPARAÇÃO DAS PLACAS

As células de baço e de PP foram colhidas conforme descrito anteriormente (item 3.3).

A suspensão final é feita em 10 ml para baço e 2ml de meio e, a partir destas soluções, são realizadas diluições diferentes de células, que variam de acordo com o antisoro específico a ser usado.

Em pequenos tubos de hemólise (0,8 x 0,3), contendo separadamente 100 $\mu\text{l}$  da diluição adequada de células esplênicas e de PP, adicionou-se sucessivamente: 1) 20 $\mu\text{l}$  de suspensão hemácias conjugadas à proteína A a 30% ; 2) 20 ou 40 $\mu\text{l}$  do antisoro específico; 3) 50 $\mu\text{l}$  de complemento de cobaia ; 4) 250 $\mu\text{l}$  do ágar. O conteúdo do tubo foi ligeiramente agitado em vortex e espalhado uniformemente em uma placa de Petri (10 x 100)

As placas de Petri foram incubadas durante 6 horas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , em atmosfera úmida. A seguir, foi realizada a contagem visual, das placas de hemólise. Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

## 2.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas do lavado intestinal (item 3.3), foi determinada pelo método de LOWRY modificado, segundo HARTREE, 1972, utilizando como padrão albumina bovina (Sigma). As amostras foram precipitadas com TCA à 20%. A seguir, os precipitados eram ressuspensos em acetona gelada, e centrifugados por 3 vezes. Os precipitados obtidos foram recuperados em solução de NaOH 0,1 N e dosados.

## 2.7 IMUNODIFUSÃO

Para a pesquisa de imunoglobulinas nos líquidos intestinais foi empregado a técnica de imunodifusão, segundo as condições de OUCHTERLONY (1958), utilizando antisoros específicos anti - Ig Totais, anti - IgA e anti - IgM.

## 2.8 - ANÁLISES HISTOLÓGICAS

O baço e placas de Peyer do duodeno - jejuno e ileo de camundongos normais e estimulados foram colocadas em frascos com fixador de BOUIN e mantidos nesta solução por 24 horas. Após este tempo, os materiais eram lavados com água por 12 horas, desidratados em álcool 70%, 80% e 100%, sendo as trocas realizadas a cada 30 minutos. A seguir, eram diafanizados em xilol e embebidos em parafina líquida, em estufa termostática a uma temperatura entre 58 e 60°C. Os órgãos eram então cortados com micrótomo e obtidas seções de 6 um de espessura. Após desparafinização e hidratação, as seções foram coradas com hematoxilina-eosina, lavadas rapidamente em água destilada, desidratadas em álcoois, diafanizadas e montadas em bálsamo do Canadá.

Utilizou-se microscópio Zeiss, com ocular Kpl 8 x com retículo de integração de 25 pontos e objetiva de 100 x , para as determinações morfométricas dos centros germinativos e das áreas foliculares das PP e do baço dos animais normais e estimulados .

## 2.9 - ANÁLISES ESTÁTISTICAS

Para análise dos dados referentes às placas de Peyer (número, diâmetro, número de folículos) , ao número de PFC bem como para as medidas de concentração de Igs do lavado intestinal, os valores foram expressos pelo cálculo das médias e desvio padrão das médias, para cada grupo estudado. Para verificação de diferenças de médias obtidas, foi aplicado o teste T de student ( SPIEGEL, 1977 ).



### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA DAS PLACAS DE PEYER

As placas de Peyer (PP) dos camundongos utilizados, puderam ser identificadas e enumeradas a olho nu. A lavagem intestinal e a compactação das PP com ácido acético possibilitaram a determinação do tamanho e do número de folículos das mesmas.

As PP foram visualizadas como uma massa nodular branca sobre a borda antimesentérica, distribuídas irregularmente ao longo do intestino, representação diagramática (Figura 3). O tamanho das PP variou conforme o número de folículos, placas pequenas (0,80 mm) PP (1,1 mm) consistem de um a dois folículos e placas maiores (1,1 mm) PP (2,0 mm), de quatro a seis.

O tamanho do intestino delgado dos camundongos do grupo controle e infectado não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Os valores variaram de 34 a 40 cm, com média de  $36,2 \pm 1,92$ , para os animais normais e  $36,0 \pm 1,85$  para os animais infectados.

O número total de placas de Peyer, dos animais provenientes de colônias SPF, de 8 semanas de idade, variou de 5,0 a 7,0, com média de  $6,12 \pm 0,66$  ( $P < 0,05$ , Tabela 1). Estes mesmos animais, quando mantidos em biotério convencional (não SPF) por sete dias, tiveram suas PP aumentadas em número, com média de  $7,0 \pm 0,90$  ( $P < 0,05$ , Tabela 1). Com o objetivo de avaliar esse aumento no número de PP, os mesmos animais foram mantidos por 15, 30 e 250 dias em condições convencionais. Os animais que permaneceram 15 e 30 dias naquelas condições, tiveram um aumento no número de PP diretamente proporcional ao seu tempo de permanência. Esses tiveram suas PP aumentadas para  $7,4 \pm 1,12$  e  $8,2 \pm 0,66$ , respectivamente ( $P < 0,05$  figura 4). Os animais

que permaneceram 250 dias em biotério convencional, apresentaram uma redução no número de PP, com média de  $6,6 \pm 1,2$ . Essa média não difere daquela obtida, com as PP de camundongos SPF, de 8 semanas de idade (Figura 4). O tamanho e o número de folículos desses mesmos animais, não apresentaram variações estatisticamente significativas, durante a permanência naquelas condições, embora haja uma tendência de aumento no tamanho das PP nos 30 primeiros dias (Figura 5).

Os camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* tiveram no sétimo dia de infecção, suas placas analisadas. Tanto os animais mantidos em isolador, quanto aqueles mantidos em condições convencionais, apresentaram uma redução do número de PP para  $4,85 \pm 0,83$  e  $5,29 \pm 1,26$ , respectivamente ( $P < 0,05$ , tabela 2). Esses animais apresentaram também diminuição no tamanho (Figuras 6a e 7a) e uma tendência de diminuição do número de folículos de suas placas (Figura 7b).

### 3.2 - ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS PLACAS DE PEYER E DO BAÇO PELA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA - EOSINA (HE)

As placas de Peyer (PP) consistem de agregados linfóides conhecidos como folículos. Cada placa está dividida em quatro regiões: Centro Germinativo (CG), Área Folicular (F), Área Parafolicular (PF) e Área de Cúpula (C) (ABE & ITO, 1977), Figuras 1, 8 e 10.

Cada placa continha de 1 a 6 CG, bem desenvolvidos. O CG consiste de uma zona clara e uma zona escura (ABE & ITO, 1977), comum nos órgãos linfóides secundários, que pode ser observado nas figuras 1, 8, 9, 10 e 11. A aparência clara é devido a uma abundância relativa de células reticulares com linfócitos grandes espalhados entre elas (ABE & ITO, 1977). A zona escura,

localizada mais próxima da camada muscular ( CM ) tem esta aparência devido a grande concentração de grandes linfócitos com citoplasma basófilo, (ABE & ITO, 1977), figura 1 .

A relação entre pequenos e grandes linfócitos existentes no CG de PP de animais normais e infectados é mostrado na figura 12. Nesta figura, podemos observar que placas de Peyer do íleo de animais normais apresentam 6,25 vezes mais linfócitos grandes em relação aos existentes nas placas de Peyer do duodeno-jejuno. As PP de animais infectados com *Trypanosoma cruzi*, apresentaram um aumento significativo de grandes linfócitos em relação a linfócitos pequenos existentes no CG de PP de animais do grupo controle (4,4 vezes para PPDJ e 1,9 vezes para PPI).

A área folicular circunda o centro germinativo, especialmente a zona clara, (Figuras 1, 9 e 11). Esta área é densamente povoada com pequenos linfócitos, uns poucos linfócitos grandes são observados ( ABE & ITO , 1977). A área folicular das placas de Peyer do íleo provenientes de animais normais, apresentaram um aumento de 8X na quantidade de grandes linfócitos em relação à área folicular de placas do duodeno-jejuno (Figura 13 ). Esta área como a parafolicular não puderam ser distinguidas nas PP dos animais infectados (Figuras 14 a 17).

Os baços dos camundongos infectados mostraram uma redução de 10X na relação polpa branca/ órgão, comparado com baços de animais normais (polpa branca/orgão = 50X) , figuras 18 e 19 .

### 3.3 - AVALIAÇÃO DA EXPANSÃO POLICLONAL EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Trypanosoma cruzi*

Sete dias após a infecção, foi realizada a contagem de PFC no baço e nas PP do duodeno - jejuno e íleo, para Igs totais e IgM.

Na figura 20, acha-se representado o perfil dessa contagem de linfócitos B (número de PFC / 10 células de baço) em animais infectados. Nesta figura, podemos observar que no sétimo dia de infecção, há um aumento significativo no número de PFC - Ig Totais e de PFC IgM quando comparados com o PFC de baços de animais normais. O número total de células secretoras de Igs no baço de animais infectados, foi de  $1000 \times 10$  e o de células secretoras de IgM,  $270 \times 10$ . Estes valores são 3.7 e 5.6 vezes maiores, respectivamente, aos encontrados em animais normais.

Os resultados do número de PFC com células de placas de Peyer do duodeno - jejuno (PPDJ) e placas de Peyer do íleo (PPI) estão representados na figura 21. O número de células secretoras de Igs totais em 10 células de PPDJ de animais normais, foi de 1041, e o número de IgM foi de 202. Em 10 células de PPDJ de animais infectados 1860 células estavam secretando Igs Totais e 690 IgM, representando, respectivamente, um aumento de 3,4 e 1,7 vezes em relação aos animais não infectados. As PPI dos animais normais apresentaram em 10 células, 1463 secretando Igs Totais e 870 secretando IgM, contra, respectivamente, 2458 e 754 dos animais infectados; com aumento de 1,6 vezes e diminuição de 1,15 vezes, em relação aos animais normais.

### 3.4 - ANÁLISE DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS NUCLEADAS DO BAÇO , DE PPDJ E PPI.

As mudanças nos números de células nucleadas do baço e de PP, de animais normais mantidos em biotério convencional , estão representadas na figura 22. As mudanças decorrentes da infecção são apresentadas nas figura 23. O número total de células do baço aumentou e o número de células das PP diminuiu, em relação aos respectivos órgãos nos animais normais.

### 3.5 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS E IMUNODIFUSÃO DE OUCHTERLONY

Nossos resultados sugerem um aumento na concentração de proteínas, presentes no líquido intestinal, de camundongos infectados, com relação aos normais, SPF ou não. A presença de imunoglobulinas nos líquidos intestinais obtidos foi comprovada pela técnica de imunodifusão de OUCHTERLONY (1958) (tabela 3 ). Os animais infectados apresentaram reações de precipitação mais intensas em relação aos animais normais ( Tabela 3 ).

TABELA. 1

NÚMERO DE PLACAS DE PEYER DE CAMUNDONGOS DE 8 E 9 SEMANAS DE IDADE, NORMAIS, SPF OU MANTIDOS EM BIOTÉRIO CONVENCIONAL POR ATÉ SETE DIAS.

---

ANIMAIS	N	DIAS	PPT**	PPDJ**	PPI**
	25	0	6,12 ± 0,66	3,80 ± 0,70	2,40 ± 0,58
SPF					
	09	7	6,50 ± 1,13	3,50 ± 0,88	3,00 ± 0,70 *
B.C.	12	7	7,00 ± 0,90*	3,80 ± 1,00	3,20 ± 1,00*

---

N - NÚMERO DE EXPERIMENTOS.

\*\* - VALORES MÉDIOS, ACOMPANHADOS DO ERRO PADRÃO DA MÉDIA.

\* - DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA EM RELAÇÃO AOS VALORES DOS ANIMAIS SPF, 0 DIA ( P < 0,05 ).

PPT = PLACAS DE PEYER TOTAIS, PPTDJ = PLACAS DE PEYER DO DUODENO - JEJUNO,

PPI = PLACAS DE PEYER DO ÍLEO.

SPF = LIVRE DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS

BC = BIOTÉRIO CONVENCIONAL ( NÃO SPF )

TAB. 2

NÚMERO DE PLACAS DE PEYER DE CAMUNDONGOS NORMAIS E INFECTADOS COM *Trypanosoma cruzi*.

GRUPO	N	PPT	PPDJ	PPI
CONTROLE				
		**	**	**
SPF	7	6,8 ± 0,92	3,8 ± 1,26	3,0 ± 0,86
BC	9	6,8 ± 1,05	3,6 ± 1,22	3,2 ± 0,97
INFECTADO ( 7 dia )				
SPF	7	4,8 ± 0,69*	2,57 ± 1,13	2,2 ± 0,48*
BC	9	5,2 ± 1,26*	3,35 ± 1,11	1,9 ± 0,42*

N = NÚMERO DE CAMUNDONGOS.

\*\* = VALORES MÉDIOS, ACOMPANHADOS DO ERRO PADRÃO DA MÉDIA

\* = P < 0,05

PPT = PLACAS DE PEYER TOTAIS; PPDJ = PLACAS DE PEYER DO DUODENO E JEJUNO,

PPI = PLACAS DE PEYER DO ÍLEO

TABELA 3

ANÁLISE DOS LAVADOS INTESTINAIS DOS CAMUNDONGOS NORMAIS E INFECTADOS.

GRUPO	VOLUME REC. (ml)	[ ] PROTEÍCA ug/ml	RELAÇÃO IMUNOLÓGICA PRECIPITAÇÃO		
			Anti - IgT	Anti - IgM	Anti - IgA
NORMAL					
BC	8	664	+	±	+
INFECTADO	7	1106	++	±	++
NORMAL	6	692	+	±	+
SPF					
INFECTADO	8	1151	+++	±	++

[ ] CONCENTRAÇÃO DETERMINADA SEGUNDO HARTREE, 1972.

IMUNODIFUSÃO DE OUCHTERLONY, 1958.

BC = BIOTÉRIO CONVENCIONAL, SPF = LIVRE DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS.

±, +, ++ e +++ = ARCO DE PRECIPITAÇÃO CONFORME INTENSIDADE DA REAÇÃO



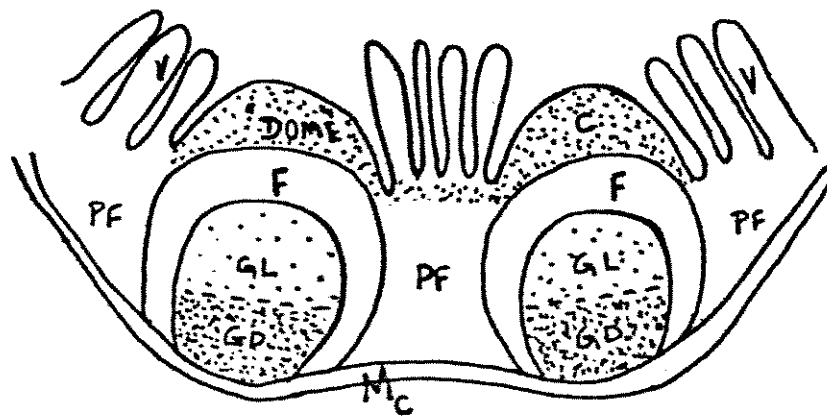


FIGURA 1 . Esquema de uma placa de Peyer .GL, centro germinativo claro; GD,centro germinativo escuro; F, área folicular; PF, área parafolicular; C, cúpula; V, vilosidade; MC, camada muscular. Redesenhado de Abe & Ito, Arch. Histol. Japan., 40:(5), 407-20, 1977.

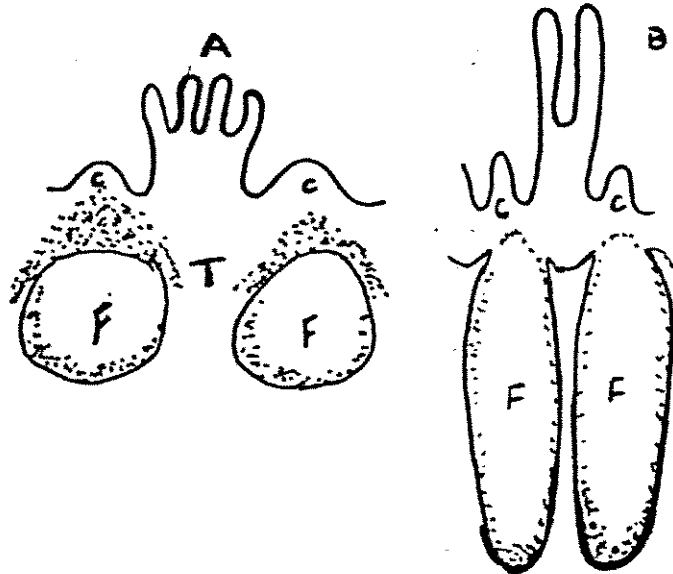


FIGURA 2. Placas de Peyer de ruminantes. PPj (A), PPi (B), Cúpula (C), folículo (F), área de células T interfolicular (T). Redesenhado de Landsverk et alii, Vet. Immunol. Immunopathol., 28:1-16, 1991.

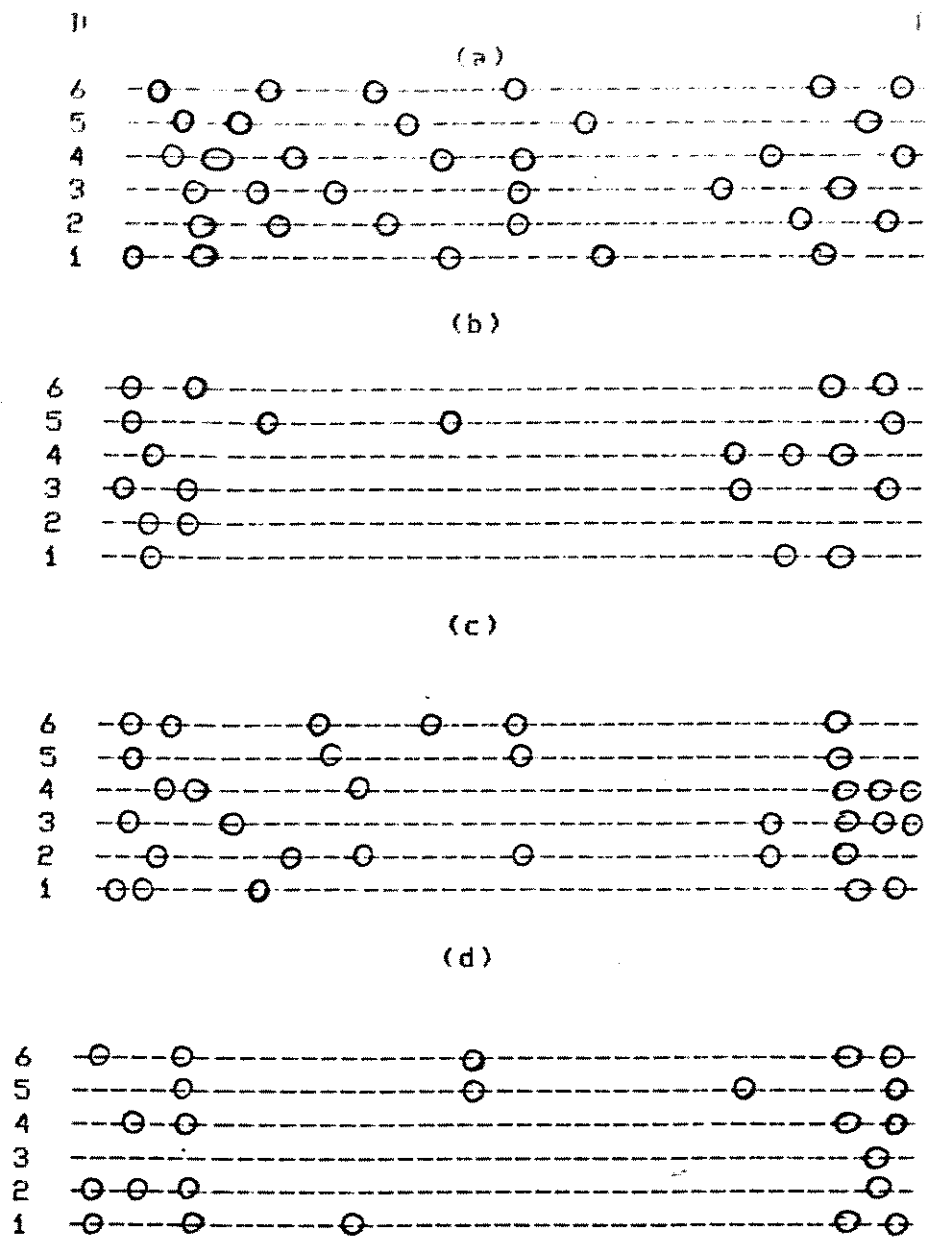


FIGURA 3 - Distribuição das placas de Peyer, ao longo do intestino delgado, de camundongos normais e infectados ( sétimo dia de infecção ). (a) = animais normais SPF, (b) = animais infectados SPF, (c) = animais normais não SPF e (d) animais infectados não SPF. (n) = 6 animais por grupo. D = duodeno, I= íleo.

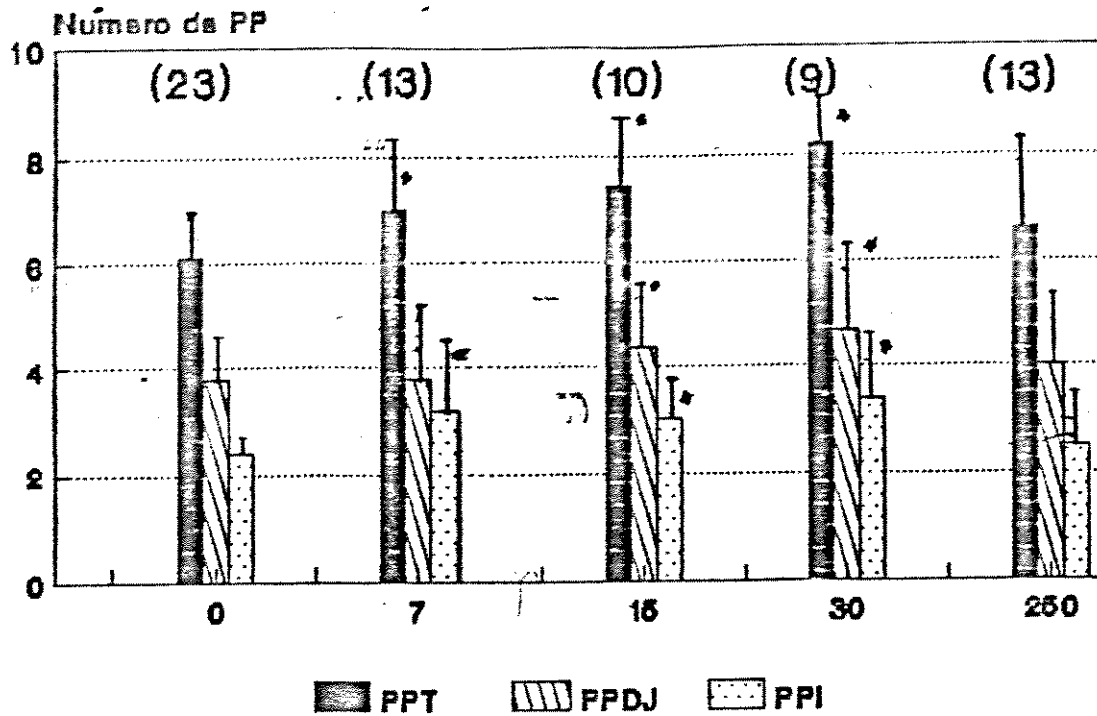


FIGURA 4 - Número de placas de Peyer de camundongos normais, mantidos em biotério convencional.

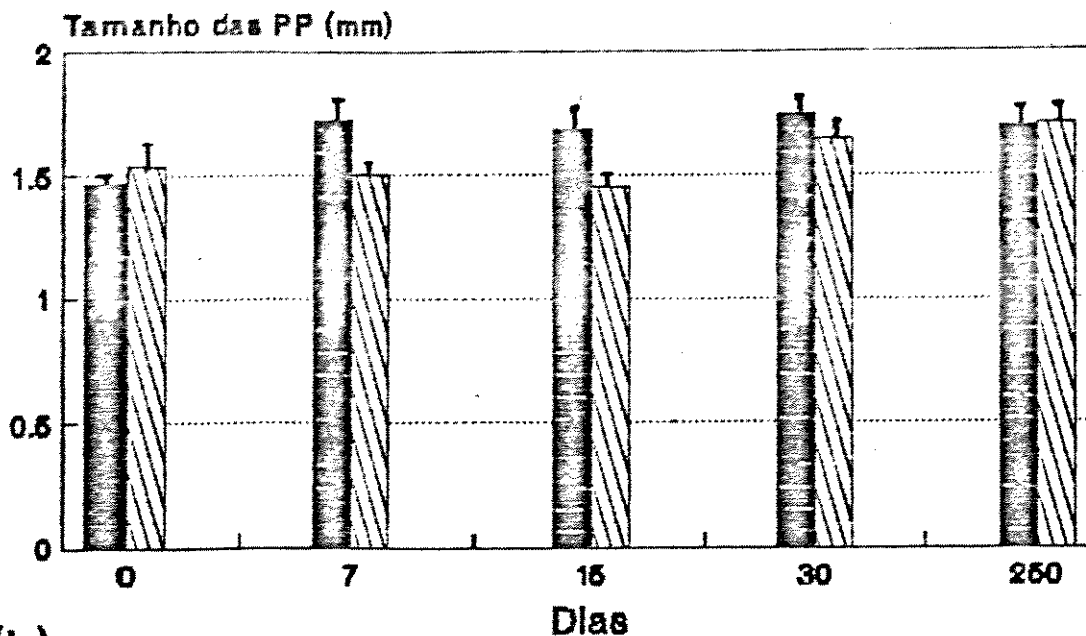
(n) = Número de animais.

\* = (  $P < 0.05$ , em relação aos animais do grupo 0 dia ).

PPT = Placas de Peyer totais, PPDJ = Placas de Peyer do Duodeno - Jejuno e

PPI = Placas de Peyer do íleo.

(a)



29

(b)

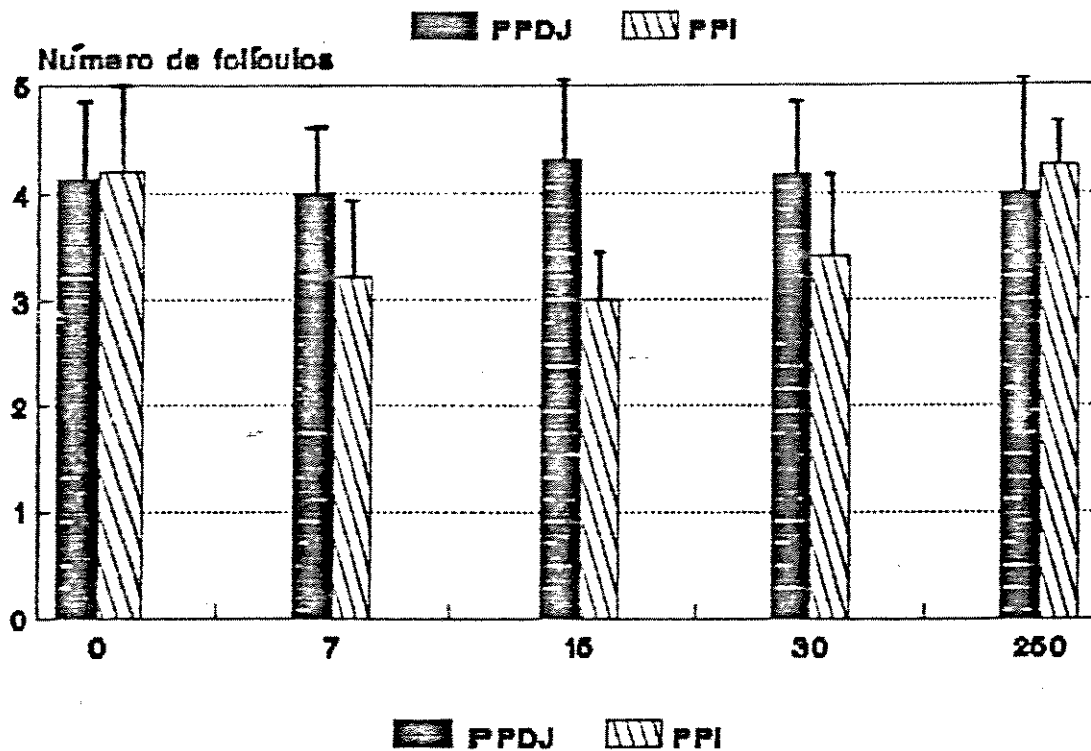


FIGURA 5 - Tamanho (a) e número de folículos (b) das placas de Peyer de camundongos normais, mantidos em biotério convencional. Número de animais, vide figura 4. PPDJ = Placas de Peyer do duodeno - jejuno, PPI = Placas de Peyer do íleo.

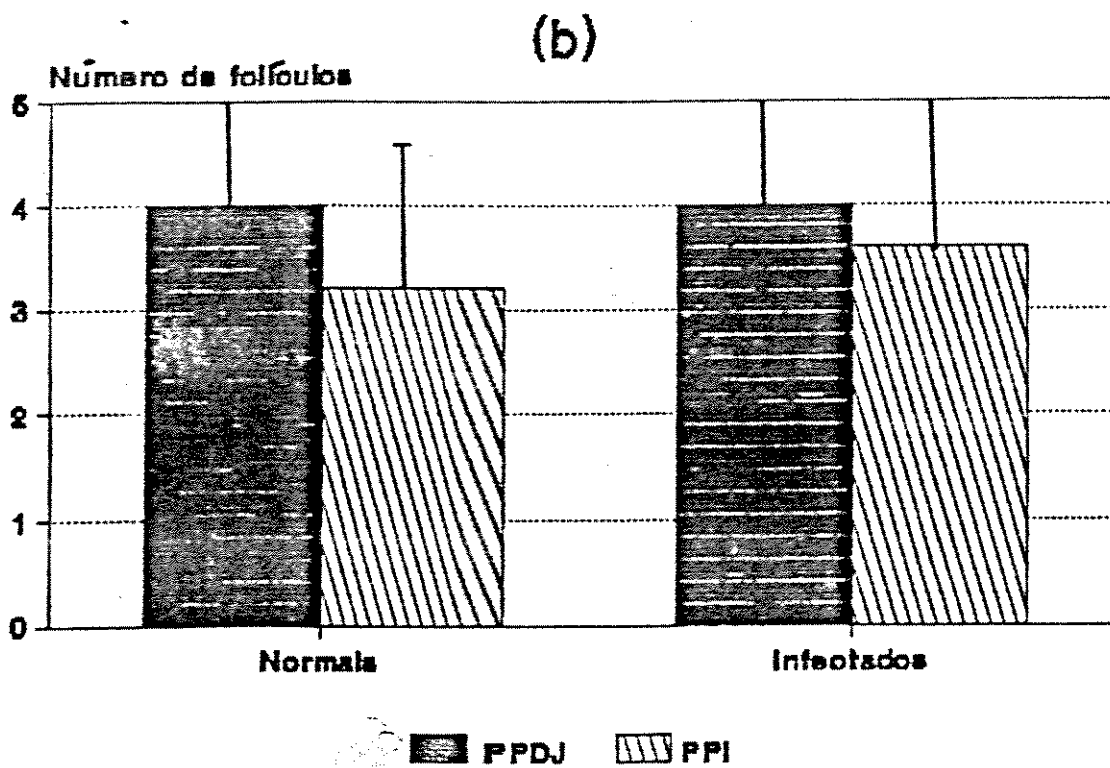
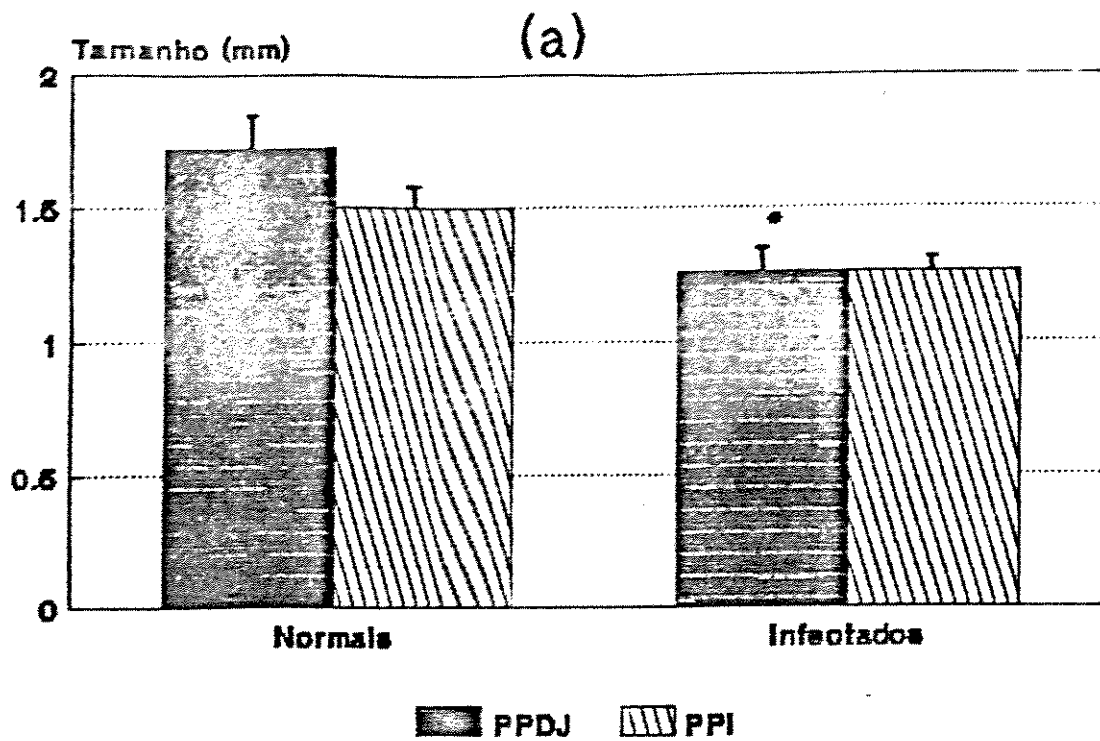
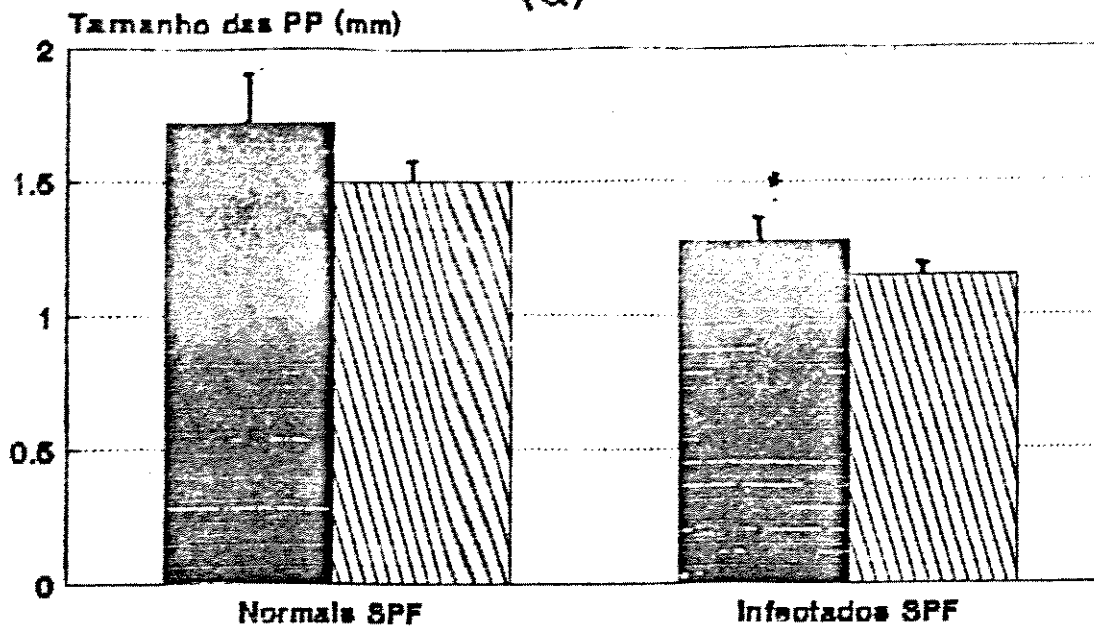


FIGURA 6 - Tamanho (a) e número de folículos (b) de placas de Peyer do duodeno - jejuno ( PPdj ) e do íleo ( PPI ) de camundongos normais e infectados com *T. cruzi*, mantidos em biotério convencional. N = 6 animais por grupo, (\* P < 0.05).

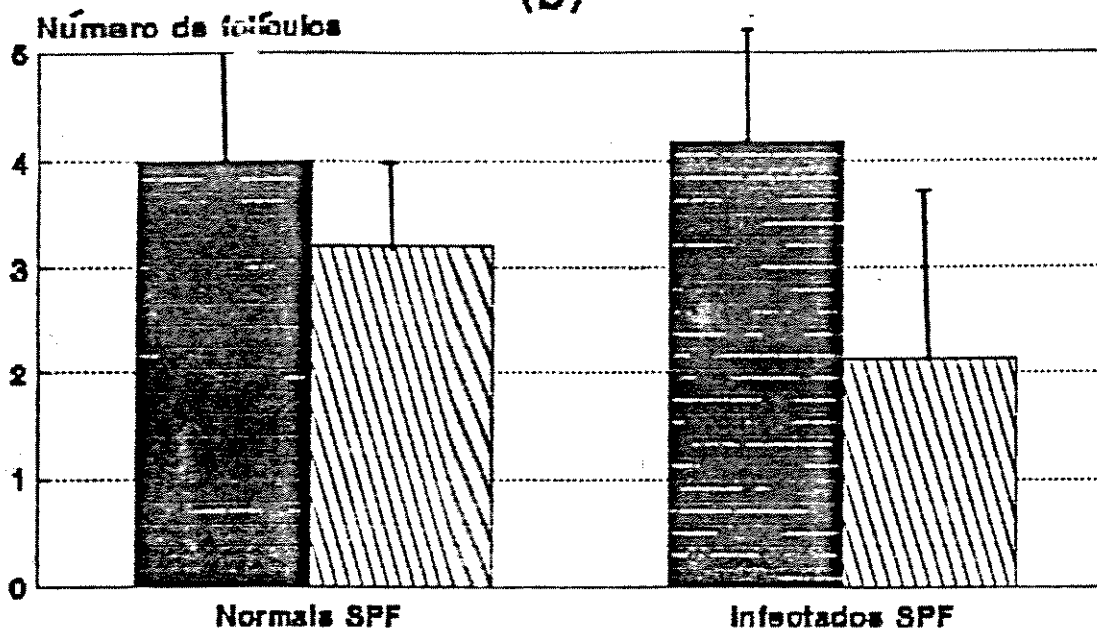
(a)



31

■ PPDJ    ▨ PPI

(b)



■ PPDJ    ▨ PPI

FIGURA 7 - Tamanho (a) e do número de folículos (b) das placas de Peyer de camundongos SPF normais e infectados com *Trypanosoma cruzi* ( sétimo dia de infecção ). Número de animais igual a 6 por grupo.

\* = Diferença significativa em relação aos animais normais (  $P < 0.05$  ).

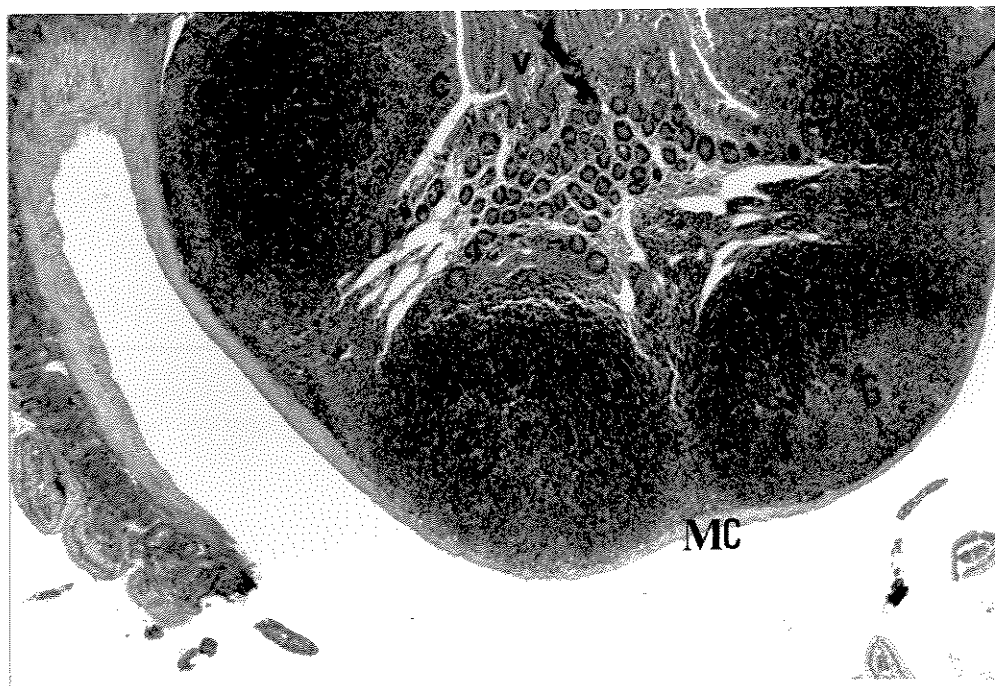


FIGURA 8 - Micrografia em que se observa um corte transversal de uma placa de Peyer do jejuno, com quatro folículos. Camundongo normal. Vê-se o centro germinativo (G), a área folicular (F), a área parafolicular (PF), a cúpula, vilosidades (V) e a camada muscular (MC). Note que os compartimentos celulares estão bem delimitados. Coloração pela hematoxilina - eosina. Aumento 64X.



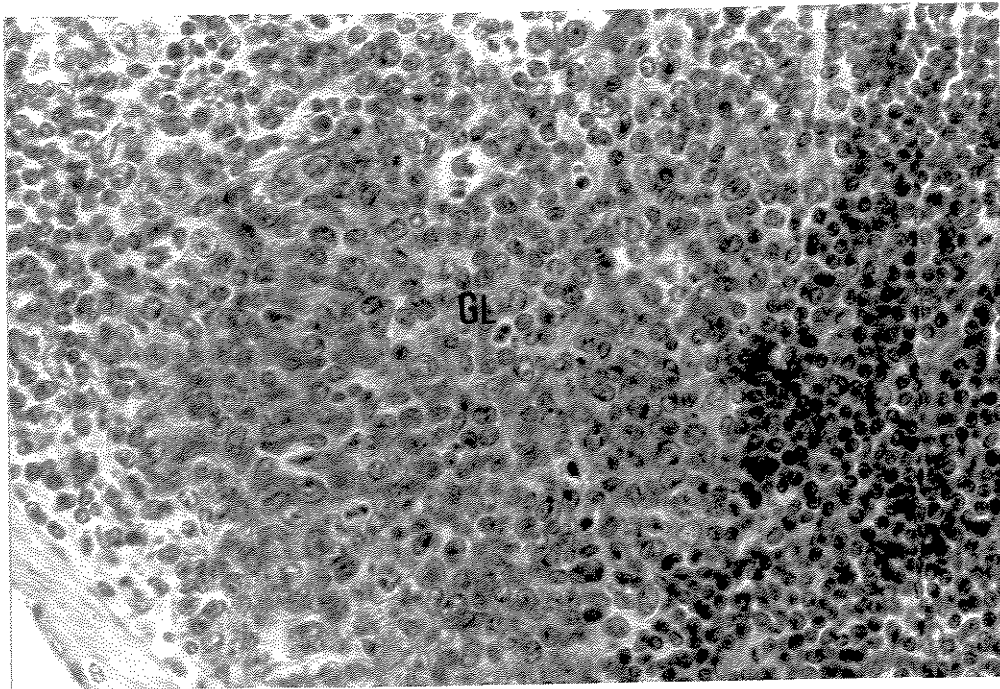


FIGURA 9 - Micrografia mostrando detalhe de um folículo de placa de Peyer do jejuno de um camundongo normal, evidenciando a zona clara do centro germinativo (GL) e a área folicular (F). Coloração pela hematoxilina eosina. Aumento 512 X.



FIGURA 10 - Micrografia de uma secção longitudinal de placa de Peyer do íleo de camundongo normal. Acham-se visíveis dois folículos. O centro germinativo (G), área folicular (F), parafolicular (PF) e a região de cúpula (C) estão bem demarcadas. Observa-se ainda as vilosidades (V) e a camada muscular (MC). Coloração pela hematoxilina - eosina. Aumento 64 X.

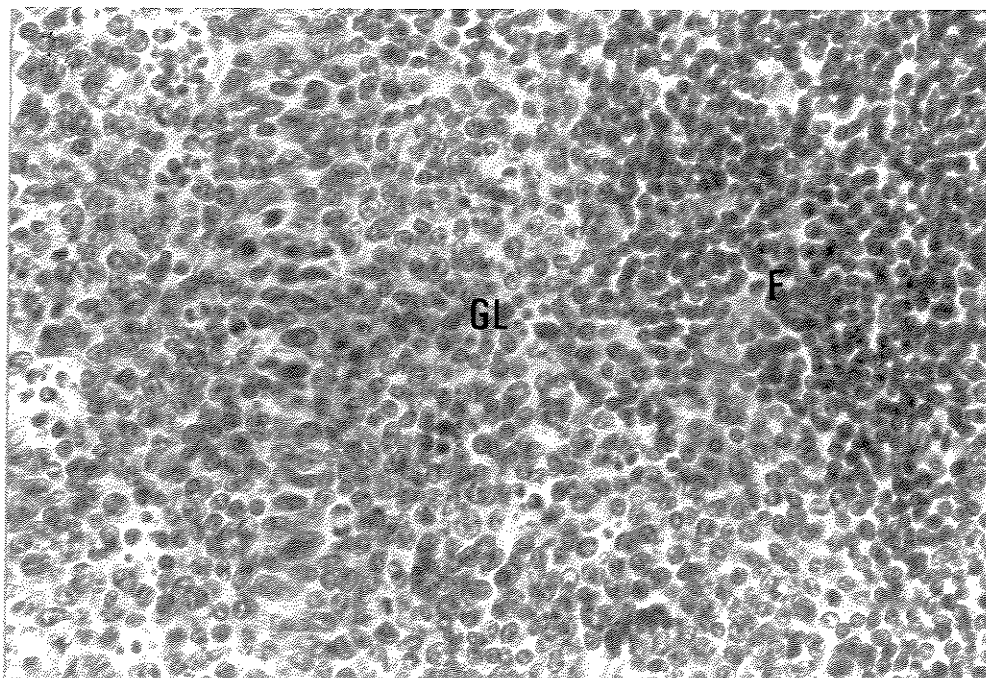


FIGURA 11 Micrografia de um folículo de placa de Peyer do íleo, de um camundongo normal. Vê-se a delimitação nítida existente entre a zona clara do centro germinativo (GL) e a região folicular (F). Coloração pela hematoxilina - eosina. Aumento 512 X.

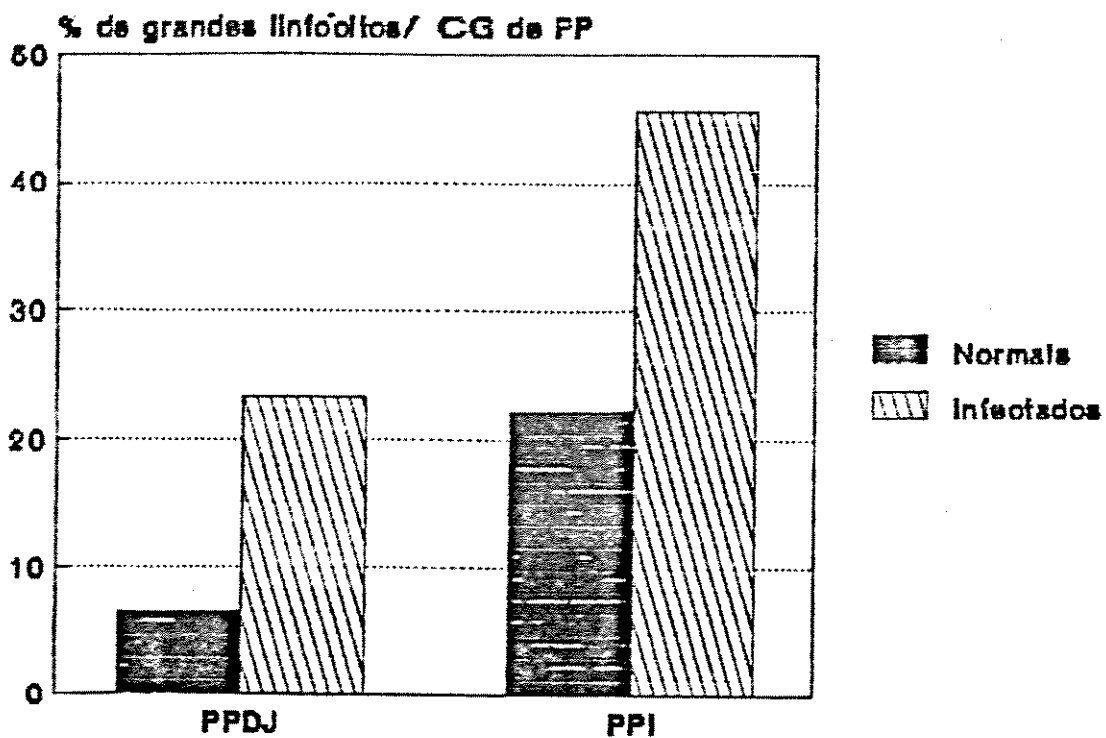


FIGURA 12 - Percentagem de grandes linfócitos presentes no centro germinativo de placas de Peyer, de camundongos normais (a) e infectados (b) ( sétimo dia de infecção ), mantidos em biotério convencional. PPDJ = Placas de Peyer do duodeno - jejuno, PPI = Placas de Peyer do íleo. Área analisada = 978,5 mm<sup>2</sup>.

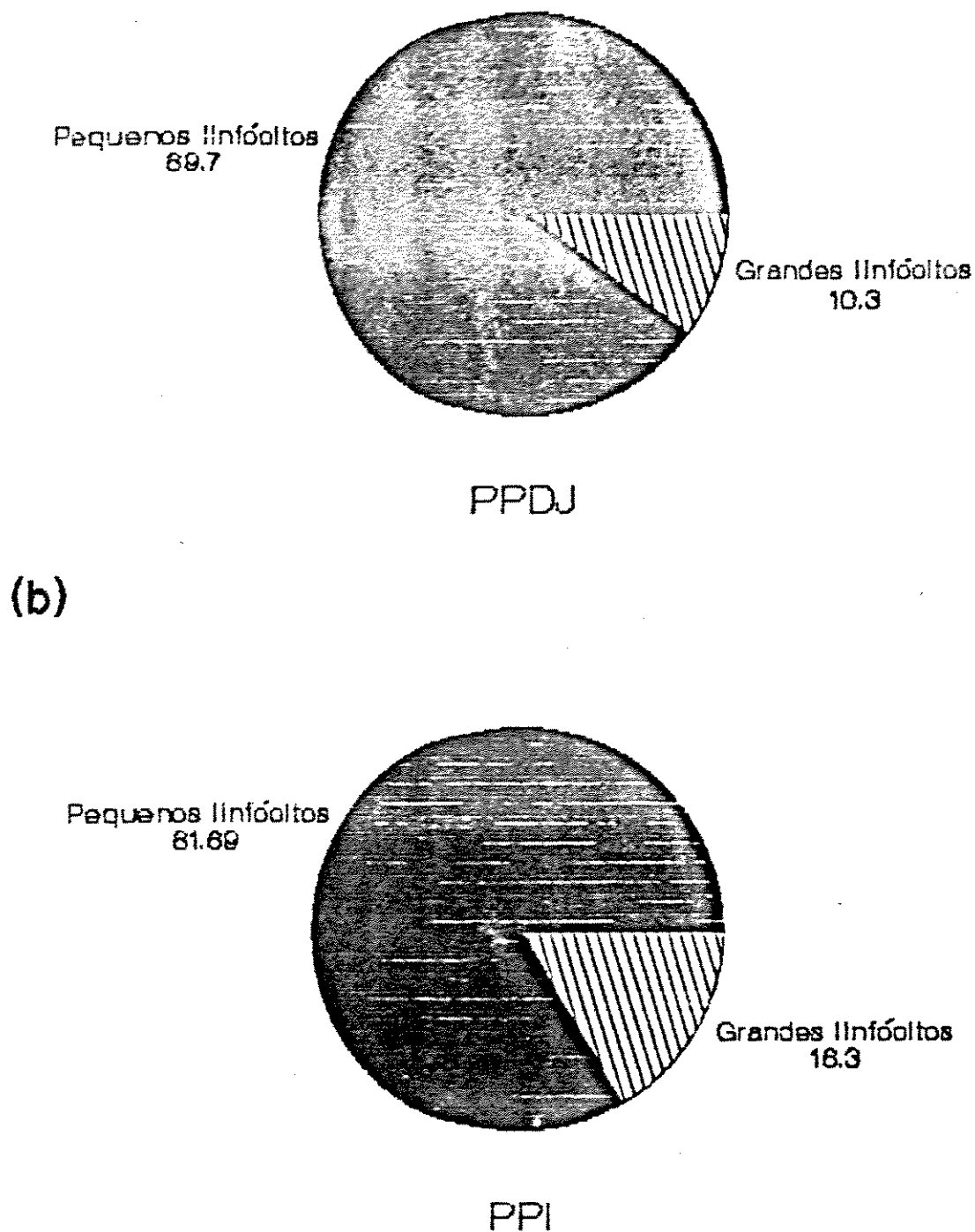


FIGURA 13 - Percentagem de grandes linfócitos presentes na área folicular de placas de Peyer do duodeno - jejuno [PPdj, (a)] e de placas de Peyer do íleo [PPI, (b)] de camundongos normais, SPF de 8 semanas de idade.

Área analisada = 170,0 mm<sup>2</sup>

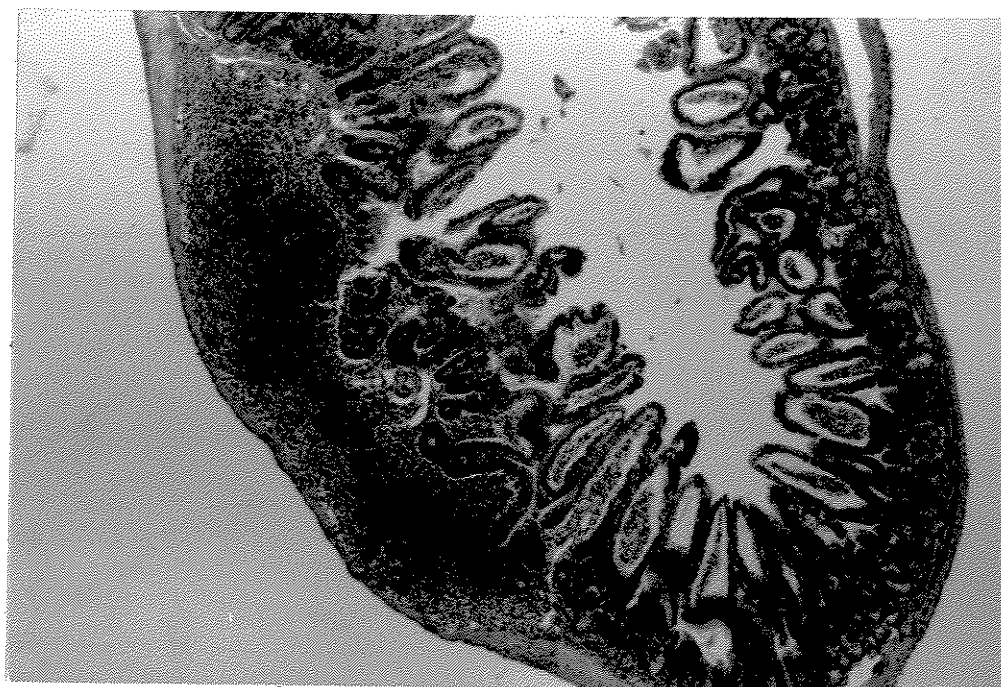


FIGURA 14 - Micrografia de um corte longitudinal de placa de Peyer do jejuno de um camundongo infectado com Trypanosoma cruzi ( sétimo dia de infecção). Note o desarranjo nos compartimentos celulares. Compare com a figura número 8. Camada muscular (MC) e vilosidades (V). Coloração pela hematoxilina - eosina. Aumento 64 X.

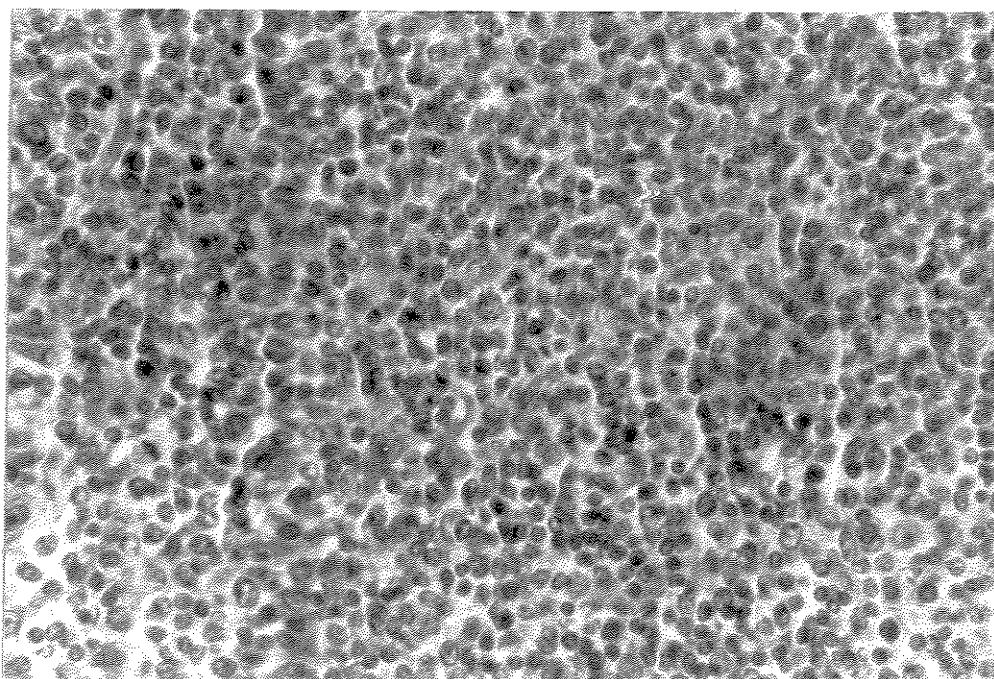


FIGURA 15 - Micrografia de um folículo de placa de Peyer do jejuno de um camundongo infectado com Trypanosoma cruzi (sétimo dia de infecção). Esta micrografia ilustra a falta de demarcação que ocorre, entre a área folicular e o centro germinativo (G), decorrente do processo infeccioso. Coloração pela hematoxilina - eosina. Aumento 512 X.

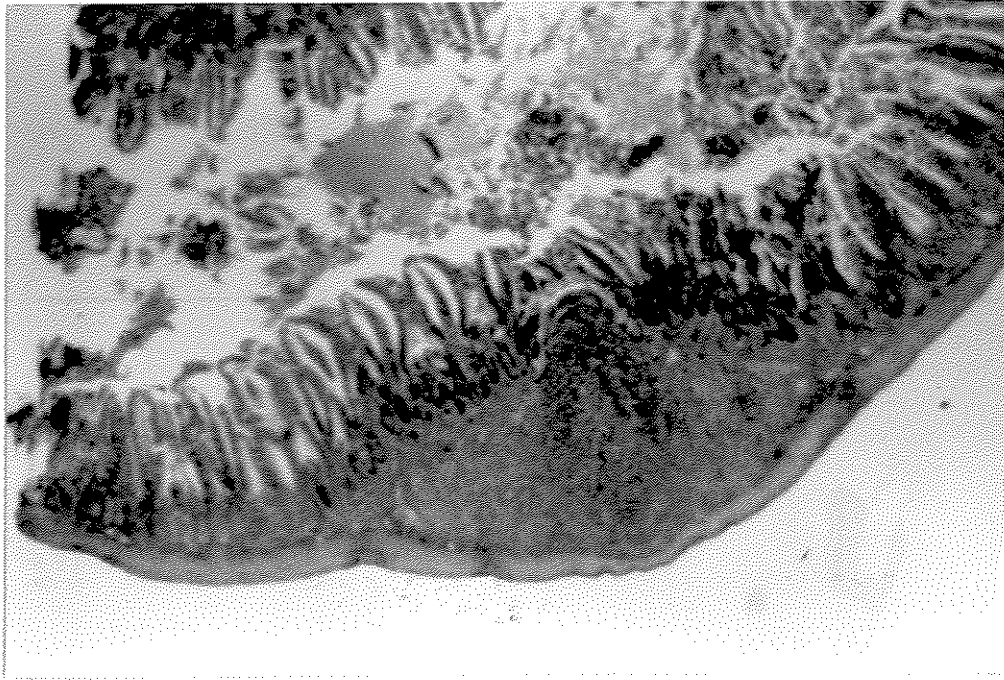


FIGURA 16 - Micrografia de um corte longitudinal de placa de Peyer do íleo de um camundongo infectado com Trypanosoma cruzi (sétimo dia de infecção), mostrando os compartimentos celulares não definidos. Camundongo C56BL/6 infectados com Trypanosoma cruzi ( sétimo dia de infecção ). Camada muscular (MC). Coloração pela hematoxilina - eosina. Aumento 64 X.



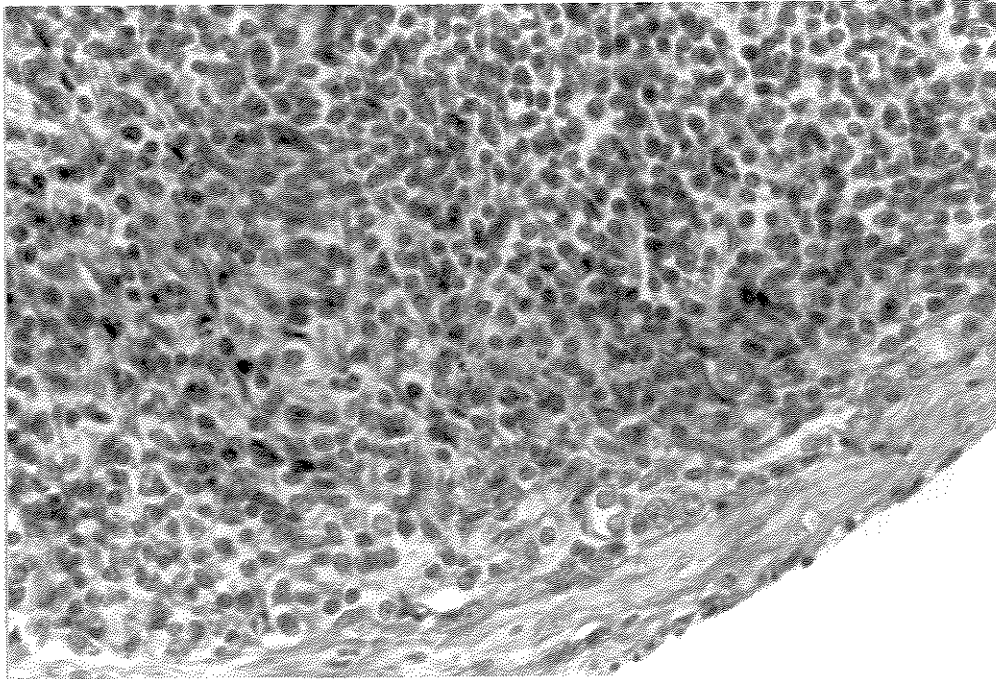


FIGURA 17 - Micrografia de um folículo de uma placa de Peyer do íleo de um camundongo infectado com Trypanosoma cruzi (sétimo dia de infecção), mostrando que o animal infectado, apresenta o centro germinativo e a área folicular não definidas. Coloração pela hematoxilina - eosina. Aumento 512 X.

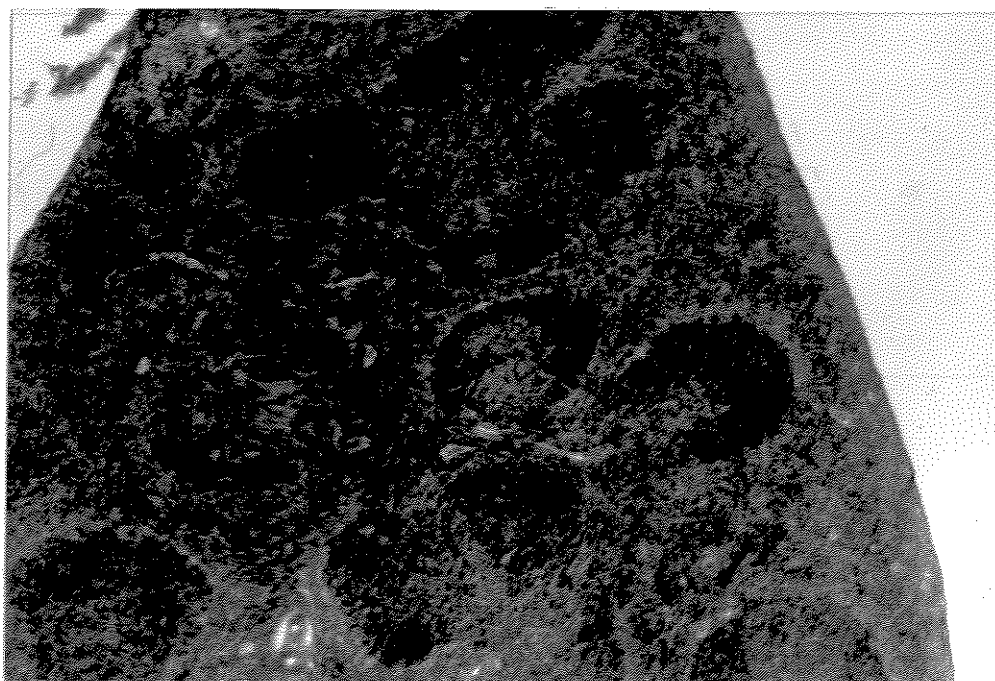


FIGURA 18 - Micrografia de um corte longitudinal de parte de um baço de camundongo normal. Polpa branca (PB) circundada por polpa vermelha (PV). Aspecto normal. Coloração pela hematoxilina - eosina. Aumento 64 X.

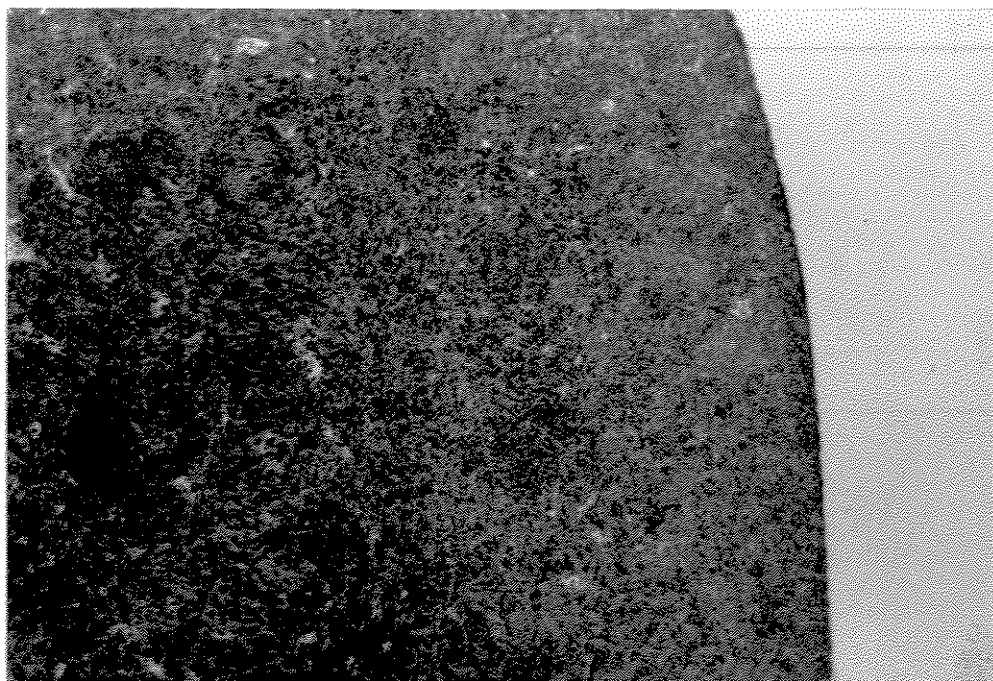


FIGURA 19 - Micrografia de um corte longitudinal de parte de um baço de um camundongo infectado com Trypanosoma cruzi (sétimo dia de infecção). Polpa branca (PB) e vermelha (PV) mal definidas. Coloração pela hematoxilina-eosina. Aumento 64 X.

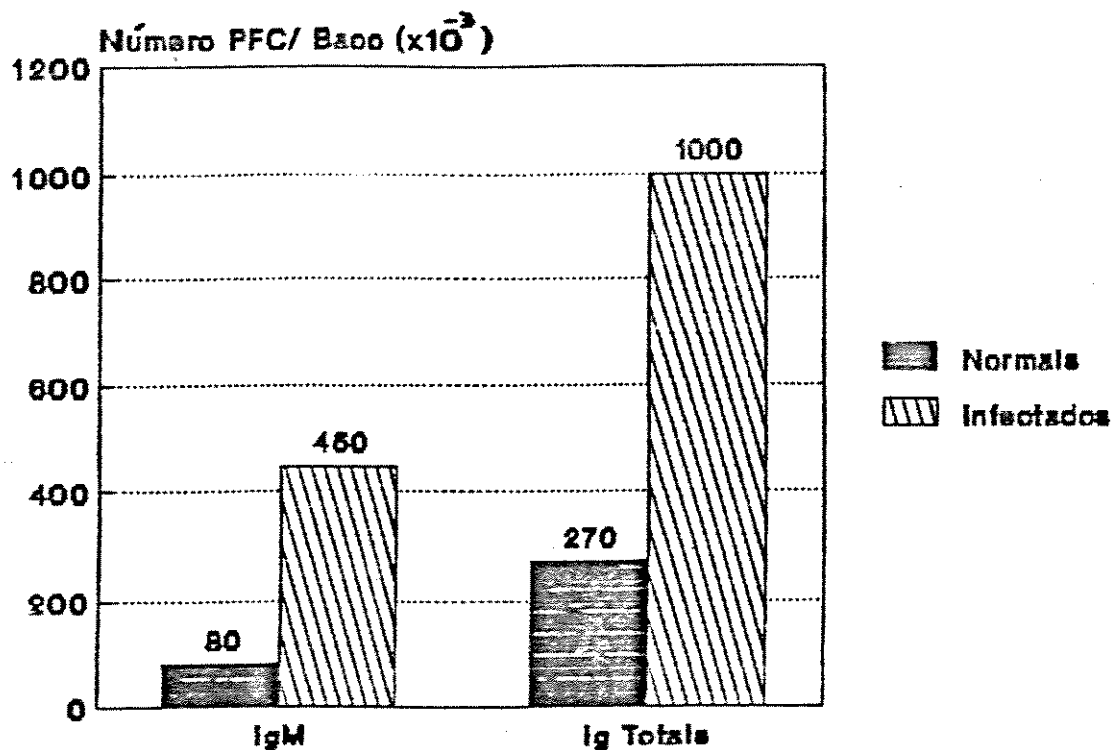
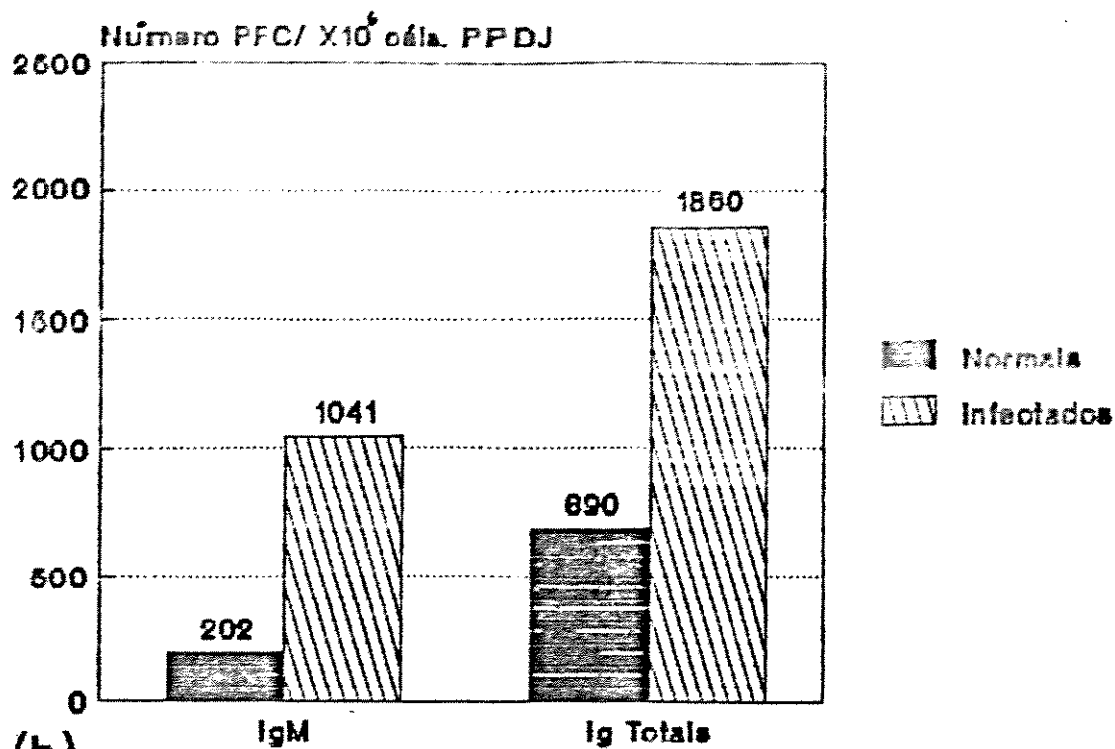


FIGURA 20 - Número de células formadoras de placas por baço de camundongos normais e infectados ( sétimo dia de infecção ), mantidos em biotério convencional. \*  $P < 0.05$  (  $n = 6$  animais por grupo ).



(b)

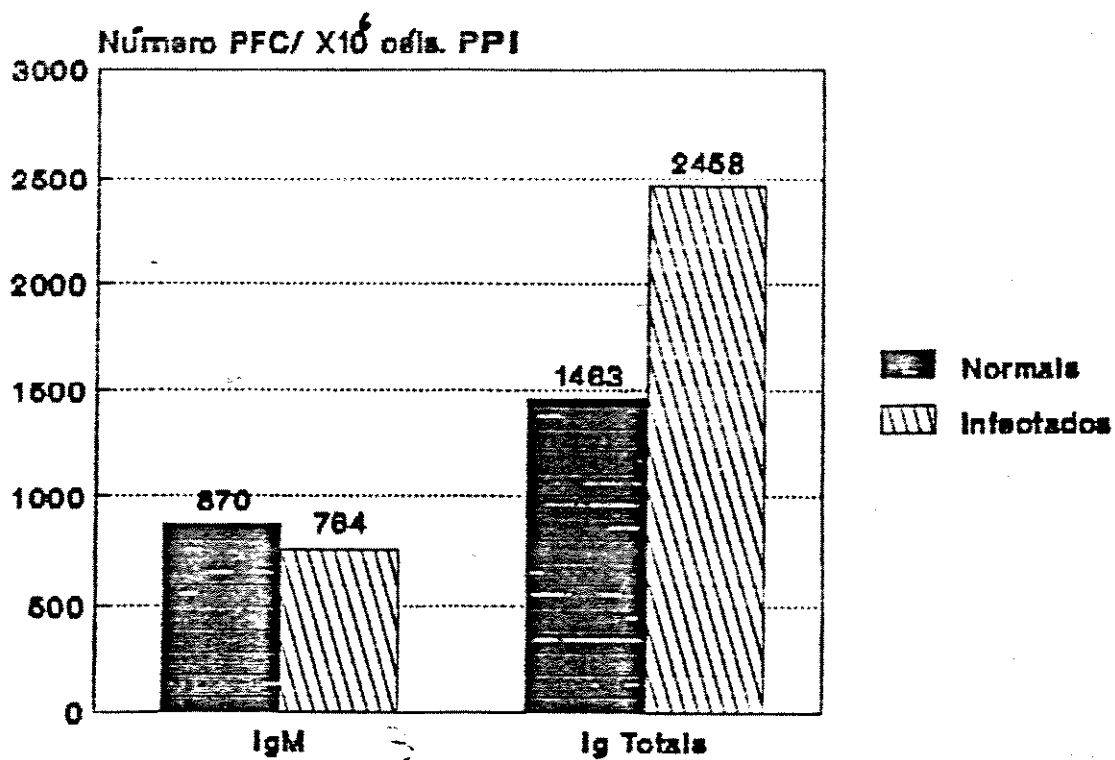
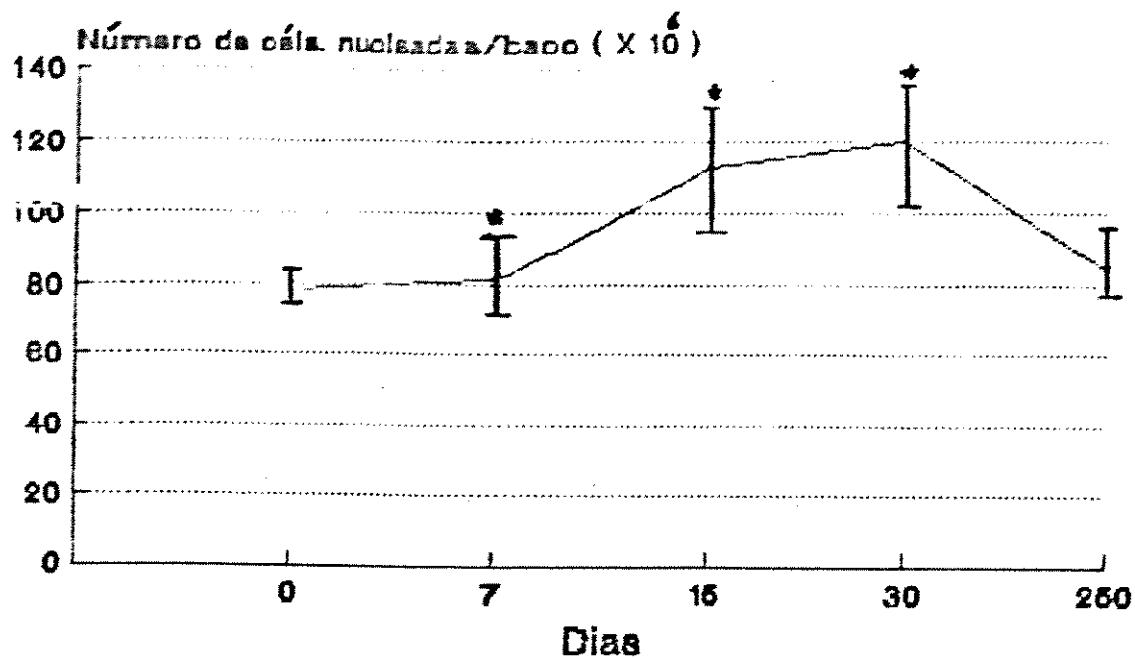


FIGURA 21 - Número de células formadoras de placas ( x 10<sup>6</sup> células de placas de Peyer do duodeno - jejuno ( a ) e do íleo ( b ) de animais normais e infectados [ 7 dia de infecção ], mantidos em condições convencionais. \* P < 0.05. ( n = 6 animais por grupo ).

(a)



— baço

(b)

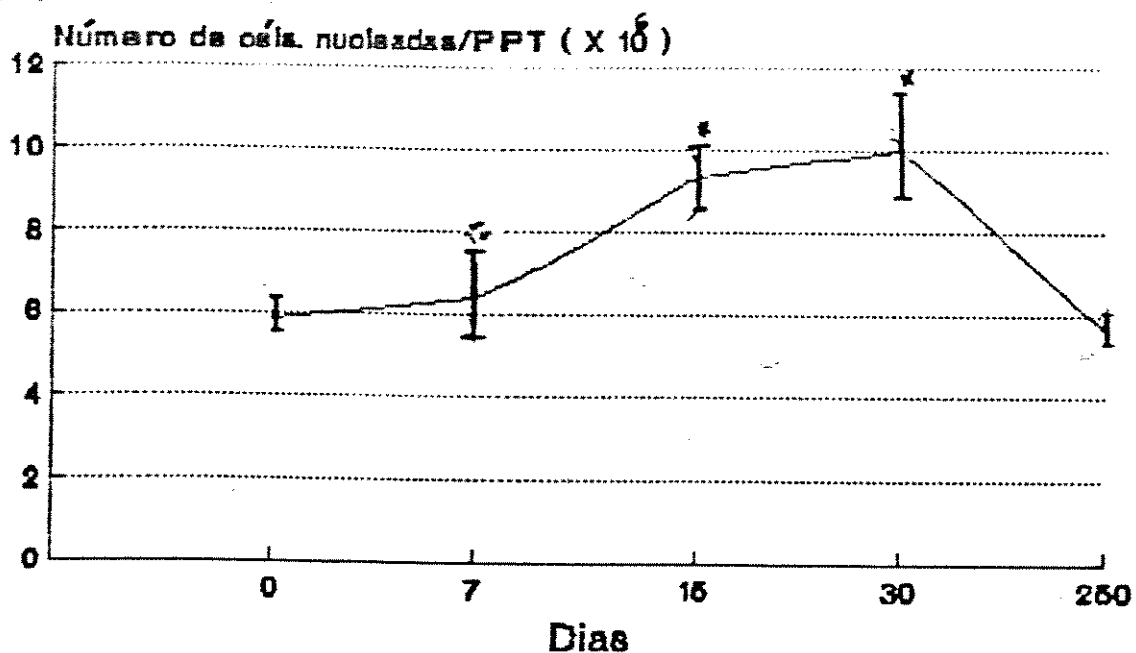
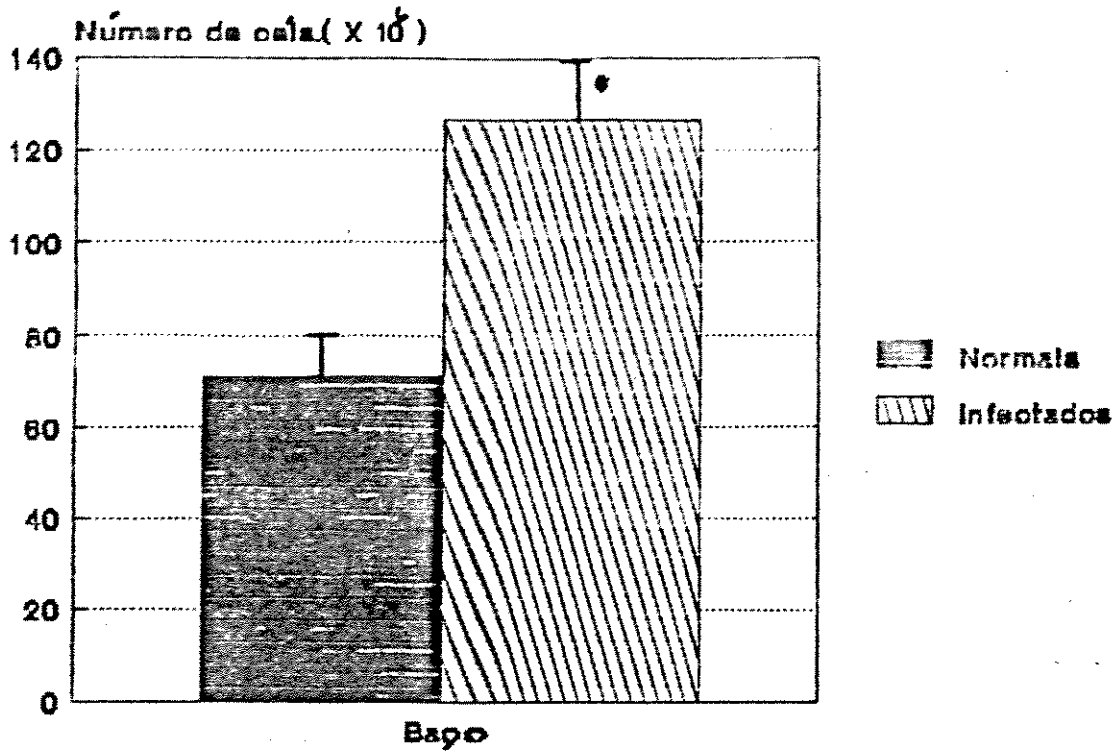


FIGURA 22 - Número total de células nucleadas por baço (a) e por placas de Peyer (b) de camundongos normais, mantidos em condições convencionais.

\* P < 0.05. n = 6 animais por grupo.

(a)



(b)

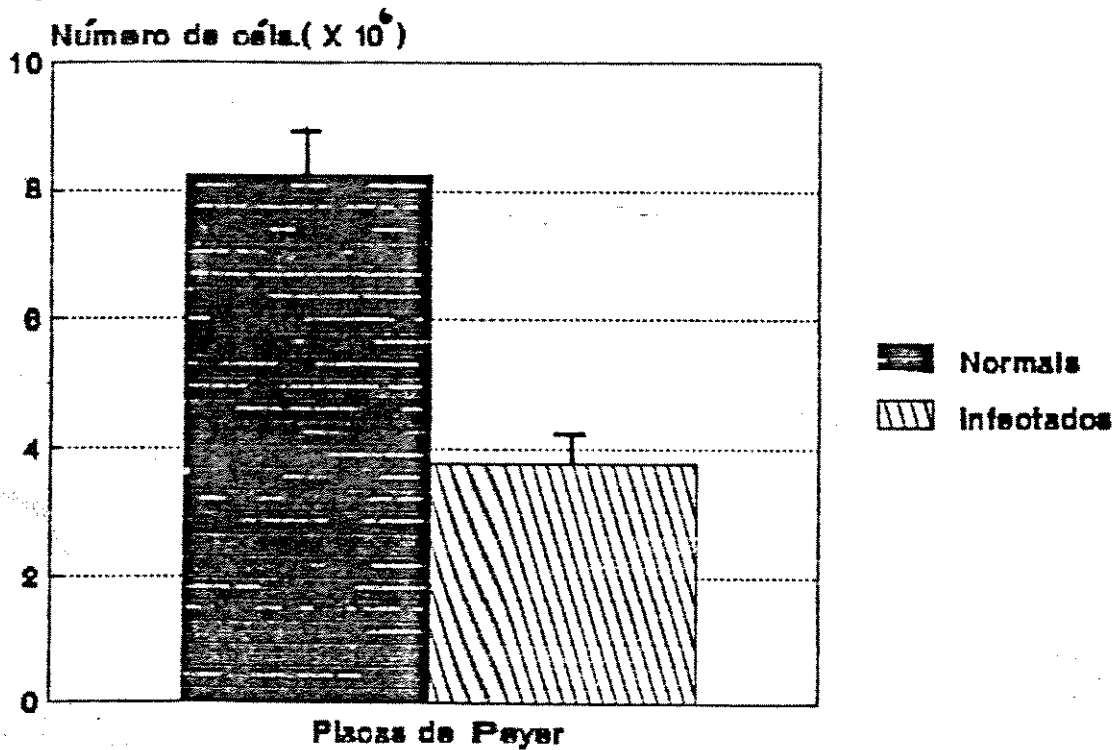


FIGURA 23 - Número de células nucleadas por baço (a) e de placas de Peyer (b), de camundongos normais e infectados ( 7 dia) , mantidos em condições convencionais.

\* P < 0.05, 6 animais por grupo.

#### 4.0 DISCUSSÃO

A existência de reações cruzadas, a imensa diversidade dos anticorpos e a detecção de anticorpos naturais multiespecíficos corroboraram com as idéias de JERNE ( 1974 ) apontando para uma etapa de novas abordagens , centrada no entendimento de uma fisiologia do sistema imunológico.

No entanto, uma questão adquire importância crítica quando se opta por estudar o sistema imunológico, sob essa perspectiva: como medir na prática as atividades internas do sistema imunológico, se a metodologia tradicional utiliza quantificações "específicas" para antígenos ?

A resposta para esta questão , veio pelo desenvolvimento de métodos voltados para as atividades fisiológicas do sistema imunológico, por exemplo, métodos de determinação do número total de células secretoras independentes da especificidade (BERNABÉ et alii , 1981).

A estrutura e função dos órgãos linfóides associados às mucosas permanecem ainda pouco explorados. A importância de se estudar, por exemplo, as placas de Peyer sob o ponto de vista anatômico e imunofisiológico diz respeito a sua associação com infecções, reações inflamatórias , e processos neoplásicos. O interesse aumenta quando se estuda tumores, freqüentemente desenvolvidos numa estreita relação com o tecido linfóide associado com mucosas.

Atendendo aos objetivos deste trabalho, partimos inicialmente para a compreensão da organização das placas de Peyer em camundongos normais, mantidos em condições convencionais ou SPF (livres de patógenos conhecidos), determinando seu número, tamanho, número de folículos e distribuição, assim como número de células nucleadas totais.

Quanto ao número, nossos experimentos demonstraram que os camundongos de 8 semanas de idade SPF, possuem cerca de 6 placas de Peyer, distribuídas



irregularmente, ao longo do intestino delgado e esse número atinge o ápice (10 PP, com média de  $8,2 \pm 0,66$ ) quando os animais possuem 12 semanas de idade (figura 4).

CORNES (1965), investigando placas de Peyer de intestinos humanos mostrou que estas atingem o máximo na puberdade (cerca de 240) e declinam com a idade. Em nossos experimentos, os camundongos mantidos por 250 dias em biotério convencional, apresentaram PP em número semelhante aqueles de 8 semanas, sugerindo que as PP de camundongos também declinam com a idade, semelhante ao que acontece com as PP de humanos.

Estudos realizados com camundongos SPF, mostraram que após a exposição destes animais ao ambiente, as PP aumentam de tamanho (SMITH et alii, 1987). Nossos resultados demonstraram que, a transferência de animais SPF para condições convencionais promove um aumento no número de PP, com uma tendência de aumento no tamanho destas (Tabela 1 e Figuras 4 e 5). Este aumento se deu nos primeiros 30 dias de permanência naquelas condições, e pode ser devido a presença de microrganismos que estejam interagindo com o tecido linfóide de mucosas.

Em diversas espécies, como ovinos (REYNOLDS et alii, 1985; REYNOLDS & KIRK, 1989; LANDSVERK et alii, 1991), bovinos (LANDSVERK, 1984) e suínos (BINNS & LICENCE, 1985; PABST et alii, 1988, 1990), há dois tipos de Placas de Peyer, definidos pela localização diferenciada, desenvolvimento, estrutura e função: placas discretas do duodeno - jejuno e placas longas e contínuas do íleo terminal.

As PP do duodeno de humanos como de camundongos, apresentam-se mais discretamente do que as encontradas no jejuno e íleo (CORNES, 1965; ABE & ITO, 1977); fato igualmente observado no presente estudo.

Os camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* (sétimo dia de infecção), mantidos ou não em isolador (SPF) exibiram uma redução no número e tamanho de suas PP (Tabela 2 e Figuras 6 e 7). O número de folículos presentes nas PP do íleo desses animais sofreram também redução, contrário às PP do duodeno - jejuno, que não variou o seu número de folículos em função da presença do agente infeccioso (Figura 7 b).

A análise de PP através da microscopia de luz tem revelado a existência de diferenças marcantes entre placas de Peyer do jejuno e do íleo de espécies de mamíferos ruminantes (CARLENS, 1928 ; REYNOLDS & MORRIS, 1983 ; BINNS & LICENCE, 1985 ; PABST et alii, 1988 ; REYNOLDS & KIRK , 1989 ; LANDSVERK, 1991, Figura 2 ) e carnívoros ( HogenEsch & FELSBURG, 1992 ). Não há evidências para a existência de diferenças regionais entre PP do homem e de roedores (CORNES, 1965 ; SOBHDON, 1971).

Os resultados do presente trabalho confirmam a inexistência de diferenças regionais entre placas de Peyer de camundongos , fêmeas, da linhagem isogênica C57BL/6 , já que observamos um padrão morfológico comum entre placas do duodeno - jejuno e íleo ( figuras 8 e 10 ).

A análise histológica dos compartimentos celulares que constituem cada placa, revelou que a densidade de pequenos linfócitos é maior nas áreas foliculares e menor no centro germinativo ( ABE & ITO, 1977 ). A análise realizada com PP do duodeno - jejuno e íleo , revelou que PP do íleo possuem maior número de grandes linfócitos, presentes tanto nos centros germinativos, como nas áreas foliculares em relação às PP do duodeno - jejuno (Figuras 12 e 13). As PP de animais infectados mostraram profundas alterações em sua citoarquitetura (Figuras 14 a 17). Os centros germinativos de placas de Peyer

do íleo apresentaram uma porcentagem de grandes linfócitos aumentada nos animais infectados, em relação aos animais normais ( Figura 12 ).

Realizamos também análise histológica dos baços de camundongos infectados, que confirmou o grande comprometimento do órgão com o processo infeccioso inicial, já descrito em estudos de imunoparasitologia. (SANTANA, 1990) (Figuras 18 e 19 ).

As mudanças no número de células nucleadas de baço e de PP totais, ocorridas durante a permanência dos animais em condições convencionais ( Figura 22 ), demonstraram um aumento nos 30 primeiros dias e uma tendência de queda com o avançar da idade. As células de baço aumentaram cerca 2 vezes nos animais infectados ( Figura 23a ), enquanto células de PP diminuíram ( Figura 23b ). O aumento de células do baço pode ser explicado pela intensa proliferação de linfócitos B ( Figuras 12, 13 e 20 ) que ocorre na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* ( MINOPRIO, 1986 ), já a diminuição do número de células de PP pode ser explicado pela redução do número e tamanho destas , citado anteriormente.

A respeito da imunidade da mucosa intestinal de camundongos, os estudos tem se concentrado na determinação quantitativa de imunoglobulinas, particularmente IgA, presente nas secreções intestinais. Nossos resultados, ainda que de natureza semiquantitativa, sugerem que os líquidos intestinais de camundongos infectados possuem uma concentração maior de proteínas associada a uma maior concentração de IgA em relação aos camundongos normais.

A análise do PFC de células de PPDJ e PPI , de camundongos normais indicam que a produção de Igs difere nos dois sítios. O aumento do número de PFC encontrado nas PPI de camundongos infectados, para Igs totais, e redução do número de PFC para IgM sugerem que o fenômeno de " switch " possa estar

intensificado nos animais infectados com *T. cruzi* ( Figura 21b ).

De um modo geral , procuramos demonstrar que é possível uma correlação da ativação policlonal, observada na fase aguda da doença de Chagas, ao nível do baço, linfonodos, e ao nível da mucosa intestinal, particularmente nos compartimentos de linfócitos T e B presentes nas placas de Peyer, de camundongos C57Bl/6, causando profundas alterações na citoarquitetura destes órgãos linfóides .

## 5 - CONCLUSÕES

- 1 - Não há evidências para diferenças morfológicas entre placas de Peyer do duodeno-jejuno e íleo de camundongos;
- 2 - As placas de Peyer de camundongos provenientes de colônias S.P.F., aumentam em número quando estes animais são transferidos para condições convencionais ;
- 3 - Os centros germinativos e áreas foliculares de placas de Peyer do íleo possuem quantidade maior de grandes linfócitos em comparação aos centros germinativos e áreas foliculares das placas de Peyer do duodeno - jejuno;
- 4 - Placas de Peyer do duodeno - jejuno e do íleo respondem de maneira diferente à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*;
- 5 - Os linfócitos de placas de Peyer de camundongos no sétimo dia de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* estão aumentados e ativados, possivelmente de natureza policlonal;
- 6 - As placas de Peyer de animais infectados com *Trypanosoma cruzi* apresentam uma redução significativa no número e tamanho;
- 7 - A análise e utilização de algumas características dos centros germinativos das placas de Peyer podem favorecer o entendimento das interações, funções e o papel destes na resposta humoral global do sistema imunológico.

## 6 - RESUMO

O estudo da atividade imunológica sob a ótica de um sistema fisiológico tem sido pouco explorado e isto fica mais evidente com respeito ao papel do tecido linfoide associado as mucosas, que já se demonstrou ser o maior produtor espontâneo de imunoglobulinas dos mamíferos e as placas de Peyer, agregados linfóides distribuídos ao longo do intestino delgado e grosso, tomam importante papel neste processo. Paradoxalmente em ruminantes existem dois tipos de placas de Peyer; placas do jejuno e do íleo, distinguidas pela sua arquitetura, composição de linfócitos e ontogenia.

Um aspecto central na abordagem de Jerne ao sistema imunológico, é que um distúrbio desencadeado pelo antígeno afeta muito mais linfócitos que aqueles capazes de interagir diretamente com o antígeno, e a ativação policlonal é um bom exemplo disso. A ativação policlonal de células B e T é muito freqüente em diferentes processos infecciosos. Este fenômeno já está bem estabelecido na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*, onde se observa uma maciça proliferação de células B no baço e nos linfonodos. Neste trabalho, camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* ou não, tiveram suas placas de Peyer analisadas quanto ao número, tamanho e distribuição; submetidas a análise histológica e processadas para a determinação do número de PFC reverso, com hemácias sensibilizadas com proteína A. Os resultados do número de PFC reverso, realizado no sétimo dia de infecção, utilizando linfócitos de placas de Peyer do duodeno - jejuno e de placas do íleo, demonstraram que estes estão aumentados e ativados, possivelmente de natureza policlonal no sétimo dia de infecção.

A análise histológica de placas de Peyer de camundongos normais não evidenciaram a existência de diferenças na arquitetura entre as mesmas, como

descrito em ruminantes, embora os centros germinativos e as áreas foliculares de placas localizadas no íleo, possuam quantidade maior de grandes linfócitos em comparação aos centros germinativos e áreas foliculares das placas de Peyer do duodeno-jejuno. Os animais infectados apresentaram os centros germinativos, as áreas foliculares e parafofoliculares, tanto de placas do duodeno-jejuno como do íleo, alteradas em sua citoarquitetura. As placas de Peyer destes animais apresentaram ainda, uma redução significativa no número.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K & T, ITO. A qualitative and quantitative morphologic study of Peyer's patches of the mouse. Arch. Histol. Jap. 40, (5): 407-20, 1977
- ACHTNICH, M & ZOLLER. Autoreactive antibodies in thymus and spleen of neonatal and young adult Balb/c mice: influence of prenatal tolerization. Scand. J. Immunol. 33: 25-36, 1991.
- ARAÚJO, P.M.F., HOLMBERG, D., MARTINEZ-A, C. & COUTINHO, A. Idiotypic multireactivity of "Natural" Antibodies : "natural" anti-idiotypes also inhibit helper cells with cross-reactive clonotypes. Scand. J. Immunol. 25: 497-506, 1987.
- BERNABÉ, R. R.; TUNESKOG, M.; FORNI, L.; MARTINEZ-A., C.; HOLMBERG, D.; IVARS, F; COUTINHO, A. The protein A plaque assay for the detection of immunoglobulin - secreting cells. In Immunological Methods, Vol. III. Academic Press INC., Cap. 9, 1981, p.187-98.
- BIENENSTOCH, J. & DOLEZEL, J. Peyer's patches: lack of specific antibody-containing cells after oral and parenteral immunization. J. Immunol. 106: 938, 1971.
- BIENENSTOCH, J.; ERNST, P.B. & UNDERDOW, B. J. The gastrointestinal tract as an immunologic organ - state of the art. Annals. Allerg. 59: 17-20, 1987.



- BINNS, R. M. & LICENCE, S. T. Patterns of migration of labelled blood lymphocyte subpopulations: evidence for two types of Peyer's patches in the young pig. Adv. Exp. Med. Biol., 186 : 661-68, 1985.
- BJERKE , K. ; BRANDTZAEG , P. & FAUSA , O. T cell distribution is different in follicle - associated epithelium of human Peyer's patches and villous epithelium. Clin. Exp. Immunol. 74 : 270-75, 1988.
- BOCKMAN, D. E. & COOPER, M.D. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendicis and Peyer's patches. An electron microscopic study. Am. J. Anat. 136, 455 - 478, 1973.
- BRENER , Z. Doença de Chagas . 1a. Ed. R. Cançado (ed). Belo Horizonte, Imprensa oficial do Estado de Minas Gerais, Cap.24, p.501-16,1968.
- BURNET, F. M. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. Aust. J. Sci. 20 : 67-77, 1957.
- CARLENS, O. Studien über das Lymphatische Gewebe des Darmkanals bei Einigen Haustieren, mit Besonder Berücksichtigung der Altersingvolution dieses Gewebes im Dunndarm des Rindes. Z. Anat. Entwickl-Gesh. 86: 393-493, 1928.

- CEBRA, J.J.; GEARHAT, P.J.; KANAT, R.; ROBERTSON, S.M. & TSENG, J. Origin and differentiation of lymphocytes involved in the secretory IgA response. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41 : 201, 1977.
- CEBRA, J.J.; GEARHART, P.J.; HALSEY, J.F.; HURWITZ, J.L. & SHAHIN, R.D. J. Reticuloendothel. Soc., 28:625, 1980
- CHALLACOMBE, S. J. & TOMASI Jr., T. B. Systemic tolerance & secretory immunity after oral immunization. J. EXP. MED. 152: 1459 - , 1980.
- CORNES, J.S. Number, size and distribution of Peyer's patches in human small intestinal. Gut, 6: 225-30, 1965.
- COOPER, G.N. & TURNER, K. Immunological responses in rats following antigenic stimulation of Peyer's patches. 1 - characteristics of the primary response. Aust. J. exp. Biol. Med. Sci. 45: 363-78, 1967.
- COUTINHO, A.; FORNI, L.; HOLMBERG, D.; IVARS, F. & VAZ, N. M. From antigen-centered, clonal perspective of immune response to an organism-centered, network perspective of autonomous activity in a self-referential immune system. Immunol. Rev., 79 : 151-68, 1984.
- COUTINHO, A.; HOLMBERG, D.; MARTINEZ-A.C.; FREITAS, A.; LARSSON, E.-L.; PEREIRA, P. & BANDEIRA, A. Internal activity of the immune system and its physiologic significance. Hematol. Blood. Transf., 29 : 477-80, 1985.

- COUTINHO, A. Beyond Clonal Selection and network. Immunol. Rev. ,110 : 64-87, 1989.
- CRABBE, P. A.; NASH, D. R.; BAZIN, H.; EYSEN, H. & HERMANS, J.F. Immunohistochemical observations on lymphoid tissues from conventional and germ-free mice. Lab. Invest. 22: 448-57, 1970.
- CRAIG, S.W. & CEBRA, J.J. Peyer's patches : An enriched source of precursors for IgA producing immunocytes in the rabbit. J. Exp. Med. , 134 : 188-200, 1971.
- CRANDALL, C.A. & CRANDALL, R.B. *Ascaris suum*: Immunoglobulin response in mice. Exp. Parasitol. , 30: 426 - 37, 1971.
- DIGHIERO, G ; LYMBERI, P. ; HOLMBERG , D. ; LUNDRVST, I. Murine hybridomas secreting natural antibody reacting with self antigen. J. Immunol. ,131 : 2267-72, 1983.
- D' IMPERIO LIMA, M. R. ; JOSKOWICZ, M. ; COUTINHO, A. KIPNIS, T.; & ELSEN, H. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque - forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Eur. J. Immunol. 15: 201-3, 1985.

- D' IMPERIO LIMA, M.R.; EISEN, H.; MINOPRIO, P.; JOSKOWICZ, M. & COUTINHO, A.  
Persistence of polyclonal B-cell activation with undetectable parasitemia  
in late stages of experimental Chagas's disease. J. Immunol., 137: 353- 1986.
- DOE, W. F. , The intestinal immune system. Gut, 30: 1679 - 1685, 1989.
- DUCROC, R.; HEYMAN, M. ; BEAUFRERE, B. ; MORGAT, J.L & DESJUX, J.F. Horseradish  
peroxidase transport across rabbit jejunum and Peyer's patches in vitro.  
Am. J. Physiol., 245: 54, 1983.
- ELSON, C.O. ; HECK, J.A. & STROBER, W. T cell regulation of murine IgA  
synthesis. J. Exp. Med. 149: 632 , 1979.
- ENDERS, G., BALLHAUS, S. & BRENDDEL, W. The influence of Peyer's patches  
on the organ - specific distribution of IgA plasma cells. Immunology 63:  
141 - , 1988.
- ERMAK, T.H. & R.L., OWEN. Differential distribution of lymphocytes and  
accessory cells in mouse Peyer's patches. Anat. Rec 215: 144 - 152, 1986.
- FAULK, W. P.; Mc CORNIC, J.N. ; GOODMAN, J.M; YOFFEY & FUNDENBERG,  
H.H. Peyer's patches: morphologic studies. Cell. Immunol. 1 500-520, 1971.
- GEBBERS , J.-D & LAISSUE, J.A. Immunologic structures and functions of the  
gut. Schweiz. Arch. Tierheilk, 131: 221-38, 1989.
- GILBERT, B.; DIGHIERO G. & AVRAMEAS S. Naturally-occurring antibodies against  
nine common antigens in normal humans. I. detection, isolation,

characterization. Immunol., 128: 2779 - 87 ,1982.

HARTREE, E. F. Determination of protein : a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Bioch., 48 : 422 - 427, 1972.

HEATLE, R.V. ; J.M. STARK; P. HORSEWOOD; E. BANDOUVAS; F. COLE, and J. BIENESNTOCK. The effects of surgical removal of Peyer's patches in the rat on systemic antibody responses to intestinal antigen. Immunol. 44: 543 - 1981.

HENRY, C., FAULK, P.W.; KUHN, L ; YOFFEY, J.M. & FUNDERBERG, H.H. Peyer's Patches: Immunologic Studies J. Exp. Med. , 131: 1200 - 10, 1969.

HOGENESCH ,H. & FELSBURG, J. Immunohistology of Peyer's patches in the dog. Vet. Immunol. Immunopathol. 30: 147-60, 1992.

HOLMGREN, J. Mucosal immunity and vaccination . FEMS. Microb. Immunol. , 89: 1-16, 1991.

HUSBAND, A.J. & GOWANS J.L. The origin and antigen - dependente distribution of IgA - containing cells in the intestine. J. Exp. MED. 148:1146 - 1150, 1978.

JERNE, N.K.. The Natural selection theory of antibody formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 41 : 849-60, 1955.

- JERNE , N.K. Towards a network theory of the immune System. Ann. Inst. Pasteur, 124 (c): 373-89, 1974.
- KAWANISHI, H., SALTZMAN, E. & STOBER, W. Mechanisms regulating IgA class - specific immunoglobulin production in murine - gut associated lymphoid tissues. I- T cells derived from Peyer's patches that switch sIgM B cells to sIgA B cells in vitro. J. Exp. Med. 157: 433 - , 1983.
- KAWANISHI, H., & MIRABELLA, S. Regulation of mucosal IgA production in vitro by autoreactive immunoregulatory T cells from murine Peyer's patches. Cell Immunol. 114: 324 - , 1988.
- KUNKEL, H.G. Individual antigenic specificity and diversity of human antibodies. Fed. Proc., 29 : 55-60, 1970
- LANDSVERK, T. ; HALLERAKER, M. ; ALEKSANDERSEN M. ; McCLURE ,S. ; HEIN,W. & NICANDER, L. The intestinal habitat for organized lymphoid tissues in ruminants ; comparative aspects of struture, function and development. Vet. Immunol. Immunopathol., 28: 1-16 , 1991.
- LANDSVERK, T. . Is the Ileo - Caecal Peyer's patch in ruminants a mammalian " bursa - equivalent ? Act. Pathol. Microbiol Immunol . Scand. Sect. A 92: 77, 1984.

LEVIN , D. M. ; ROSENSTREICH ,D. L. & REYNOLDS, H .Immunological responses in the gastrointestinal tract of the guinea pig I. characterization of Peyer's patch cells. J. Immunol. , 111(3): 980-983, 1973.

LOPES, L. M., PEREIRA, M.A.C., GERKEN, S.E. and VAZ, N. Polyclonal Activation of B Lymphocytes during experimental infection with *Schistosoma mansoni*. Parasitology 100: 83 - 91, 1990.

MACDONALD ,T . T .Immunosuppression caused by antigen feeding. I - evidence for the activation of a feedback suppressor pathway in the spleen of antigen - Fed Mice. Eur. J. Immunol. , 12: 767, 1982

MACDONALD, T. T. Immunosuppression caused by antigen feeding.II. Suppressor T cell mask Peyer's patch B cell priming to orally administered antigen. Eur. J. Immunol. 13:138, 1983.

MATTINGLY, J. & WAKSMAN, B. H. Immunological suppression after oral administration of antigen I - Specific suppressor cells formed in rat Peyer's Patches after oral administration of sheep erythrocytes and their systemic migration J. Immunol. 121, 1878, 1978.

McGHEE, J. R.; MESTECKY, J.; ELSON, C. O. and KIYONO, H. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. J. Clin. Immunol. 9: 175, 1989.

MEDEIROS, B.M.M. de; MENDES - GIANNINI, M.J.S. & FALCÃO, D.P. Immunoglobulin isotypes produced by mice experimentally infected with *Yersinia* sp. *Contrib. Microbiol. Immunol.*, 12: 117-22, 1991.

MESTECKY, J. & MCGHEE J.R. Immunoglobulin A: Molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.*, 40: 153-243, 1987.

MINOPRIO, P.; EISEN, H.; FORNI, L.; D'IMPERIO LIMA, M. & COUTINHO, A. Polyclonal lymphocyte response to murine *T. cruzi* infection. - I. Quantitation of both T and B cell responses. *Scand. J. Immunol.*, 24: 661, 1986.

MINOPRIO, P.; EISEN, H.; JOSKOWICZ, M.; PEREIRA, P. & COUTINHO, A. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi* infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. *J. Immunol.*, 139: 545, 1987.

NEUTRA, M.R., T.L. PHILLIPS, E. L. MAYER, & D.J. FISHKIND. Transport of membrane - bound macromolecules by M cells in follicle - associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell Tissue Res.* 247:537 - 546, 1987.

NGAN, J. & KIND, L.S.. Suppressor T cells for IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *J. Immunol.* 120:861 - 865, 1978.



- BOUDIN, J. & MICHEL, M. Une nouvelle forme d'allotypic des globulin du serum du  
laine apparemment liée à la fonction et à la specificité anticorps. C.R.  
Acad. Sci. (Paris), 257: 805-812, 1963.
- DUCHTERLONY, O., Diffusion in gel - methods for immunological analysis.  
Progress in Allergy 5: 1 - , 1958.
- DWEN , R.L. & JONES, A,L . Epithelial cell specialization within human Peyer's  
patches: An ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles.  
Gastroenterology 66: 189- 203, 1974.
- HABST, R.; GEIST, M.; ROTHKOTTER, H. J. & FRITZ, F. J. Postnatal development  
and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and  
gnotobiotic pigs. Immunology, 64: 539-544, 1988.
- PEREIRA DA SILVA, L. H. & NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de Trypanosoma  
cruzi altamente virulenta para camundongo branco. Folia Clin. Biol. São  
Paulo, 20: 191-201, 1953.
- POLLARD, M. & SHARON, N.P. Responses of the Peyer's patches in germ - free  
mice to antigenic stimulation. Infect. Immun. 2: 96 - 100, 1970.
- REYNOLDS, J.D. & MORRIS, B. The evolution and involution of Peyer's patches  
in fetal and postnatal sheep. Eur. J. Immunol., 13: 627-635, 1983.
- REYNOLDS, J.D. & MORRIS, B. The effect of antigen on the development  
of Peyer's patches in sheep. Eur. J. Immunol., 14: 1-6, 1984.

- REYNOLDS, J.D.; PABST, R. & BORDMANN, G. Evidence for the existence of two distinct types of Peyer's patches in sheep. Adv. Exp. Med. Biol., 186: 101-109, 1985.
- REYNOLDS, J.D. Peyer's patches and the early development of B lymphocytes. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 135: 43, 1987.
- REYNOLDS, J.D. & KIRK, D. Two types of sheep Peyer's patches: location along the gut does not influence involution. Immunology, 66: 308, 1989.
- RICHMAN, L.K., GRAEFF A.S., YARCHON, R. & STROBER, W.. Simultaneous induction of antigen - specific IgA helper T cells and IgG suppressor T cells in the murine Peyer's patch after protein feeding. J. Immunol 126: 2079 - 1981.
- SANTANA, E.M.de. Trypanosoma cruzi: Resposta humoral no início da infecção em camundongos "inbred". Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo. 1990.
- SIVERSTEIN, A. M. History of immunology celular versus humoral imunity: determinants and consequences of an epic 19 th century battle. Cell Immunol, 48: 208-21, 1979.
- SILVERSTEIN, A. M. History of immunology - The dynamics of conceptual change in twentieth century immunology. Cell Immunol, 132: 515-31, 1991.

- SMINIA, T. & PLESH, B. E. C. An immunohistochemical study of cells with surface and cytoplasmic immunoglobulins in situ in Peyer's patches and lamina propria of rat small intestine. Virchows Arch. B, 40 : 181-9, 1982.
- SMITH, M.W., JAMES, P.S. & TIVEY, D.R. M cell numbers increase after transfer of SPF mice to a normal animal house environment. Am. J. Pathol., 128: 385 - 389, 1987.
- SOBHON, P. The light and the electron microscopic studies of Peyer's patches in the adult non germ free mice. J. Morphol. 135: 457-81, 1971.
- SOESATYO, M.; BIEWENGA, J.; JEURISSEN, S. & SMINIA, T. The effects of Peyer's patches inactivation in the rat on development of antibody-forming cells to intestinal antigen. Immunobiol., 181: 97-107, 1990.
- SPENCER, J. ; FINN, T. & ISAACSON, P.G. Human Peyer's patches : an immunohistochemical study. Gut, 27 : 405-10, 1986.
- SPIEGEL, M.R. ESTATÍSTICA. Coleção Schaum. Ed. McGraw - Hill do Brasil, LTDA. 1977.
- STROBER, W. & JAMES, S.T. The mucosal immune system. In: BASIC and CLINICAL IMMUNOLOGY, DANIEL P. STITS & ABBA I.(ORG)) TERR. Prentice - Hall International. pp. 175-185, 1991.
- TERNYNCK, T.C.; BLEUX, J; GREGOIRE, J. AVRAMEAS, S. & KANELLOPOULOS - LANGEVIN. Comparison between autoantibodies arising during Trypanosoma cruzi infection in mice and the activation of TCRI T cells. Immunol. Rev. 112:183, 1990.

- VAN DER HEIJDEN, P.J.; STOCK, W. & BIANCHI, T.J. Contribution of immunoglobulin - secreting cells in the murine small intestine to total "background" immunoglobulin production. Immunology 62:551 - 555, 1987.
- VAZ, N.M. & VARELA, F.J. Self and nonsense : an organism - centered approach to immunology . Medcal. Hypotheses 4 : 231-67, 1978.
- VAZ, N.M. Tolerância e insensibilidade em imunologia. Ciênc. Cult. 32(1) : 21-23, 1980.
- VAZ, N. M. Reconhecer a si próprio - idéias para uma nova imunologia . Ciênc. Cult. 2 (7): 32 - 38, 1983.
- VAZ, N.M. Ordem e desordem : uma abordagem imunológica . Ciênc. Cult. 40 : 452-59, 1988.
- VAZ, N.M. & FARIA , A.M.C. The construction of immunological identity. Ciênc. Cult. 42(7) : 429-443, 1990.