

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pela candidata Wirla
Cunha da Silva Cunha Tamashiro e aprovada
pelo Conselho Julgador. 25/11/88

OBTENÇÃO E ESTUDO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI *Trypanosoma cruzi*

Chagas, 1909

Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Orientador: Prof.Dr. Humberto de Araújo Rangel

Tese apresentada à Universidade Estadual
de Campinas, como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do título de
Doutor em Ciências, na área de Imunologia

Campinas

1988.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

OBTENÇÃO E ESTUDO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI *Trypanosoma cruzi*

Chagas, 1909

A Mariana

AGRADECIMENTOS

Ao professor Humberto de Araújo Rangel, pela orientação deste trabalho.

A coordenação do Curso de Pós-graduação em Imunologia e aos seus professores, pelo estímulo e apoio recebidos.

Ao Dr. José Daniel Lopes, um grande amigo, que me abriu as portas de seu laboratório onde parte deste trabalho foi executado.

Aos professores Judith Kardos Klotzel, José Daniel Lopes, Maria Julia M. Alves e Walter Coli da Universidade de São Paulo e Paulo Maria Ferreira de Araújo e Luiz Augusto Magalhães da Universidade Estadual de Campinas, pela análise prévia deste trabalho da qual resultaram valiosas sugestões.

Aos colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia e em especial aos amigos Edgard Zanolli, Maria Silvia Viccari Gatti e Tomomasa Yano, pelo companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia e em especial à Srta. Dirce Lima Gabriel e às Sras. Lucia Gabos e Alzira Caluzni Castro, pelo apoio técnico durante a execução deste trabalho.

MEUS AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no Departamento de Micobiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas e contou com o apoio financeiro das seguintes Instituições:

- UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

- FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

- CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO

- COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DE ENSINO SUPERIOR

A autora e o orientador externam seus agradecimentos à estas Instituições.

SUMÁRIO

	pág.
I- INTRODUÇÃO.....	1
II- MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
ANIMAIS.....	12
PARASITAS.....	12
SUSPENSÕES DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
ANTISSOROS.....	14
Soros de camundongos infectados com o <i>T.cruzi</i>	15
Soros de camundongos imunizados com F3.2.....	15
Soros anti-imunoglobulinas de camundongo.....	15
Soros monoespecíficos anti-imunoglobulinas de camundongo.....	16
PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-IMUNOGLOBULINAS DE CAMUNDONGO.....	16
Purificação de IgG de camundongo por cromato- grafia de afinidade em Sepharose-Proteína A.....	16
Preparo de Sepharose-IgG de camundongo.....	16
Cromatografia de afinidade de soros anti-IgG de camundongo.....	17
PREPARO DE CONJUGADOS.....	17
Conjugação de imunoglobulinas com peroxidase.....	17
Conjugação de imunoglobulinas com isotiocia- nato de fluoresceína.....	18
ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI- <i>T.cruzi</i>	18

Preparo de soluções e meios de cultura.....	18
Esquema de imunização de camundongos para fusão.....	20
Suspensões celulares.....	21
Fusão com polietilenoglicol.....	22
Clonagem por diluição limitante.....	23
Expansão dos hibridomas.....	24
Congelamento de células.....	25
Descongelamento de células.....	25
Caracterização de isótipos de imunoglobulinas dos anticorpos monoclonais.....	26
Purificação dos anticorpos monoclonais.....	26
REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	27
LISE MEDIADA POR COMPLEMENTO.....	27
TESTES DE PROTEÇÃO PASSIVA EM CAMUNDONGOS CBA.....	28
IODINAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DO <i>T.cruzi</i>	29
IMUNOPRECIPITAÇÃO.....	30
ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	31
"IMMUNOBLOTTING".....	32
III- RESULTADOS.....	34
NÍVEIS DE ANTICORPOS ANTI- <i>T.cruzi</i> EM CAMUNDONGOS INFECTADOS.....	34
CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DO <i>T.cruzi</i> RECONHECIDOS POR SOROS DE CAMUNDONGOS CRONICAMENTE INFECTADOS.....	38
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONO-	

CLONAS ANTI- <i>T. cruzi</i>	41
Isótipo e especificidade dos anticorpos monoclonais	43
Lise de tripomastigotas mediada pelo complemento	43
Transferência passiva de anticorpos monoclonais para camundongos CBA	46
CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS DO <i>T. cruzi</i> RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS MONOCLONAIS	48
IV- DISCUSSÃO	55
V- RESUMO E CONCLUSÕES	65
VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

I - INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pela infecção com o *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), transmitido em condições naturais por triatomídeos hematófagos da família *Reduviidae*. Tripomastigotas metacíclicos, estágio infectivo do parasita, são eliminados pelas fezes do vetor e infectam o homem e outros hospedeiros pela contaminação de mucosas intactas ou de lesões da pele. Outros mecanismos de transmissão da doença tem se tornado importantes, principalmente em áreas urbanas, tais como transfusões sanguíneas, transmissão congênita, infecções acidentais em laboratórios e transplantes de órgãos (Brener, 1987). Qualquer que seja a porta de entrada, os tripomastigotas penetram em vários tipos celulares, principalmente em células macrofágicas e musculares, se transformam em amastigotas, que se multiplicam intensamente. Após uma série de divisões celulares os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, formas flageladas, que rompem as células hospedeiras. Os tripomastigotas circulam no sangue por algum tempo e quando invadem outras células dão início a novo ciclo. Os fenômenos que se passam durante o estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi* envolvem mecanismos complexos de reconhecimento mútuo parasita-célula hospedeira mediados por receptores de superfície das membranas, principalmente glicoproteínas (Zingales & Colli, 1985; Snary, 1985).

Durante a infecção chagásica, os hospedeiros elaboram uma resposta imune capaz de, em maior ou menor extensão, controlar a multiplicação do parasita até um nível subpatente. Em camundongos, o estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi* depende de um conjunto de fatores relacionados com a virulência do parasita e com o "background" ge-

nético do animal. O papel desempenhado por tais fatores na infecção humana é ainda desconhecido.

No modelo experimental em murinos, tem sido amplamente verificada a ocorrência de raças resistentes e susceptíveis à infecção com cepas virulentas do **T.cruzi** (Trischmann et al., 1978; Corsini et al., 1980a; Tanowitz et al., 1981; Trischmann & Bloom, 1982; Lalonde et al., 1985). Experiências com camundongos híbridos de parentais susceptíveis e resistentes ao **T.cruzi** apontam para a existência de um gen(s) dominante que confere resistência à infecção por cepas virulentas do parasita (Trischmann & Bloom, 1982). Embora o locus (loci) gênico que controla a resistência ao parasita não tenha sido mapeado, existem evidências de que esse gen poderia influenciar as funções de células imunorreguladoras. Neste sentido, Lalonde e colaboradores (1985) mostraram que tanto camundongos susceptíveis (C3H) quanto resistentes (C57BL/10 e F1(C3H x C57BL/10)) à infecção com a cepa Brasil do **T.cruzi** apresentam no decurso da infecção chagásica uma supressão às lectinas ConA e PHA, mediada em cada raça por mecanismos regulatórios distintos. Nos camundongos resistentes, a supressão da atividade mitogênica seria controlada através da proliferação das células T supressoras e nos animais susceptíveis seria devida a um bloqueio celular intrínseco das células respondedoras.

Ainda com relação ao controle genético da resistência e susceptibilidade à infecção chagásica em murinos, um grupo de autores encontrou uma correlação positiva entre o desenvolvimento de autoimunidade e a susceptibilidade à infecção primária ao **T.cruzi** (Boyer et al., 1983; Nickell et al., 1985). O mesmo fenômeno foi encontrado também no caso de infecção por **Leishmania tropica** em camundongos (Boyer & Jaffe, 1984).

Corsini e Costa (1981a) mostraram que camundongos susceptíveis (CBA) à infecção pela cepa Y do *T. cruzi* apresentam uma intensa ativação policlonal de células B, no período pré-patente da infecção, seguida pela supressão da resposta imune humoral a antígenos não relacionadas ao parasita, na ocasião do pico de parasitemia. A inoculação de um extrato antigênico de tripomastigotas em animais normais mimetizou os efeitos obtidos pela infecção, sugerindo a liberação de substâncias mitogênicas pelo parasita (Corsini & Costa, 1981a,b). Em trabalho anterior Corsini e colaboradores (1980b) haviam verificado que a inoculação em camundongos de uma fração antigênica de natureza glicopeptídica denominada FAd, extraídas das formas epimastigotas, não infectivas (Tamashiro et al., 1983), também levava a uma imunossupressão a antígenos não relacionados. Neste caso porém, a supressão foi considerada pelos autores como decorrência de bloqueio da proliferação tanto de células T como de células B, pois no caso não se observou ativação policlonal.

Recentemente, Minoprio e colaboradores (1986a) observaram tanto em camundongos sensíveis quanto em camundongos resistentes ao *T. cruzi*, a ocorrência de intensa ativação policlonal de linfócitos T e B, na fase aguda da infecção chagásica. Durante a ativação policlonal, grande quantidade dos linfócitos Lyt 2+ gerados se diferencia em células efectoras com função citolítica (Minoprio et al., 1986b). Os autores discutem a possibilidade de que células Lyt 2+ com função supressora sejam também geradas durante a fase de ativação policlonal, o que explicaria a imunossupressão a antígenos não relacionados observada em camundongos após a infecção com *T. cruzi*.

Através de abordagens distintas, vários autores tem concluído que existe uma correlação estreita entre resistência à fase aguda da

infecção primária pelo *T. cruzi* e a capacidade de montar adequadamente uma resposta imune mediada por células, em camundongos (Schmuffis et al., 1971; Roberson & Hanson, 1974; Trischmann et al., 1978; Burgess & Hanson, 1980). Neste sentido, Corsini e Stellini (1981c) verificaram que camundongos resistentes à cepa Y do *T. cruzi* (F1 (CBA x C57B1/10)) podiam ser tornados susceptíveis à infecção pelo parasita através de tratamentos que exaurissem sua população de células T, tais como: irradiação + timectomia neonatal e reconstituição com células hepáticas fetais (células B). Os animais tratados desta forma só retornaram a sua condição de resistentes à infecção após transferência adotiva de células T de animais isogênicos imunes ao parasita. O tratamento dos animais depletados de células T com soro de camundongos cronicamente infectados não restaurou integralmente sua resistência ao desafio com o parasita.

Os camundongos resistentes à cepas virulentas do *T. cruzi* atingem a fase crônica da infecção tendo desenvolvido uma resposta imune que resulta na extinção quase total do parasitismo e na resistência a uma nova infecção aguda pelo parasita. Os anticorpos produzidos na fase crônica da infecção chagásica parecem desempenhar um papel importante na resistência à reinfeção pelo *T. cruzi*, a julgar pelos resultados obtidos em experimentos de transferência passiva de soros imunes desta fase para camundongos susceptíveis (Brener, 1980). Os animais recipientes destes soros apresentam níveis parasitêmicos mais baixos e aumento de sobrevivência quando desafiados com inóculos elevados do parasita (Kierszenbaum & Howard, 1976; Kretzli & Brener, 1976; Hanson, 1977; Kretzli et al., 1979; Gavino, 1985). Imunoglobulinas das classes IgG2a e IgG2b, presentes nos soros imunes de camundongos cronicamente infectados tem sido identificadas como os componentes séri-

cos responsáveis pela atividade protetora destes soros (Takehara et al., 1981; Scott & Gross-Sampson, 1984).

Alguns mecanismos foram propostos para explicar a ação protetora dos anticorpos produzidos durante a fase crônica da infecção pelo *T.cruzi*. Kretzli e colaboradores (1979, 1982) mostraram que anticorpos produzidos durante a fase crônica da infecção chagásica em humanos e em camundongos são capazes de se ligar a estruturas antigênicas da superfície de tripomastigotas e promover a lise do parasita, mediada por complemento. Foram encontradas evidências indiretas, através de experimentos de imunoprecipitação, de que a proteína de 160 KDa seria um dos antígenos indutores dos anticorpos com atividade lítica presentes nos soros humanos e de camundongos em fase crônica (Martins et al., 1985). A correlação entre anticorpos líticos e resistência à infecção tem sido utilizada na monitoração de proteção em experimentos de vacinação (Yoshida, 1986); em estudos epidemiológicos utilizando soros de pacientes provenientes de várias regiões geográficas do Brasil, frente a diferentes estoques do parasita (Kretzli, 1987); na seleção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais contra *T.cruzi* (Martins et al., 1987).

Outro grupo de autores (Umekita et al., 1988) mostraram que a transferência passiva de soros imunes de camundongos cronicamente infectados para animais normais, desafiados com o *T.cruzi* induz um rápido "clearance" do parasita. Camundongos deficientes no componente C5 do complemento foram tão eficientes quanto animais normais com respeito à eliminação de tripomastigotas. Fragmentos F(ab')₂ de IgG imune foram capazes de induzir a lise do parasita mas não o "clearance". Estes resultados sugerem que o "clearance" imune deve ocorrer em consequência da fagocitose dos parasitas opsonizados, através de recepto-

res de Fc em macrófagos, podendo constituir importante mecanismo de eliminação do parasita na fase crônica da infecção.

Foi demonstrado recentemente que formas tripomastigotas sanguíneas (Pereira, 1983a), de cultura de células (Zanolli et al., 1985) e metacíclicas obtidas em meio axênico (Hart et al., 1987) apresentam atividade de neuraminidase, uma glicoproteína que remove resíduos terminais de ácido siálico de macromoléculas livres ou de componentes da superfície de células. Tem sido sugerido que a neuraminidase do **T.cruzi**, a exemplo do que acontece com outros microorganismos que possuem este tipo de enzima, estaria envolvida com a capacidade invasiva do parasita e também com os distúrbios hematológicos que foram relatados durante a infecção com **T.cruzi** (Cardoso & Brener, 1980). Pereira (1983b) foi o primeiro a demonstrar a ocorrência de desialização em eritrócitos de camundongos infectados com a cepa Y do **T.cruzi**, relacionados ao grau de parasitismo. Uma vez que a desialização de eritrócitos favorece a sua retirada de circulação e sequestro pelas células fagocíticas do fígado, o autor sugere que este poderia ser o fator responsável pela anemia detectada nos animais infectados. Mais recentemente Libby e colaboradores (1986) mostraram a liberação "in vitro" de ácido siálico de células miocárdicas de rato e de células endoteliais humanas tratadas com tripomastigotas íntegros ou com extrato contendo neuraminidase do **T.cruzi**. Os autores sugerem que as alterações bioquímicas da superfície celular, induzidas pela neuraminidase do parasita, podem ser eventos importantes para que se estabeleça um contato inicial entre **T.cruzi** e célula hospedeira. Estudo sobre a atividade de neuraminidase em diferentes cepas de **T.cruzi** mostraram uma distribuição heterogênea da enzima; maior atividade enzimática foi detectada naquelas com tropismo para fibras musculares esqueléticas (Pereira & Hoff, 1986).

Zanolli e colaboradores (1985) mostraram que soros de fase crônica de camundongos F1 (CBA x C57Bl/10) infectados com a cepa Y do **T.cruzi** bloqueiam especificamente a atividade de neuraminidase do parasita sobre eritrócitos humanos. Estes soros não foram capazes de inibir a desialização de eritrócitos tratados com a neuraminidase de **Clostridium perfringes**. Tito e Araújo (1987) observaram atividade antisialidase de **Vibrio cholerae** em soros de camundongos agudamente infectados (7 a 10 dias pós-infecção) com **T.cruzi** das cepas Y e Tula-huen. Soros de fase crônica não foram examinados no referido artigo. Em trabalho subsequente, Zanolli (1986) mostrou que a fração IgG dos soros de fase crônica de camundongos infectados, purificada por cromatografia de afinidade em Sepharose-Proteína A, foi a responsável pelo bloqueio específico da atividade enzimática.

O isolamento e caracterização da neuraminidase do **T.cruzi** foram recentemente obtidos por Hart e colaboradores (1987). Estes autores demonstraram que a atividade de neuraminidase no extrato de tripomastigotas após fracionamento por SDS-PAGE, coincidia com o componente de 60 KDa, que interagia por "immunoblotting" com soros de pacientes chagásicos crônicos. Este componente foi purificado através de procedimentos cromatográficos na forma de uma preparação homogênea onde o único componente detectado apresentava Mr de 60 KDa e retinha a atividade enzimática original. Estes resultados no entanto, foram diferentes dos obtidos por Cavallesco e Pereira (1988). Estes autores detectaram a atividade de neuraminidase em proteínas da superfície do **T.cruzi** com Mr de 160 a 200 KDa.

Zingales e colaboradores (1982) apresentaram evidências de que proteínas específicas do estágio tripomastigota (proteínas de 85 KDa e as de pesos moleculares superiores a 95 KDa), imunoprecipitadas

por soros chagásicos crônicos, podiam estar envolvidas nos fenômenos de interiorização do parasita em células hospedeiras. Neste trabalho ainda, os autores verificaram que os soros chagásicos crônicos inibiam consideravelmente a interiorização do parasita "in vitro". Em trabalho posterior, Andrews e colaboradores (1984) verificaram que o tratamento com tripsina removia glicoproteínas da superfície de tripomastigotas e inibiam em cerca de 90% a capacidade do parasita de invadir as células hospedeiras. As proteínas removidas pelo tratamento com tripsina foram principalmente as de 85 KDa, pI 6.3-7.5, denominada pelos autores de Tc 85, e as proteínas de 110 e 120 KDa. Em trabalho posterior (Alves et al., 1986), foi obtido anticorpo monoclonal dirigido à proteína Tc 85 que inibiu parcialmente (cerca de 50%) a penetração do parasita "in vitro", reforçando os achados iniciais.

Ouaisi e colaboradores (1986a) trabalhando sobre interações de membranas entre *T. cruzi* e célula hospedeira, encontraram que tripomastigotas do parasita possuem na sua superfície um receptor para fibronectina, uma glicoproteína de alto peso molecular presente na superfície de vários tipos celulares, à qual atribui-se o papel de mediador nas interações entre células. Em trabalho subsequente, o mesmo grupo verificou que uma proteína de tripomastigotas de 85 KDa era o receptor para fibronectina e que um anticorpo monoclonal específico para o sítio de ligação da fibronectina ao seu receptor inibiu a penetração do parasita em células hospedeiras (Ouaisi et al., 1986b).

Estudos imunológicos com o objetivo de caracterizar antígenos de *T. cruzi* vem sendo realizados também em nosso laboratório. Formas epimastigotas foram utilizadas para isolamento e caracterização de antígenos do parasita devido à facilidade de sua obtenção em cultura e também por exibirem antígenos comuns às formas infectantes e intracelulares do parasita.

A partir da fração solúvel de lisados de epimastigotas foi purificada uma enzima proteolítica, SH-dependente, com atividade sobre caseína e hemoglobina (Rangel et al., 1981a). Esta enzima foi posteriormente detectada na superfície das formas epi, tripo e amastigotas de diferentes cepas do parasita, através de reações de IFI e Imunoperoxidase (Rangel et al., 1981b). Anticorpos dirigidos à protease do **T. cruzi** foram detectados em soros de pacientes chagásicos crônicos (Atta et al., 1987) e em soros de camundongos cronicamente infectados com o parasita (Atta et al., 1988). Soros de indivíduos portadores de leishmaniose não interagiram com determinantes antigênicos contidos nesta protease, o que a torna especialmente adequada para uso como antígeno no diagnóstico sorológico da infecção chagásica (Atta et al., submetido a publicação).

Do sedimento insolúvel dos lisados de epimastigotas foi extraída, pelo tratamento com álcali, uma fração denominada FA contendo estruturas de superfície comuns as três formas do ciclo evolutivo do parasita (Repka et al., 1980). A fração FA é quimicamente constituída por proteínas e polissacarídeos, agregados em um complexo macromolecular incapaz de penetrar na matriz do gel de SDS-poliacrilamida a 10%. Sob a ação da protease do parasita foi extraída da fração FA (Repka et al., 1980), ou diretamente do sedimento insolúvel dos lisados do **T. cruzi** (Tamashiro et al., 1983), uma segunda fração contendo componentes antigênicos da superfície do parasita, de baixo peso molecular, denominada de FAd. Conforme mencionado acima, a fração FAd apresentou efeito imunossupressor em camundongos, para antígenos não relacionados ao parasita (Corsini et al., 1980b).

Paralelamente ao estudo de antígenos isolados do parasita investiga-se em nosso laboratório a resposta imune de camundongos sensí-

veis (CBA) e resistentes (C57B1/10 e F(CBA x C57B1/10)) ao *T.cruzi*, durante o curso da infecção com a cepa Y do parasita. Os resultados obtidos mostraram que, durante a fase aguda da infecção chagásica experimental, os camundongos apresentaram intensa ativação policlonal de linfócitos B seguida de imunossupressão da resposta a antígenos não relacionados ao parasita (Corsini et al., 1981a,b). Foi observado também que a sobrevivência de camundongos F1 à fase aguda da infecção chagásica estava na dependência da integridade do compartimento T do sistema imune, sugerindo que a condição de resistência à infecção deve estar associada à capacidade de acionar mecanismos de natureza celular na fase inicial da infecção (Corsini & Stellini, 1981c; Stellini, 1986). Anticorpos anti-tripanosoma são produzidos durante a fase aguda em camundongos resistentes e sensíveis à infecção pelo *T.cruzi* mas, não parecem exercer função importante (Gavino, 1985). Por outro lado, soros colhidos de camundongos F1 ou de C57B1/10, a partir da quinta semana após a infecção contém anticorpos protetores conforme medido em testes de transferência passiva para camundongos CBA (Repka et al., 1982; Gavino, 1985; Britto, 1988).

A caracterização de antígenos de tripomastigotas indutores de anticorpos durante as fases aguda e crônica da infecção chagásica nas linhagens de camundongos estudadas em nosso laboratório está em fase preliminar. Alguns resultados neste sentido mostram que os soros obtidos de camundongos sensíveis e resistentes, a partir da segunda semana após a infecção, são capazes de imunoprecipitar indistintamente os mesmos componentes da superfície de tripomastigotas, marcados com iodo radioativo (Britto, 1988). Essas análises foram realizadas com soros coletados até a sexta semana após a infecção. Observações sobre a reatividade de soros obtidos nas fases mais tardias da infecção estão em andamento.

De qualquer forma, as tentativas de caracterização imunológica de moléculas baseadas em soros policlonais geralmente apresentam dificuldades, devido a natureza heterogênea destes reagentes. Anticorpos monoclonais dirigidos contra parasitas tem sido largamente utilizados com essa finalidade (Potocnjak et al., 1980; Yoshida et al., 1980; Perrin et al., 1980; Sethi & Brandis, 1981; Perrin et al., 1981; Jaffee et al., 1984). Vários autores obtiveram anticorpos monoclonais anti-**T.cruzi**, derivados de animais submetidos a diferentes esquemas de imunização, utilizando-os na investigação de diversos aspectos relacionados ao parasita, principalmente no que diz respeito a caracterização de antígenos espécie-específicos ou estágio-específicos, alguns desses de interesse para o diagnóstico sorológico da infecção ou ainda para estudos relacionados à identificação de antígenos envolvidos com imunoproteção (Snary et al., 1981; Araújo et al., 1982; Flint et al., 1984; Choa & Dusanic, 1985; Beard et al., 1985; Alves et al., 1986; Teixeira & Yoshida, 1986; Wrightsman et al., 1986; Tachibana et al., 1986a,b; Mortara et al., 1988). Entretanto, estudos baseados na obtenção de anticorpos monoclonais anti- **T.cruzi**, derivados de animais na fase crônica da infecção chagásica, ocasião em que anticorpos parecem ser os componentes da resposta imune ao parasita de maior relevância, não haviam sido realizados até a época em que o presente trabalho foi proposto.

Em vista destas considerações, propusemo-nos no presente trabalho a dar início a um estudo sistemático sobre as especificidades dos anticorpos anti-**T.cruzi** produzidos durante a fase crônica da infecção chagásica experimental, utilizando para esta finalidade a tecnologia de hibridomas (Kohler & Milstein, 1975).

II-MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Camundongos com três meses de idade, machos e fêmeas, das linhagens Balb/c, CBA e o híbrido F1 (CBA x C57Bl/10), utilizados neste trabalho foram cedidos pelo Biotério Central da UNICAMP e mantidos em nosso laboratório. Coelhos albinos, pesando cerca de 2 Kg e carneiro adulto foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

PARASITAS

A amostra Y do *T. cruzi* (Silva & Nussenzweig, 1953) foi mantida em nosso laboratório por cultivo em: (i) meio de LIT (liver-infusion-tryptose), de acordo com indicações de Fernandes e Castellani (1966); (ii) por passagem seriada, a cada sete dias, em camundongos CBA inoculados com 10^5 formas tripomastigotas sanguíneas do parasita, por via intraperitoneal (ip); (iii) em cultura de células.

Para a obtenção dos parasitas em culturas de células, células HeLa e/ou VERO obtidas na Seção de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo), foram mantidas em nosso laboratório em meio RPMI-1640 (Flow Laboratories, Inglaterra) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Microbiológicas, Rio de Janeiro), a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As células foram repicadas a cada 4 dias, após tratamento com tripsina/EDTA (ATV) (Instituto Adolfo Lutz, São

Paulo). Para infecção foram utilizados monocamadas de células que haviam sofrido repique 24 horas antes e parasitas obtidos de sangue de camundongos infectados, colhido assepticamente. Após 72 horas de cultivo a 37° C, o meio de cultura foi substituído por meio fresco, contendo 3% de SFB. Cerca de 7 dias após a infecção, as formas tripo e amastigotas podiam ser encontradas no sobrenadante das culturas. Os parasitas foram propagados em cultura de célula através de repiques semanais e utilizados nos experimentos após, pelo menos, três transferências consecutivas em cultura.

SUSPENSÕES DE *Trypanosoma cruzi*

Suspensões de epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, mantidas em meio de LIT, foram preparadas a partir de culturas em fase exponencial de crescimento (5 a 7 dias de cultivo a 28°C). Os parasitas foram separados por centrifugação a 1000 g por 15 min e lavados três vezes em solução salina 0,15 M, tamponada com fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,2 (SST, pH 7,2) antes do uso.

Suspensões de tripomastigotas sanguícolas foram preparadas a partir de sangue de camundongos CBA infectados com o *T. cruzi*. Estes animais haviam sido imunossuprimidos, 24 horas antes da infecção, pela administração por via ip de ciclofosfamida (Enduxan-Pravaz-São Paulo) (200 mg/Kg de peso corpóreo). As formas sanguícolas foram purificadas do sangue, colhido com heparina sódica (Liquemine-Roche-São Paulo), de camundongos no pico de parasitemia. Os parasitas foram separados pela passagem do sangue infectado em gradiente de diatrizoato de sódio (Hypaque-Winthrop-São Paulo) diluído a 10% em solução de Hanks pH 7,2 e

centrifugação a 200 g por 25 min. Nestas condições, os elementos figurados do sangue se depositaram no sedimento e os parasitas se distribuíram nas duas fases (plasma e Hypaque diluído). Os parasitas foram colhidos e lavados duas vezes em solução de Hanks pH7,2, ocasionalmente contendo 5% de SFB.

Tripomastigotas e amastigotas derivados de cultura de células foram sedimentados por centrifugação dos sobrenadantes de células VERO ou de células HeLa infectadas, a 1000 g por 20 min. A seguir, suspensões enriquecidas (90%) em uma das formas do parasita foram preparadas ressuspendendo-se o sedimento em pequeno volume de meio de cultura e passando-o através de gradiente de Ficoll-Hypaque (d=1,076) a 1200 g por 25 min. Na interface meio/Ficoll-Hypaque foram encontradas principalmente as formas tripomastigotas e na fração correspondente ao gradiente, as formas amastigotas. As duas frações foram colhidas separadamente, lavadas três vezes em solução de Hanks contendo 5% de SFB, a 1000 g, por 15 min e utilizadas nos experimentos quando em grau de pureza igual ou superior a 90%.

ANTISSIONOS

Soros de camundongos infectados com o *T. cruzi*

Antissionos contra o *T. cruzi* foram obtidos em camundongos F1 (CBA x C57Bl/10) machos e fêmeas, infectados com 10^2 formas sanguíneas do parasita por via ip. Semanalmente, um grupo de animais foi sacrificado para obtenção do soro imune. Na sexta semana pós-infecção a metade dos animais restantes recebeu uma dose-reforço constituída por

10^3 tripomastigotas sanguícolas mortas com formaldeído a 2%, por via endovenosa (ey). Em intervalos semanais, durante cinco semanas consecutivas, grupos de camundongos que receberam ou não a dose-reforço foram sacrificados para obtenção de soros imunes da sétima até a décima segunda semanas pós-infecção, respectivamente. Soro normal de camundongo foi obtido de animais F1 não infectados com o **T.cruzi**. Estes soros foram mantidos congelados a -20° C até o uso, quando então foram inativados a 56° C por 30 min.

Soros de camundongos imunizados com F3.2

Soro contra a proteinase F3.2 do **T.cruzi** (Rangel et al., 1981a), obtido pela imunização de camundongos C57Bl/10, foi preparado no Laboratório de Imunoquímica do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Soros anti-imunoglobulinas de camundongo

Soros de carneiro e coelho anti-imunoglobulinas (Ig) totais de camundongo foram preparados no Laboratório de Imunoquímica do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP. Os títulos de anticorpos anti-Ig de camundongo destes soros, determinados por dupla difusão em meio gelificado (Duchterlony, 1958) contra $100\mu\text{g}$ por ml de IgG, foram de 1:64 para o soro de coelho e 1:32 para o soro de carneiro.

Soros monoespecíficos anti-imunoglobulinas de camundongo

Soros monoespecíficos de coelhos anti-Ig de camundongo foram obtidos no Laboratório de Imunoquímica do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP. A especificidade destes soros foi determinada através de reações de imunodifusão dupla frente a diferentes Ig purificadas e utilizando soros da Litton Bionetics (Kensington, Md., USA) como padrões (Britto, 1988).

PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-IMUNOGLOBULINAS DE CAMUNDONGO

Purificação de IgG de camundongo por cromatografia de afinidade em Sepharose-Proteína A.

A fração IgG do soro normal de camundongos F1 foi purificada através de cromatografia de afinidade em Sepharose-Proteína A (Seph-Prot.A), segundo indicações de Ey e colaboradores (1978). A solução de IgG obtida foi dialisada contra SST pH 7,2, durante 24 horas a 4° C, com várias trocas do líquido de diálise. Uma amostra da solução dialisada foi separada para dosagem de proteína e o restante foi liofilizado.

Preparo de Sepharose-IgG de camundongo.

Sepharose-2B (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) foi ativada com brometo de cianogenio e acoplada a IgG de camundongo através de técnica descrita por March e colaboradores (1974).

Cromatografia de afinidade de soros anti-IgG de camundongo.

Cerca de 10 ml de soro de carneiro ou de coelho anti-IgG de camundongo foram cromatografados, de cada vez, em coluna de Sepharose-IgG de camundongo equilibrada com SST, pH 7,2. O soro foi deixado em contato com o imunoabsorvente por 1 hora em temperatura ambiente, com agitação ocasional e a seguir eluído lentamente em geladeira, a 4°C. Após a lavagem do imunoabsorvente com SST, pH 7,2, os anticorpos fixados foram eluídos com solução 0,2 M de glicina-HCl, pH 2,8. Foram recolhidos 2,0 ml de eluato por tubo contendo 0,2 ml de solução 1,0 M de Tris-HCl, pH 8,5, para neutralização. O conteúdo dos tubos com DO 280nm superior a 0,1 foram reunidos e postos para dialisar contra SST, pH 7,2, durante 24 horas, a 4°C, sob agitação, com várias trocas do líquido de diálise. Após a diálise, uma amostra da solução foi retirada para dosagem de proteína e titulação do nível de anticorpos por imunodifusão contra 100 µg de IgG de camundongo. A solução de anticorpo foi distribuída em alíquotas de 5,0 ml, liofilizada e posteriormente estocada a -20°C até o uso.

PREPARO DE CONJUGADOS

Conjugação de imunoglobulinas com peroxidase.

A fração anticorpo do soro de carneiro anti-Ig de camundongo, purificada por cromatografia de afinidade em Sepharose IgG de camundongo, foi conjugada com peroxidase (Horseradish peroxidase tipo II - Sigma) de acordo com técnica descrita por Nakane e Kawaoi (1974). O

conjugado obtido foi dialisado contra SST, pH 7,2, durante 24 horas a 4°C, com várias trocas do líquido de diálise. Ao conjugado dialisado foram adicionados soro albumina bovina (BSA-Sigma) na concentração final de 1% e glicerina tamponada, pH 7,2, (volume/volume). O conjugado foi distribuído em alíquotas e armazenado a -20°C até o uso.

Conjugação de imunoglobulinas com isotiocianato de fluoresceína

A fração anticorpo do soro de coelho anti-Ig de camundongo, purificada por cromatografia de afinidade em Sepharose-IgG de camundongo, foi conjugada com isotiocianato de fluoresceína (ITCF) (Isômero I - Sigma) de acordo com técnica descrita por Clark e Shepard (1963). O conjugado obtido apresentou uma relação fluoresceína/proteína (F/P) igual a 1,3 de acordo com cálculos efetuados pela fórmula :

$$F/P = 2,06 \times \frac{\text{g/ml ITCF}}{\text{mg/ml proteína}}$$

$$\text{onde } \text{g/ml ITCF} = \frac{E_{492} - 1/2 E_{320}}{E_{492} \text{ nm}} \quad e$$

mg/ml de proteína foi determinada por dosagem de proteína, pelo método de Lowry, modificado por Hatree (1972).

ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-*T. cruzi*

Preparo de soluções e meios de cultura.

Solução de aminopterín 100x concentrada (A 100x). Esta solução

foi preparada dissolvendo-se 1,76 mg de aminopterin (ácido 4-aminofólico, ácido 4-aminopteróilglutâmico - PM 440 - Sigma) em 90 ml de água bidestilada e 0,5 ml de hidróxido de sódio 1,0 N. Após neutralização com solução de HCl 1,0 N, o volume foi ajustado para 100 ml com água bidestilada. A seguir, a solução foi esterilizada por filtração (membrana de 0,22 μ m - Millipore), distribuída em alíquotas de 1,0 ml e estocada, protegida da luz, a -20°C .

Solução de hipoxantina-timidina 100x concentrada (HT 100x). Esta solução foi preparada dissolvendo-se 38 mg de timidina (PM 242.2 - Sigma) e 140 mg de hipoxantina (PM 136,1 - Sigma) em 100 ml de água bidestilada a 80°C . A solução foi esterilizada por filtração, distribuída em alíquota de 1,0 ml e estocada a -20°C .

Solução tampão GKN. Solução tampão contendo glicose (G), potássio (K) e sódio (N) foi preparada segundo indicação de Kohler (1980) e consistiu de 8,0 g de cloreto de sódio, 0,4 g de cloreto de potássio, 1,77 g de fosfato bibásico de sódio, 0,69 g de fosfato monobásico de sódio, 2,0 g de glicose e 0,01 g de vermelho de fenol em 1000 ml de água bidestilada. O pH da solução foi ajustado para 7,2 e a mistura foi autoclavada a 120°C , 1,0 atm., por 20 min. A solução foi mantida a 4°C até o uso.

Solução de polietilenoglicol (PEG) a 50%. Para o preparo desta solução, 1,0 g de PEG 4000 (Sigma) foi fundida em autoclave (120°C , 1 atm., 20 min). A solução foi resfriada até 60°C para a adição de 1,0 ml de tampão GKN contendo 2% de dimetilsulfoxido (DMSO - Sigma). A solução de PEG a 50% foi distribuída em alíquotas de 1,0 ml, estocada

em temperatura ambiente é utilizada no máximo até 7 dias após seu preparo.

Meios de cultura simples e completo. O meio de cultura simples foi preparado com os seguintes constituintes: 10,4 g de meio RPMI-1640, com L-glutamina (Flow Laboratories), 40 mg de gamicina, 250 μ l de solução 0,1 M de 2-mercaptoetanol (Sigma), 2 g de bicarbonato de sódio, 3 g de HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-ácido etanosulfônico - Sigma) e 1000 ml de água bidestilada. Após a completa dissolução dos constituintes, o meio de cultura foi esterilizado por filtração, distribuído em alíquotas de 100 ml e mantido a 4°C. O preparo do meio completo foi feito pela adição de 10 a 20% de SFB ao meio simples, na ocasião do uso.

Meio HAT (hipoxantina-aminopterin-timidina). Este meio foi preparado pela adição de 1,0 ml de HT 100x e de 1,0 ml de A 100x a 100 ml de meio de cultura completo contendo 15 a 20% de SFB.

Meio para congelamento 2x concentrado. O meio para congelamento de células foi preparado pela adição de 30% de glicerina estéril ao meio completo contendo 20% de SFB.

Esquema de imunização de camundongos para fusão.

Camundongos F1 (CBA x C57Bl/10) foram infectados com 10^2 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y do *T. cruzi*, por via *ip.* Na sexta semana após a infecção a metade dos animais recebeu uma dose-reforço constituída por 10^3 tripomastigotas sanguícolas, mortas pelo

formol a 2%, por via *ip.* Quatro dias após o "booster" os níveis de anticorpos anti-*T.cruzi* dos animais imunizados foram examinados por imunofluorescência indireta (IFI). Dois animais de cada grupo, que apresentaram os maiores títulos de anticorpos anti-*T.cruzi* (1:80) foram escolhidos como doadores de células para fusão.

Suspensões celulares.

Macrófagos peritoneais de camundongos ("feeder layer"). Células normais da cavidade peritoneal de camundongos albinos ou Balb/c foram obtidas assepticamente e em condições apropriadas para evitar a aderência, cerca de 48 horas antes dos procedimentos de fusão, clonagem ou cultivo de células híbridas. Os macrófagos foram coletados do peritônio de camundongos, após injeção de 3.0 ml de meio completo contendo 10% de SFB, que foram aspirados após massagem no abdômen do animal. As suspensões foram deixadas em banho de gelo e uma alíquota foi retirada para contagem em câmara de Neubauer. As células foram diluídas em meio completo para um número apropriado e distribuídas em placas de culturas de células de 96 orifícios (2×10^3 células por orifício) ou de 24 orifícios (5×10^4 células por orifício), em frascos de cultura com capacidade para 80 ml (5×10^5 células) e em frascos de cultura com capacidade para 250 ml (2×10^6 células). O material de plástico estéril e descartável utilizados procediam da Costar (Cambridge - Mass. USA).

Células esplênicas de camundongos imunizados. Camundongos imunizados com *T.cruzi* foram sacrificados por asfixia com éter, seus baços foram retirados com assepsia e transferidos para uma placa de

petri contendo tampão GKN. As células foram separadas das cápsulas e a suspensão obtida foi filtrada através de uma malha de náilon. As células foram sedimentadas por centrifugação a 200g por 10 min, em temperatura ambiente. Uma alíquota da suspensão foi diluída em solução de cloreto de amônia a 4% em SST, pH 7,2 e contada em câmara de Neubauer, por microscopia de contraste de fase. Foram sempre utilizadas para fusão, suspensões celulares com viabilidade superior a 90%.

Células de mieloma de camundongo. Células SP2-Ag14/0 (Schulman et al., 1978) foram cedidas pelo Dr. José Daniel Lopes (Faculdade de Medicina - USP - São Paulo) e cultivadas em nosso Laboratório, em meio completo contendo 10% de SFB. Para fusão celular foram utilizadas células em fase exponencial de crescimento, que haviam sofrido um repique 18 a 24 horas antes da fusão. As células foram coletadas dos frascos de cultura, transferidas para tubos estéreis, centrifugadas a 200 g por min e ressuspensas em tampão GKN. Uma alíquota foi retirada para contagem em câmara de Neubauer, por microscopia de contraste de fase. Foram utilizadas para fusão suspensões celulares com viabilidade superior a 90%.

Fusão com polietilenoglicol

Nos experimentos de fusão celular descritos a seguir foi utilizado o protocolo indicado por FASEKAS De St. Groth e Scheideger (1980). Brevemente, 2×10^7 células de mieloma e 3 a 7×10^7 células esplênicas de camundongos imunes foram misturadas em tubo cônico de plástico com capacidade para 50 ml. A seguir as células foram lavadas em tampão GKN, por centrifugação a 200 g por 10 min, em temperatura

ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Um volume de 1,0 ml da solução de PEG 50% foi adicionado, gota à gota, ao sedimento, com agitação, por um período de 60 seg, em temperatura ambiente. A mistura foi então colocada em banho-maria a 37°C por 90 seg, sob agitação. A seguir, 20 ml de meio simples foi lentamente adicionado à mistura durante um período de 5 min para diluir o PEG. O volume foi completado para 40 ml com meio simples e após 10 min de repouso, as células foram centrifugadas a 200 g por 10 min, em temperatura ambiente. As células foram lavadas em meio completo contendo 10% de SFB, ressuspensas em meio HAT contendo 15% de SFB e a seguir distribuídas em placa de 24 orifícios (10^6 células por orifício) e em placas de 96 orifícios (10^5 células por orifício). As placas de cultura para crescimento das células híbridas foram incubadas em estufa umidificada a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar. No dia seguinte após a fusão, e depois duas vezes por semana, removia-se metade do volume contido em cada orifício de cultura, e substitua-se por meio HAT fresco. Cerca de 10 a 12 dias após a fusão, os orifícios já apresentavam híbridos com crescimento suficiente para serem testados quanto à presença de anticorpos específicos contra *T.cruzi*, através de reações de IFI.

Clonagem por diluição limitante.

Após a identificação das culturas secretoras de anticorpos específicos contra o *T.cruzi*, amostras destas células foram retiradas para contagem e a seguir diluídas em meio HT (meio completo contendo 10% de SFB mais hipoxantina e timidina) de modo a se obter suspensões contendo 100 e 50 células de cada cultura. Alíquotas de cada uma destas suspensões foram então distribuídas nos orifícios de uma placa de

96 orifícios de modo a se ter 48 orifícios com cerca de 2 células por orifício e 48 orifícios com cerca de 1 célula por orifício. As placas de clonagem foram incubadas em estufa umidificada a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar. De cada placa de clonagem foram selecionados, após crescimento, de 1 a 4 clones de células com base na capacidade secretora de anticorpos anti-**T. cruzi**, medidos por IFI e na viabilidade celular. Quando se fez necessário, as células foram reclonadas, seguindo o mesmo procedimento descrito, a partir de células do orifício original da cultura ou de células congeladas.

Expansão dos hibridomas.

Clones celulares secretando anticorpos específicos anti-**T. cruzi** foram expandidos em cultura ou pela inoculação em camundongos Balb/c, para produção de líquido ascítico.

Quando expandidos em cultura, os clones foram sucessivamente transferidos do orifício da placa de 96 para placas de 24 orifícios, frascos de cultura de células e garrafas de Roux, todos contendo "feeder layer" de macrófagos. O meio de cultura utilizado nos subcultivos continha quantidades decrescentes de SFB, até 5% na última etapa de crescimento. Antes de cada transferência, os sobrenadantes das culturas foram testados por IFI quanto a presença de anticorpos específicos para o **T. cruzi**.

Para a obtenção dos anticorpos monoclonais a partir de líquido ascítico, cerca de $0,5$ a $1,0 \times 10^6$ células de cada clone, em meio completo, foram inoculadas por via *ip* em camundongos Balb/c que haviam recebido previamente (cerca de 7 dias antes) 0,5 ml de Nujol, pela mesma via. Ao redor do 10º dia após a inoculação das células, os ani-

mais foram sacrificados para a obtenção do líquido ascítico. O líquido colhido foi centrifugado inicialmente a 200 g por 10 min, a 4°C. O sobrenadante obtido foi novamente centrifugado a 4800 g por 20 min, a 4°C e armazenado a -20°C até o uso.

Congelamento de células.

As células secretoras de anticorpos monoclonais anti-*T. cruzi* ou as células de mieloma foram coletadas dos frascos de cultura e sedimentadas por centrifugação a 200 g por 10 min, em temperatura ambiente. Em seguida, foram ressuspensas em meio completo e ajustadas, após contagem em câmara de Neubauer, para a concentração de 2×10^6 células por ml. A suspensão de células foi diluída, volume a volume, com meio de congelamento, lentamente, sob agitação e transferida para tubos de plástico para criopreservação (Sterelin - Inglaterra), em alíquotas de 1,0 ml. As células foram mantidas por 24 horas em congelador a -70°C e em seguida, os tubos foram transferidos para bujões de criopreservação, contendo nitrogênio líquido e estocadas indefinidamente.

Descongelamento de células.

Para descongelamento, os tubos de criopreservação contendo as células escolhidas foram retirados do nitrogênio líquido e imediatamente transferidos para o banho-maria a 37°C. Após o completo descongelamento das células, os tubos foram mergulhados em banho de gelo por aproximadamente 3 min. A seguir as suspensões foram transferidas para tubos de centrifuga e o volume foi ajustado para 10 ml com meio com-

pleto, gôta a gôta, sob agitação. A suspensão foi deixada em repouso por 5 min, em temperatura ambiente e então centrifugada a 200 g por 10 min. As células foram lavadas mais uma vez em meio completo, resuspensas no mesmo meio, colocadas em frascos de cultura contendo "feeder layer" de macrófagos e incubadas conforme já descrito acima. As culturas foram repicadas ou retiradas para inoculação em animais, após crescimento em semi-confluência.

Caracterização dos isótipos de imunoglobulinas dos anticorpos monoclonais.

Os isótipos de Ig dos anticorpos monoclonais anti-**T.cruzi** foram determinados por imunodifusão em gel de agarose a 1% em SST, pH 7,2 (Duchterlony, 1958). Foram utilizados nas reações, os sobrenadantes dos hibridomas, originais ou concentrados por ultrafiltração em membrana PM 10 (Amicon) e soros monoespecíficos anti-Ig de camundongo, preparados em nosso laboratório e já referidos acima.

Purificação dos anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais da classe IgG produzidos em cultura ou obtidos de ascites, foram purificados através de cromatografia de afinidade em Sepharose-Prot.A, segundo indicações de Ey e colaboradores (1978).

REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Reações em bloco foram realizadas para a titulação do conjugado anti-Ig de camundongo marcado com fluoresceína e para padronização de soro imune anti-**T.cruzi** (padrão positivo) e soro normal (padrão negativo), obtidos de camundongos F1(CBA x C57Bl/10) imunizados e normais, respectivamente. As reações de IFI foram realizadas de acordo com indicações de Camargo (1966), utilizando como antígenos formas tripomastigotas sanguíneas, formas tripomastigotas e amastigotas derivadas de cultura de células e formas epimastigotas, preparadas como descritas acima e a seguir fixadas em formol a 2% em SST pH 7.2. Após a titulação, o conjugado foi utilizado nas reações na diluição final de 1:160 e os soros padrões positivo e negativo foram usados a 1:80 e 1:10, respectivamente. As leituras das reações foram feitas em microscópio de fluorescência (Zeiss - Alemanha).

LISE MEDIADA POR COMPLEMENTO

A capacidade lítica de soros policlonais e anticorpos monoclonais anti-**T.cruzi** foi verificada através de técnica descrita por Krettl e colaboradores (1979). Tripomastigotas sanguíneas foram obtidas de camundongos imunossuprimidos, infectados com a cepa Y do **T.cruzi** e preparadas como já descrito. Para excluir o uso de tripomastigotas contendo imunoglobulinas ligadas à membrana, alíquotas de cada preparação foram sempre pré-incubadas com complemento humano (CHu) por 30 min a 37°C. Foram usadas nos experimentos apenas preparações do **T.cruzi** resistentes à lise pelo CHu.

Amostras de 200 μ l da suspensão contendo 4×10^7 tripomastigotas por ml foram misturadas a 200 μ l de diferentes soros de camundongos, normais ou infectados ou sobrenadantes de cultura contendo anticorpos monoclonais, incubadas a 37°C por 30 min e a seguir transferidas para banho de gelo. De cada amostra foram separadas quatro alíquotas de 50 μ l e a cada duas alíquotas foi adicionado igual volume de CHu ou de CHI (complemento humano inativado), procedendo-se a seguir a incubação a 37°C por 60 min. Após este período de incubação, os tubos foram transferidos para banho de gelo e o número de parasitas móveis em cada tubo foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. A porcentagem de lise obtida em cada tratamento foi calculada através da fórmula abaixo:

$$\% \text{ de lise} = 100 - \frac{\text{n}^\circ \text{ de parasitas após incubação com CHu}}{\text{n}^\circ \text{ de parasitas após incubação com CHI}} \times 100$$

TESTES DE PROTEÇÃO PASSIVA EM CAMUNDONGOS CBA

Camundongos CBA, machos e fêmeas com três meses de idade foram utilizados como recipientes nos testes de proteção passiva, em grupos de seis animais por soro ou anticorpo monoclonal testado. Soros de camundongos F1(CBA x C57B1/10), normais e cronicamente infectados com o **T. cruzi** (soros de sexta semana pós-infecção), previamente testados, foram utilizados como controles negativos e positivos, respectivamente. As ascites contendo anticorpos monoclonais anti-**T. cruzi** foram empregadas separadamente ou em "pool" e os soros imunes anti-**T. cruzi** foram usados diluídos ou não nos testes de proteção passiva. Os níveis

de IgG2a ou IgG2b das ascites foram previamente determinados por imunodifusão radial (Mancini et al., 1965) de tal forma que foram inoculadas quantidades comparáveis dessas imunoglobulinas com as encontradas nos soros de camundongos F1 cronicamente infectados (Britto, 1988).

O teste de proteção consistiu em injetar 0,25 ml de soro ou líquido ascítico, por animal, por via ey. Uma hora depois da injeção do anticorpo, os animais receberam uma dose ip de 10^5 formas sanguícolas do **T. cruzi**. Foram realizados pelo menos três testes para cada soro ou ascites estudados e estes foram considerados protetores quando capazes de reduzir significativamente a parasitemia e/ou mortalidade dos animais desafiados com o parasita, por um período de 30 dias de observação.

IODINAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DO **T. cruzi**

Os parasitas, preparados como descrito acima, foram marcados com iodo radioativo ($\text{Na } ^{131}\text{I}$) pela técnica do Iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3,6 difenilglicouril - Sigma), segundo indicações de Fraker e Speck (1978). Os parasitas ($2 - 5 \times 10^8$ células) foram incubados com 0,5 ml de solução de Hanks contendo 500 Ci de $\text{Na } ^{131}\text{I}$ (IPEN - São Paulo) em tubo pré-coberto com 20 μg de Iodogen, por 10 min a 4°C , com agitação ocasional. Para interromper o processo de marcação, a suspensão foi transferida para um tubo livre de Iodogen e lavada três vezes com meio de cultura simples, por centrifugação a 1000 g por 20 min. O sobrenadante foi descartado adequadamente e os parasitas foram ressuspensos em 0,5 ml de tampão de lise contendo 1% de Nonidet-P40 (NP-40),

10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 1,0 mM de TLCK (N- α -tosil-L-lisil-clorometilcetona - Sigma) e 1,0 mM de PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto - Sigma) e incubados a 37°C por 20 min. Os lisados foram centrifugados a 10000 g por 30 min a 4°C e os sobrenadantes foram usados para estudos de imunoprecipitação.

IMUNOPRECIPITAÇÃO

Os experimentos de imunoprecipitação de antígenos de **T. cruzi** foram realizados segundo protocolo de Zingales e colaboradores (1982), com algumas modificações. Volumes de 0,5 ml dos lisados contendo antígenos do **T. cruzi** marcados com ^{131}I foram incubados, por 15 min em temperatura ambiente, com 50 μl de uma suspensão a 10% de **Staphylococcus aureus** da linhagem Cowan I, mortos por aquecimento e fixados em formol (Kessler, 1975), para excluir das preparações qualquer material que pudesse se adsorver ao **S. aureus**. Após centrifugação a 10000 g por 30 min, o sobrenadante foi dividido em alíquotas, correspondendo a cerca de 3×10^7 parasitas, que foram incubados com igual volume de soro normal, soro imune ou líquido ascítico por 2 horas a 4°C, com agitação ocasional. Os complexos antígeno-anticorpo foram precipitados da mistura pela adição de 200 μl da suspensão de **S. aureus** a cada tubo. Após incubação por 30 min em temperatura ambiente, os imunocomplexos foram lavados duas vezes com tampão contendo 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 0,3 M de cloreto de sódio e 1,0 mM de EDTA e uma vez com tampão contendo 10 mM de Tris-HCl, pH 8,7, 0,3 M de cloreto de sódio, 0,1% de SDS (dodecil sulfato de sódio) e 0,05% de NP-40. Os imunocomplexos foram ressuspensos em 75 μl de tampão de amostra para eletroforese em

gel de poliácridamida (Takács, 1979), aquecidos por 20 min a 37° C e por 3 min a 100°C. Após centrifugação a 10000 g por 30 min, os sobrenadantes foram analisados por eletroforese em gel de poliácridamida contendo SDS.

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRIDAMIDA

As análises eletroforéticas foram feitas de acordo com indicações de Laemli (1970), em gel de poliácridamida a 10% contendo 0,1% de SDS (SDS-PAGE), 15 mA, durante cerca de 4 horas ou até o corante traçador (azul de bromofenol) atingir 1 cm do fundo do gel. Os seguintes padrões de peso molecular foram analisados em cada gel: miosina (205 KDa); soro albumina bovina (68 KDa); cadeia pesada de IgG humana (55 KDa); ovalbumina (43 KDa); cadeia leve de IgG humana (25 KDa) e mioglobina (16 KDa). A exceção da IgG humana e da mioglobina, purificadas em nosso Laboratório, as proteínas utilizadas como padrão foram procedentes da Sigma. Após a eletroforese, os géis foram corados pelo Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad Laboratories, California, USA), secos e expostos ao filme para raio-X (Companhia Brasileira de Filmes Sakura, Rio de Janeiro). Os géis foram expostos por períodos curtos (24 a 72 horas) ou longos (4 a 10 dias), a -70°C e revelados em processadora automática para filmes de raio-X (Kodak RP X-OMAT Processor).

"IMMUNOBLOTTING"

Formas epimastigotas de meio LIT e tripomastigotas sanguícolas, purificadas como já descrito e sedimentadas por centrifugação, foram lisadas pela ressuspensão em tampão contendo 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 6 mM de CHAPS (3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propano-sulfonato - Sigma), 1 mM de TLCK e 1 mM de PMSF. Após uma hora de incubação a 37°C no tampão de lise, a solução foi centrifugada a 10000 g por 30 min a 4°C. Os extratos contendo os antígenos do parasita foram misturados a igual volume de tampão de amostra para SDS-PAGE, duas vezes concentrado, incubados por 20 min a 37°C e fracionados por eletroforese em gel de poliácridamida, segundo procedimentos descritos acima. O material fracionado foi transferido do gel para membrana de nitrocelulose BA 85 (Schleicher & Schuel - Alemanha) por eletroforese (30 mA por 18 horas), de acordo com técnica descrita por Towbin e colaboradores (1979). Uma tira da nitrocelulose contendo os padrões de peso molecular e também os antígenos fracionados foi retirada para coloração com "amido black" e o restante foi tratado com 3% de BSA em SST, pH 7,2 por 60 min em temperatura ambiente. Após lavagem com SST, pH 7,2, a membrana foi cortada em tiras e cada uma delas foi colocada para incubação em diluição apropriada do antissoro (1:20), soro normal (1:20) ou anticorpo monoclonal (400 µg/ml) em SST contendo 1% de BSA e 2% de soro normal de carneiro (SST-BSA-SNC), por 120 min em temperatura ambiente. Após seis lavagens de 5 min cada em SST, pH 7,2, cada tira foi incubada com IgG e carneiro anti-IgG de camundongo conjugada a peroxidase, diluída 1:3000 em SST-BSA-SNC, durante 120 min em temperatura ambiente. As fitas foram lavadas como na etapa anterior e a seguir tratadas com a solução de substrato/revelador contendo 60 mg por

cento de diaminobenzidina (Sigma) e 0,015 % de H₂O₂ (Merck) em 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4.

RESULTADOS

NÍVEIS DE ANTICORPOS ANTI-*T. cruzi* EM CAMUNDONGOS INFECTADOS

Camundongos F1 (CBA x C57B1/10) foram infectados com 100 tripomastigotas sanguícolas da cepa Y do *T. cruzi*. Entre os dias 11^o e 12^o após a inoculação dos parasitas, foi constatada a infecção em 100 por cento dos animais, através de exame microscópico à fresco do sangue periférico. Parasitemias da ordem de 1.5 a 3.0 x 10⁵ parasitas por ml de sangue foram observadas. Na sexta semana pós-infecção, a metade dos animais recebeu uma dose ev constituída por 10³ formas sanguícolas do parasita mortas com formaldeído. A cinética de produção dos anticorpos contra os três estágios do parasita foi acompanhada nos dois grupos experimentais, através de reações de IFI, utilizando-se soros isolados dos animais em vários estágios da infecção pelo *T. cruzi*. Considerando ainda que durante a fase crônica da infecção chagásica camundongos produzem anticorpos protetores, os soros obtidos de F1 entre a sexta e a nona semanas pós-infecção foram também testados em experimentos de proteção passiva em animais susceptíveis (camundongos CBA).

Os níveis de anticorpos circulantes contra o parasita em camundongos F1 durante o curso da infecção, medidos por IFI, são mostrados na tabela I. Conforme pode-se observar, a presença de anticorpos dirigidos para as formas tripomastigotas do parasita começa a ser detectada a partir da segunda semana pós-infecção. Ao redor da quinta semana o título para este estágio alcança o nível de 1:80, mantendo-se estável até a décima segunda semana pós-infecção. Soros obtidos de

animais sacrificados após este período (soros de 16, 20 e 24 semanas pós-infecção) apresentaram uma elevação do título de anticorpos contra tripomastigotas (1:320). Os soros de animais que receberam uma dose reforço na sexta semana pós-infecção apresentaram resultados semelhantes aos obtidos com os grupos apenas infectados (dados não tabelados). Os títulos encontrados para as formas epimastigotas do *T. cruzi* foram frequentemente baixos (no máximo 1:40) em todos soros examinados. Títulos mais elevados foram obtidos para as formas amastigotas do parasita (1:640).

Os resultados encontrados nos testes de proteção passiva de soros imunes de camundongos F1 estão resumidos na tabela II. Pode-se observar que os soros imunes obtidos na sétima e oitava semanas pós-infecção foram mais eficientes em proteger camundongos CBA do desafio com 10 *T. cruzi*, a julgar pela redução dos níveis de parasitemia e mortalidade nestes grupos, comparados aos controles. No experimento resumido na tabela II, foi observada uma queda no efeito protetor quando se utilizou soros da nona semana de infecção. No entanto, em repetições de experimentos similares, a redução da capacidade protetora de soros colhidos após a oitava semana não foi novamente observada. Soros provenientes de camundongos F1 que receberam uma dose-reforço na sexta semana pós-infecção apresentaram a mesma eficiência nos testes de proteção passiva que os derivados de animais apenas infectados. Foram observados resultados negativos nos testes de proteção passiva quando se utilizou soros imunes diluídos. Apenas o soro da sexta semana, quando administrado na diluição de 1:2 foi capaz de manter níveis reduzidos de parasitemia. Estes resultados foram repetidamente encontrados em experimentos similares realizados.

A capacidade protetora dos soros de camundongos F1 cronicamente infectados foi abolida pela sua absorção com tripomastigotas sanguícolas ou com tripomastigotas de cultura de células (8×10^6 parasitas / ml de soro), vivos ou mortos com formaldeído. A absorção dos anticorpos protetores com epimastigotas ou com amastigotas não foi obtida, mesmo utilizando-se quantidades 10 vezes superiores de parasita (dados não tabelados).

Tabela 1 - Imunofluorescência de soros de camundongos F1 infectados com 10^2 T. cruzi.

Semanas pós-infecção	Título dos soros por IFI		
	Tripomastigotas(*)	Amastigotas(*)	Epimastigotas
0	<10	<10	<10
1	<10	<10	<10
2	20	10	<10
3	20	80	40
4	20	80	40
5	80	640	80
6	80	640	40
7	80	640	40
8	80	640	40
12	80	320	40
16	320	640	40
20	320	640	40
24	320	640	40

(*)- Formas do parasita obtidas de cultura de células.

Tabela II - Níveis de parasitemia e de sobrevivência de camundongos CBA imunizados passivamente com soro de camundongos F1 e desafiados com 10^5 tripomastigotas sanguícolas do *T.cruzi*.

SOROS	PARASITAS /ML DE SANGUE $\times 10^6$			% DE SOBREVIVÊNCIA			
	DIAS APÓS A INFECÇÃO			DIAS APÓS A INFECÇÃO			
	6º	7º	8º	10º	15º	20º	30º
SN (a)	5.20 (\pm 1.96)	6.10 (\pm 0.91)	2.10 (\pm 0.76)	0	-	-	-
SI 6ª sem (b)							
1:1	0.25 (\pm 0.19)	0.49 (\pm 0.32)	0.51 (\pm 0.40)	100	66	66	33
1:2	0.67 (\pm 0.26)	1.25 (\pm 0.52)	0.56 (\pm 0.61)	80	0	-	-
1:4	1.20 (\pm 0.78)	3.43 (\pm 1.97)	1.13 (\pm 0.25)	66	0	-	-
SI 7ª sem							
1:1	0.50 (\pm 0.32)	1.76 (\pm 1.15)	1.75 (\pm 1.86)	100	50	50	50
1:2	1.00 (\pm 0.36)	2.60 (\pm 0.86)	0.65 (\pm 0.18)	100	0	-	-
1:4	ND	ND	ND	100	0	-	-
SI 7ª sem + "booster" (c)							
1:1	0.49 (\pm 0.16)	1.06 (\pm 0.62)	0.31 (\pm 0.14)	100	66	33	33
1:2	1.40 (\pm 0.51)	4.21 (\pm 0.72)	1.10 (\pm 0.52)	100	0	-	-
1:4	ND	ND	ND	100	0	-	-
SI 8ª sem							
1:1	0.50 (\pm 0.45)	1.11 (\pm 0.96)	0.29 (\pm 0.26)	100	66	66	66
1:2	3.44 (\pm 0.80)	4.79 (\pm 1.79)	0.97 (\pm 0.78)	100	0	-	-
SI 8ª sem + "booster"							
1:1	0.66 (\pm 0.29)	1.68 (\pm 0.50)	0.21 (\pm 0.08)	100	50	50	50
1:2	1.42 (\pm 1.13)	3.95 (\pm 2.26)	0.61 (\pm 0.49)	40	0	-	-
SI 9ª sem							
1:1	1.40 (\pm 0.43)	4.00 (\pm 1.50)	0.95 (\pm 0.60)	100	33	0	-
1:2	2.82 (\pm 1.37)	4.22 (\pm 1.19)	1.40 (\pm 1.20)	80	0	0	-
SI 9ª sem + "booster"							
1:1	1.52 (\pm 1.10)	3.80 (\pm 1.77)	1.55 (\pm 0.93)	100	66	0	-
1:2	4.24 (\pm 0.84)	4.74 (\pm 0.51)	1.62 (\pm 0.62)	100	0	-	-

Soro normal de camundongo F1 (CBA \times C57B1/10) (a); soros imunes de camundongos F1 (b), colhidos após 6, 7, 8 e 9 semanas de infecção com 100 tripomastigotas sanguícolas da cepa Y do *T.cruzi*. Soros imunes de camundongos F1 que receberam um "booster," constituído pela injeção ex de 10^3 tripomastigotas sanguícolas formolizados, seis semanas após a infecção e colhidos na 7ª, 8ª e 9ª semanas de infecção. ND - Não determinado. Os resultados representam a média de 5 a 6 camundongos por grupo de animais passivamente imunizados.

CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DO *T. cruzi* RECONHECIDOS POR SOROS DE CAMUNDONGOS CRONICAMENTE INFECTADOS.

As análises eletroforéticas de antígenos de superfície das formas amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas do *T. cruzi*, marcados com Na^{131}I (^{131}I) e imunoprecipitados por soros de camundongos F1 cronicamente infectados com o parasita (sexta semana pós-infecção) são mostradas nas figuras 1 e 2.

A figura 1 mostra os componentes radioativos de amastigotas (A) e de tripomastigotas (B) ligados pelos soros imunes. Conforme pode-se observar, um polipeptídeo de peso molecular aparente (M_r) de 50 KDa, comum as duas formas do parasita examinadas neste experimento, foi precipitado por todos os soros imunes utilizados. Além deste componente, os antígenos de amastigotas com M_r situados entre 63 e 75 KDa e o antígeno de 90 KDa foram também precipitados pelo soro de F1 (canal c). Em tripomastigotas sanguícolas, além do antígeno de 50 KDa mais três componentes com 75, 85 e 95 KDa, respectivamente foram ligados por soro imune de F1 (canal g). Resultados semelhantes foram encontrados com soros imunes de camundongos CBA e C57Bl/10, coletados na 4ª semana pós-infecção (canais e, f).

Na figura 2 pode-se observar os antígenos de epimastigotas imunoprecipitados por diferentes lotes de soros de camundongos F1 cronicamente infectados (soros de 6ª semana). Todos os soros testados precipitaram fracamente o componente de 90 KDa da superfície de epimastigotas, além de um complexo de proteínas com M_r entre 65 e 75 KDa e outro entre 43 e 50 KDa.

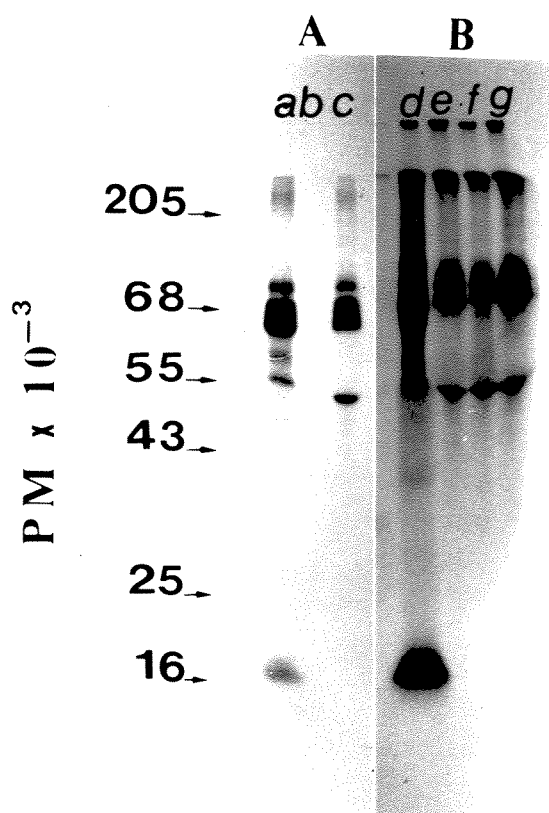


Figura 1 - Análise por SDS-PAGE de antígenos de superfície de amastigotas de cultura de células (A) e de tripomastigotas sanguíneas (B), marcados com ^{131}I e imunoprecipitados por soros de camundongos. Perfil das proteínas de superfície de amastigotas marcados (canal a); antígenos de amastigotas precipitados por soro imune de camundongo F1 (canal c) e controle com soro normal de camundongo F1 (canal b). Perfil das proteínas de superfície de tripomastigotas marcados (canal d); antígenos de tripomastigotas precipitados por soros imunes de camundongos CBA, C57Bl/10 e F1, respectivamente (canais e, f, g). As setas indicam os padrões de peso molecular.

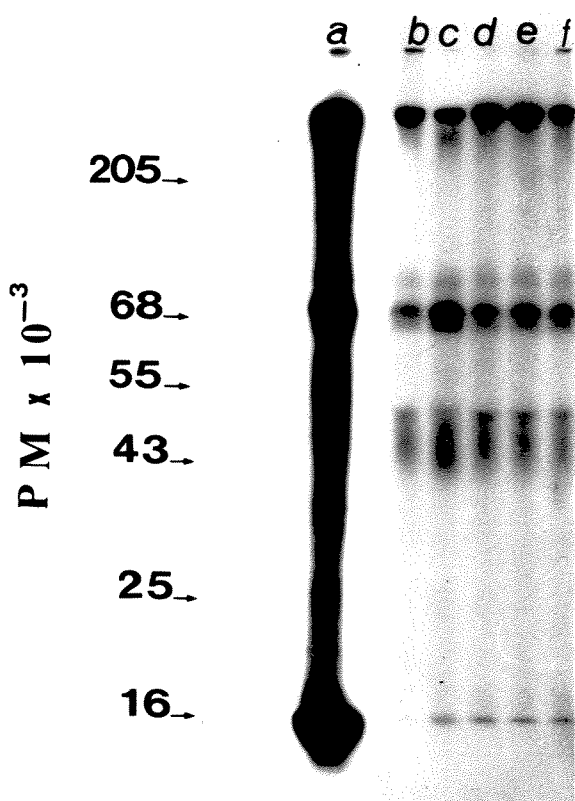


Figura 2 - Análise por SDS-PAGE de proteínas de superfície de epimastigotas, marcadas com ¹³¹I e imunoprecipitadas por soros de camundongos. Perfil das proteínas de superfície marcadas (canal a); antígenos precipitados por diferentes soros imunes de camundongos F1 cronicamente infectados (canais b-f). O "background" obtido com soro normal de F1 foi semelhante ao mostrado na figura 3. As setas indicam os padrões de peso molecular.

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-*T.cruzi*.

Com o objetivo de obter anticorpos monoclonais anti-*T.cruzi*, representativos da fase crônica da infecção pelo parasita, foram realizados dois experimentos de fusão celular. Nestes experimentos, foram utilizadas células de mieloma SP2/0 e células esplênicas de camundongos F1, na sétima semana pós-infecção com 10^2 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do parasita, que receberam (experimento I) ou não (experimento II) um "booster", 4 dias antes da fusão. A detecção de culturas de hibridomas secretoras de anticorpos contra o *T.cruzi* foi feita através de reações de IFI dos sobrenadantes, utilizando-se formas tripomastigotas e amastigotas da cepa Y do parasita, obtidas em cultura de células, como preparações antigênicas.

Após os procedimentos de fusão, as células do experimento I foram lançadas em 2 placas de 96 orifícios. Cerca de 12 dias após o lançamento das culturas, dois a cinco clones de híbridos puderam ser observados em cada orifício. Entre os hibridomas obtidos após esta fusão, 20 secretavam anticorpos contra o *T.cruzi* (tabela III). Apenas dois orifícios apresentaram contaminação com o parasita neste experimento, cerca de 30 dias após o início da cultura. No experimento II, as células foram lançadas em 3 placas de 96 orifícios, tendo sido observado crescimento em apenas 60% deles. Nesta fusão foram obtidas 11 culturas secretoras de anticorpos anti-*T.cruzi* (tabela III). Ao longo dos subcultivos para clonagem e congelamento, apenas 8 das 20 culturas obtidas na fusão I e as 11 obtidas na fusão II se mantiveram estáveis (secretoras). As 19 culturas obtidas foram clonadas por diluição limitante, tendo sido selecionados de 1 a 4 clones de cada cultura de hibridoma anti-*T.cruzi*. Pelo menos 1 clone de cada híbrido original foi

expandido para a obtenção de sobrenadantes contendo anticorpos monoclonais. Estes sobrenadantes foram utilizados para: (i) a determinação dos isótipos das imunoglobulinas (Ig) secretadas, através de reações de imunodifusão (tabela IV); (ii) a caracterização da reatividade dos anticorpos monoclonais com os diferentes estágios do parasita, através de reações de IFI (tabela IV); (iii) a verificação de atividade lítica sobre formas tripomatigotas sanguícolas (tabela V).

Tabela III - Híbridomas obtidos em dois experimentos de fusão celular.

Experimento	Dose-reforço (a)	Culturas Positivas por IFI (b)
I	+	20
II	-	11

Experimentos de fusão entre células SP2/0 e células esplênicas de camundongos F1 (CBA x C57B1/10), cronicamente infectados com a cepa Y do *T. cruzi*. (a) Dose-reforço constituída por 10^3 tripomastigotas sanguícolas mortas com formaldeído, inoculada nos animais imunizados por via ev, na sexta semana pós-infecção; (b) Reações de Imunofluorescência, utilizando formas tripo e amastigotas, obtidas de cultura de células e sobrenadantes de cultura dos híbridomas.

Isótipo e Especificidade dos anticorpos monoclonais.

Entre os hibridomas anti-*T.cruzi* obtidos, foram detectados por imunodifusão 2 clones secretores de IgM, 1 de IgG1, 10 de IgG2a, 4 de IgG2b e 2 de IgG3. Destes, 5 reagiram por IFI com as formas tripó e amastigotas, 8 reagiram apenas com tripomastigotas, 3 anticorpos reagiram apenas com amastigotas e 2 reagiram com os três estágios do parasita. Apenas 1 anticorpo monoclonal reagiu com epimastigotas, tendo sido este último selecionado casualmente pela sua reatividade com células VERO, contaminante eventual das preparações de antígenos do parasita obtidos em cultura de células (tabela IV). Os monoclonais que reagiram por IFI com tripomastigotas derivados de cultura de células reagiram também com tripomastigotas sanguícolas, embora mais fracamente. Todos os sobrenadantes contendo anticorpos monoclonais anti-*T.cruzi* apresentaram títulos baixos ($>1:2 <1:16$) por IFI, para os antígenos do parasita reconhecidos (dados não tabelados).

Lise de tripomastigotas mediada pelo complemento.

A atividade lítica dos anticorpos monoclonais anti-*T.cruzi*, pertencentes às subclasses IgG2a e IgG2b sobre tripomastigotas sanguícolas foi verificada utilizando-se sobrenadantes de cultura dos hibridomas (tabela V). Quatro clones distintos (1D8, 5B6, 5C3 e 5C4), assim como produtos derivados da subclonagem de 5B6 e 5C4 apresentaram resultados positivos (superiores a 30%). Soros de camundongos F1 e Biozzi, cronicamente infectados, apresentaram índices de 85-100% de lise. Resultados negativos foram obtidos com soros normais de F1.

Tabela IV - Especificidade dos anticorpos monoclonais para os diferentes estágios do *T. cruzi*, cepa Y.

Isótipos	Clones	Reações de Imunofluorescência de		
		Tripomastigotas (a)	Amastigotas (b)	Epimastigotas (c)
IgM	1B8	+	+	+
	1C4D6	-	-	+
IgG1	2C4	+	+	-
IgG2a	1D5	+	-	-
	1D8	+	+	-
	4B1	+	+	-
	5A5	+	-	-
	5B5C1	-	+	-
	5B6	+	-	-
	5C3	+	+	+
	2B2	-	+	-
	2B3	-	+	-
	2C5G3	+	+	-
IgG2b	1D11	+	+	-
	5C4	+	-	-
	5C5	+	-	-
	2C5D6	+	-	-
IgG3	2D2	+	-	-
	2A5	+	-	-

a,b - Formas tripomastigotas e amastigotas, respectivamente, obtidas de cultura de células; c - epimastigotas obtidas de meio de LIT.

Tabela V - Atividade lítica, mediada por complemento, de soros e de anticorpos monoclonais sobre formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*.

Anticorpos		Porcentagem de lise *
Isótipo	AcMo (a)	
IgG2a	1D5	26
	1D8	40
	4B1	22
	5A5	29
	5B6	37
	5B6F9D2	33
	5B6F9E6	21
	5B6H3B3	50
	5B6H3G10	38
	5C3	38
IgG2b	1D11	27
	5C4	37
	5C4B11F4	28
	5C4B11G7	39
Soro imune (b)		
	SIF1	100
	SIBiozzi	85

Nos testes de lise (*) foram utilizados sobrenadantes de hibridomas anti-*T. cruzi*, como fonte de anticorpos monoclonais (a) e soros imunes de camundongos (b) F1 e Biozzi, cronicamente infectados com *T. cruzi*.

TRANFERÊNCIA PASSIVA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA CAMUNDONGOS CBA.

Considerando que o efeito protetor do soro imune de camundongos em fase crônica da infecção é devido a imunoglobulinas das subclasses IgG2a e IgG2b, ascites de onze hibridomas, predominantemente das subclasses referidas, que reagiram com tripomastigotas e/ou amastigotas por IF1, foram produzidas para utilização nos experimentos de proteção passiva de camundongos CBA.

Na tabela VI está representado o conjunto de resultados obtidos em três experimentos de proteção. Nenhuma das ascites utilizadas foi capaz de conferir proteção passiva aos animais recipientes, contra um desafio com 10^5 formas sanguícolas do *T.cruzi*, conforme verificado pelo alto grau de parasitemia e ausência de sobreviventes neste grupo experimental. Os animais passivamente imunizados com soro de camundongos F1 cronicamente infectados, ao contrário, apresentaram níveis reduzidos de parasitemia e 50% dos animais deste grupo sobreviveu ao período de 30 dias de observação.

Tabela VI - Níveis de parasitemia e de sobrevivência de camundongos CBA imunizados passivamente com soros ou anticorpos monoclonais e desafiados com 10^5 formas sanguícolas do *T.cruzi*.

Soro ou AcMo	Parasitas/ml de sangue $\times 10^6$		% de sobrevivência			
	7º dia pós-infecção		dias após a infecção			
			10	15	30	
SNF1 (a)	7.66	(\pm 3.98)	66.7	0.0	0	
SIF1 (b)	0.70	(\pm 0.23)	100.0	50.0	50.0	
Ascites de AcMo (c)						
IgG1	2C4	4.91	(\pm 2.89)	50.0	0.0	0
IgG2a	5B6F9	3.90	(\pm 1.23)	16.6	0.0	0
	5B6H3	5.24	(\pm 1.90)	16.6	0.0	0
	5B5C1	4.93	(\pm 1.57)	33.3	0.0	0
	2C5G3	7.05	(\pm 2.03)	50.0	0.0	0
	2B3	5.09	(\pm 2.47)	0.0	0.0	0
IgG2b	2C5D6	4.89	(\pm 2.99)	33.3	0.0	0
	5C4B11	5.73	(\pm 2.55)	16.6	0.0	0
	5C5	4.79	(\pm 3.11)	28.5	0.0	0
IgG3	2A5C7	4.64	(\pm 2.08)	16.6	0.0	0
	2A5C8	3.96	(\pm 1.79)	50.0	0.0	0
Pool de ascites (d)	5.84	(\pm 4.10)	16.6	0.0	0	

Pool de soros normais de camundongos F1 (CBA \times C57B1/10) (a); pool de soros imunes de camundongos F1, colhidos 6 semanas após a infecção com 10 formas sanguícolas da cepa Y do *T.cruzi* (b); ascites contendo anticorpos monoclonais anti-*T.cruzi* (c) (isótipos discriminados à esquerda); pool das ascites relacionadas acima (d).

CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS DO *T. cruzi* RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS MONOCLONAIS.

Para a caracterização dos antígenos detectados pelos anticorpos monoclonais foram realizados experimentos de imunoprecipitação e "immunoblotting".

Os resultados das análises eletroforéticas dos antígenos de superfície de epimastigotas e amastigotas, cepa Y, marcados com ^{131}I e imunoprecipitados pelos anticorpos monoclonais anti-*T. cruzi* estão resumidos na tabela VII e nas figuras 3, 4 e 5 .

Apenas os monoclonais 5C4B11, 5B5C1, 5C5, 5B6H3, 5B6F9 e 2C5D6 dos onze analisados foram capazes de precipitar fortemente componentes de membrana da forma epimastigota do parasita (figura 3). Todos os monoclonais precipitantes reagiram com determinante contido nos componentes de 160, 66 e 50 KDa do parasita. Este resultado pode ser visto com mais clareza na figura 4, onde se encontram repetidas as análises eletroforéticas dos antígenos precipitados pelos anticorpos monoclonais 5C4B11, 5B5C1, 5C5, 5B6H3 e 2C5D6.

Na figura 5 são apresentados os resultados obtidos após SDS-PAGE dos antígenos de superfície de amastigotas do *T. cruzi* imunoprecipitados pelos anticorpos monoclonais. Conforme pode-se observar, apenas os anticorpos monoclonais 2B3 e 2C4 não reagiram com qualquer componente deste estágio do parasita. Os demais reagiram com o componente de 50KDa, sendo que três deles (5C4B11, 5B6(H3 e F9) e 2C5D6) reagiram também com um polipeptídeo duplo de 23-27 KDa.

Resultados obtidos com antígenos de tripomastigotas sanguíneas (não mostrados) indicam que os monoclonais 2C5D6, 5B6H3, 5C4B11, 5B5C1 e 2A5CB, imunoprecipitam também o componente de 50 KDa presente neste estágio do parasita.

Em todos os experimentos foram sempre obtidos resultados negativos quando se utilizou soro normal de camundongos F1 como controle na imunoprecipitação de antígenos de *T.cruzi*.

Tabela VII - Polipeptídeos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais nos três estágios do *T.cruzi*.

AcMo	Polipeptídeos discriminados em					
	Epimastigotas			Amastigotas		Tripomastigotas
	160	66	50 *	50	23-27*	50*
5B6H3	+	+	+	+	+	ND
5B6F9	+	+	+	+	+	+
5C4B11	+	+	+	+	+	+
2C5D6	+	+	+	+	+	+
5C5	+	+	+	+	-	ND
5B5C1	+	+	+	+	-	+
2A5C7	+	+	+	+	-	ND
2A5C8	+	+	+	+	-	+
2C5G3	+	+	+	+	-	ND
2C4	-	-	-	-	-	ND
2B3	-	-	-	-	-	ND

* - Valores de peso molecular aparente em KDa, obtidos em experimentos de imunoprecipitação. ND - Não determinado. AcMo - Anticorpos monoclonais anti-*T.cruzi*.



Figura 3 - Análise por SDS-PAGE de proteínas de superfície de epimastigotas marcadas com ^{131}I e imunoprecipitadas por anticorpos monoclonais. Perfil das glicoproteínas de superfície marcadas (canal a); antígenos imunoprecipitados pelos anticorpos monoclonais 2B3, 5C4B11, 2A5C7, 2A5C8, 5B5C1, 2C4, 5C5, 2C5G3, 5B6H3, 5B6F9, 2C5D6 (canais b-l). Controle negativo com soro normal de F1 no canal m. As setas indicam os padrões de PM.

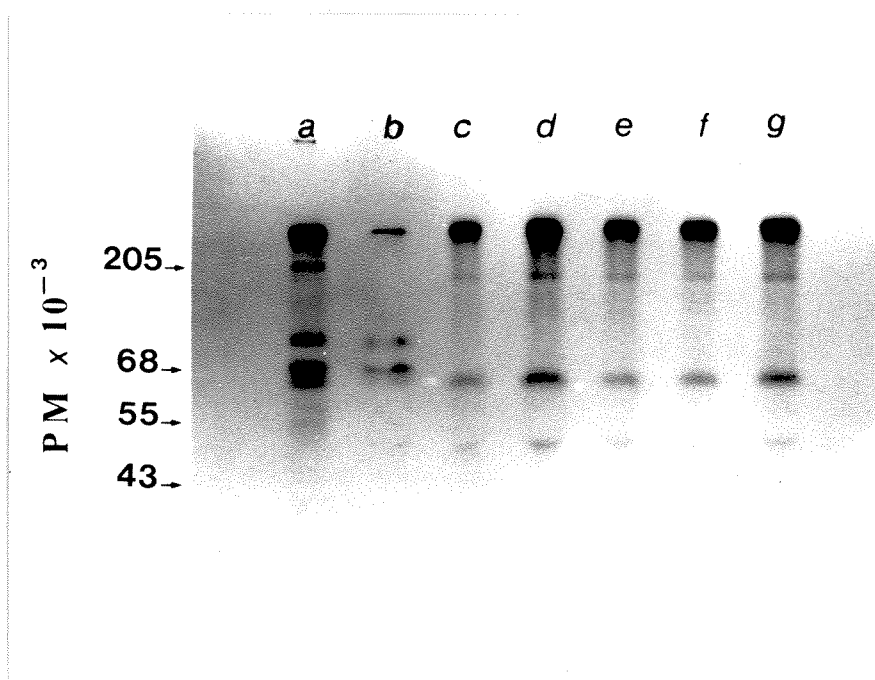


Figura 4 - Análise por SDS-PAGE de glicoproteínas de superfície de epimastigotas marcados com ^{131}I e imunoprecipitadas por soro imune e anticorpos monoclonais. Perfil das proteínas de superfície marcadas (canal a); antígenos imunoprecipitados por soro de camundongos F1 cronicamente infectados (canal b) e pelos anticorpos monoclonais anti-*T. cruzi* 5C4B11, 5B5C1, 5C5, 5B6H3 e 2C5D6, respectivamente (canais c-g). "Background" com soro normal de F1 foi semelhante ao da figura 3. As indicam padrões de PM.

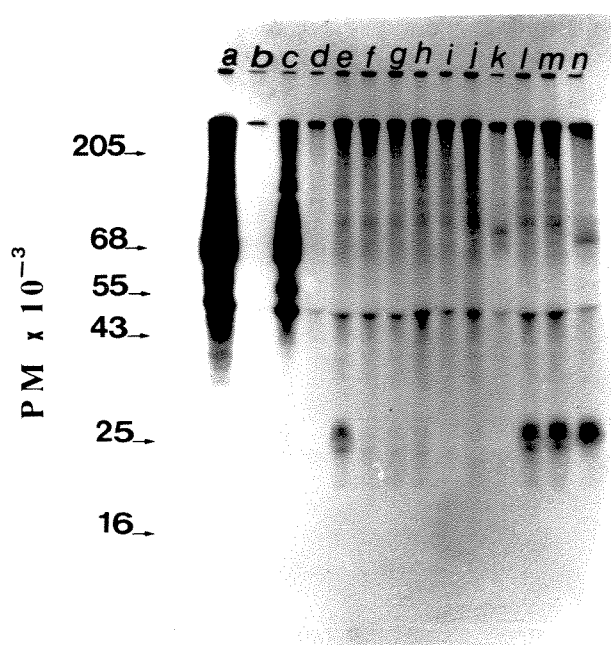


Figura 5 - Análise por SDS-PAGE de proteínas de superfície de amastigotas de cultura de células marcadas com ^{131}I e imunoprecipitadas por soro imune e por anticorpos monoclonais. Perfil das proteínas de superfície marcadas (canal a); antígenos imunoprecipitados por soro de camundongos F1 cronicamente infectados (canal c) e pelos anticorpos monoclonais anti-*T.cruzi* 2B3, 5C4B11, 2A5C7, 2A5C8, 5B5C1, 2C4, 5C5, 2C5G3, 5B6H3, 5B6F9 e 2C5D6, respectivamente (canais d-n). Controle negativo com soro normal de F1 no canal b. As setas indicam padrões de PM.

A reatividade dos anticorpos monoclonais frente a lisados totais das formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*, após tratamento dos parasitas com o detergente CHAPS, foi verificado através da técnica de "immunoblotting".

Na figura 6 pode-se observar os resultados obtidos com os anticorpos monoclonais 5C5, 5B5C1 e 5B6H3 frente a lisados de epimastigotas e de tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Estes anticorpos desenvolveram reação com os componentes de 72 e 65 KDa das formas tripomastigotas. Outras bandas foram reveladas pelos anticorpos monoclonais citados, porém muito fracamente, mesmo quando as fitas de nitrocelulose foram deixadas por tempo prolongado (5min) na solução contendo substrato/revelador. Em epimastigotas os resultados foram considerados negativos. Os demais anticorpos testados não apresentaram reações com os lisados do parasita, à exceção do monoclonal 5B6F9 que apresentou o mesmo perfil de reação descrito (dado não mostrado).

Na parte D da figura 6 pode-se observar ainda a reação entre soro de camundongos C57Bl/10 imunizado com uma enzima isolada do *T. cruzi* (fração F3.2) e lisados de epimastigotas, lisados de tripomastigotas e a fração F3.2 do parasita. Este soro reconheceu dois componentes distintos na fração enzimática F3.2, um deles com Mr de 45-50 KDa e outro situado entre 26-34 KDa. No lisado total de epimastigotas, os anticorpos presentes no soro imune anti-F3.2 detectaram apenas o componente de Mr 45-50 KDa. Os resultados obtidos com o lisado total de tripomastigotas, mostraram uma reatividade do soro anti-F3.2 com componentes de Mr de 47, 55, 65 e 72 KDa, respectivamente.

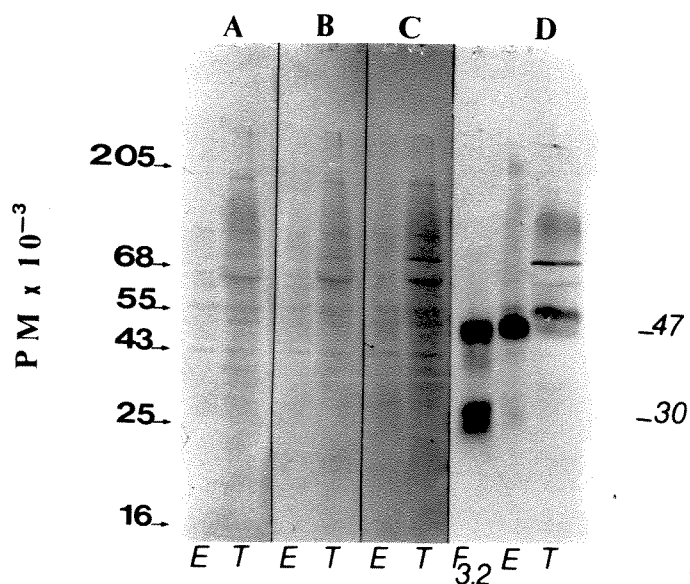


Figura 6 - Análise por "immunoblotting" de antígenos de *T. cruzi* lisados com CHAPS. Antígenos de tripomastigotas de cultura de células (T) e epimastigotas (E) revelados pelos anticorpos monoclonais anti-*T. cruzi* 5C5 (A), 5B5C1 (B) e 5B6H3 (C). Na parte D da figura, antígenos contidos na fração enzimática F3.2 e nos lisados do parasita (E e T) foram revelados com soro imune anti-F3.2. As setas indicam os padrões de PM.

DISCUSSÃO

Durante os estágios agudo e crônico das infecções humana e experimental com o *T. cruzi* são produzidos anticorpos contra as diferentes formas do ciclo de vida do parasita, detectados através de numerosos testes sorológicos (Kretzli, 1982). A intensidade dessas reações no entanto, varia de acordo com as características do hospedeiro, da cepa do parasita responsável pela infecção e dos testes realizados para a detecção da resposta imune ao *T. cruzi*.

No presente trabalho, a cinética de produção de anticorpos dirigidos às formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi* no curso da infecção de camundongos F1 (CBA x C57B1/10) com a cepa Y do parasita, foi acompanhada através de reações de IFI. Testes de proteção passiva para a detecção de anticorpos protetores, utilizando soros obtidos entre a sexta e nona semanas pós-infecção, foram também realizados.

Anticorpos anti-tripomastigotas foram detectados mais precocemente do que para os demais estágios do parasita. No decorrer da infecção foram observados dois platôs nos níveis de anticorpos anti-tripomastigotas. O primeiro entre a 5ª e a 12ª semanas pós-infecção, com o título estável de 1:80 e o segundo entre a 16ª e 24ª semanas pós-infecção, com o título de 1:320. Os títulos mais elevados de anticorpos no entanto, foram observados para as formas amastigotas do parasita (1:640), desde a quinta semana pós-infecção até o final da observação. Anticorpos contra as formas epimastigotas foram detectados nos soros imunes desde a terceira semana, sempre em títulos mais baixos (1:40) que para os demais estágios do parasita.

O papel desempenhado pelos anticorpos na resistência ao *T. cruzi* tem sido investigado por diversos autores. Culbertson e Kolodny (1938) e Kolodny (1940) apresentaram os primeiros resultados demonstrando a importância dos anticorpos na resistência à infecção pelo parasita. Nestes trabalhos, os autores verificaram que a transferência passiva de soro imune de animais que sobreviveram à fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* para animais normais induzia nos recipientes, desafiados com cepa virulenta do parasita, redução acentuada da parasitemia e da mortalidade. No entanto, soros imunes transferidos passivamente só tem efeito protetor se administrados antes do estabelecimento de infecção patente nos animais recipientes (Voller & Shaw, 1965; Loureiro, 1985). Vários autores tem demonstrado ainda diferenças na capacidade protetora de soros imunes anti-*T. cruzi* contra o desafio com cepas homólogas e heterólogas do parasita (Kretzli & Brener, 1976; McHardy, 1977) sugerindo diferenças no comportamento de estoques do *T. cruzi*.

Kierszenbaum e Howard (1976) mostraram que camundongos Biozzi bons respondedores (Ab/H) eram mais resistentes à infecção pelo *T. cruzi* que camundongos maus respondedores (Ab/L). A transferência passiva de soro imune de camundongos Ab/H para camundongos Ab/L, desafiados com o parasita, permitiu uma redução nas taxas de parasitemia e mortalidade dos animais susceptíveis. Os autores sugerem que a susceptibilidade dos camundongos Ab/L ao *T. cruzi* pode estar relacionada com a deficiência na produção de anticorpos que estes animais apresentam. Neste sentido, Britto (1988) verificou que linhagens de camundongos sensíveis (CBA) e resistentes (C57B1/10 e F1 (CBA x C57B1/10)) ao *T. cruzi*, apresentam diferenças significativas nos níveis dos vários isótipos de imunoglobulinas, no curso da infecção pelo parasita. Imunoglobu-

linas das subclasses IgG2a e IgG2b, descritas por Takehara e colaboradores (1981) e por Scott e Gross-Sampson (1984) como os componentes responsáveis pela proteção nos soros imunes anti-*T.cruzi*, foram encontrados em níveis mais elevados nos soros de fase crônica de camundongos resistentes ao *T.cruzi*.

No presente trabalho, verificou-se da mesma forma que Gavino (1985) e Britto (1988), que soros de camundongos F1 (CBA x C57Bl/10), obtidos a partir da 6ª semana pós-infecção, protegem o parental susceptível, camundongos CBA, de um desafio com a cepa Y do *T.cruzi*. A detecção de atividade protetora em soros de camundongos F1 infectados com o parasita foi por nós utilizada como critério para determinar o início da fase crônica da infecção chagásica nestes animais.

A despeito de terem sido encontrados títulos mais elevados de anticorpos contra as formas amastigotas do parasita nos soros de F1 cronicamente infectados, foi verificado no presente trabalho que apenas tripomastigotas sanguíneas ou de cultura de células, viáveis ou formolados, foram capazes de absorver os anticorpos protetores presentes nos soros imunes de F1. Estes resultados reforçam as sugestões feitas por outros autores (Zingales & Colli, 1985) de que estruturas específicas, ou pelo menos mais abundantes, das formas tripomastigotas são as responsáveis pela indução de anticorpos com atividade importante na fase crônica da infecção chagásica experimental e humana.

Outro aspecto observado no presente trabalho diz respeito à dose de soro a ser administrado para se obter proteção. Soros imunes diluídos (1:2) perderam seu efeito protetor, indicando que a proteção conferida pelos soros de fase crônica deve estar na dependência de concentrações equilibradas de anticorpos contra um conjunto de especificidades antigênicas.

Os fenômenos de ativação policlonal e imunossupressão observados na fase aguda da doença de Chagas experimental, parecem ser determinantes da qualidade da resposta imune ao parasita na fase crônica da infecção (Corsini & Stellini, 1981; Minoprio et al., 1986 a,b; Tarleton & Scott, 1987). Desta forma, a administração de uma dose-reforço nos camundongos F1 após a 6ª semana de infecção, não foi capaz de alterar, conforme esperado, o nível de anticorpos protetores produzidos por estes animais.

A despeito da complexidade do ciclo de vida do *T. cruzi* é possível obter os vários estágios do parasita relativamente livres de material do hospedeiro ou das células de linhagem onde são cultivados (Budzko & Kierszenbaum, 1974; Schmatz & Murray, 1981; Zanolli, 1986). Assim, preparações enriquecidas dos três estágios do parasita foram usadas para a identificação dos antígenos de superfície, marcados com iodo radioativo, reconhecidos pelos soros protetores obtidos de camundongos F1, através da técnica de imunoprecipitação (Kessler, 1974), seguida pela análise dos componentes precipitados, através de SDS-PAGE. Proteínas de 90-95, 75 e 50 KDa foram precipitadas por todos os soros imunes de F1 testados, nas três formas do ciclo evolutivo do parasita. Entre os estágios epimastigotas e amastigotas ocorreu a coincidência de reconhecimento de mais um componente de mesmo peso molecular, isto é o de 63-65 KDa. Componentes exclusivos de amastigotas, reconhecidos por soros de F1 na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, não puderam ser identificados por este método. O componente de superfície com peso molecular de 85 KDa foi detectado apenas em tripomastigotas. O complexo de proteínas com peso molecular entre 43-50 KDa também só pode ser detectado nas formas epimastigotas. Embora os soros imunes de F1 precipitem componentes com pesos moleculares idênticos nos três estágios

do parasita, estes antígenos devem conter determinantes antigênicos distintos pois os soros não puderam ser eficientemente absorvidos pelos antígenos heterólogos, exceção feita ao antígeno de 50 KDa (dados não mostrados).

Investigações sobre os antígenos do parasita reconhecidos por soros imunes anti-*T. cruzi* tem sido realizadas por diversos autores (Araújo & Remington, 1981; Zingales et al., 1982; Andrews et al., 1984; Martins et al., 1985; Grolg & Kuhn, 1985). Entretanto, não foi possível estabelecer um paralelismo entre os nossos resultados e aqueles relatados na literatura em função das diferenças de (i) metodologia de marcação, (ii) origem dos soros imunes e (iii) preparações antigênicas, utilizados por nós e pelos autores citados. Quando houve coincidência no tipo de preparação antigênica e/ou técnica de marcação dos antígenos de superfície houveram discrepâncias com relação à origem do antissoro, ou vice-versa. Com respeito a estes aspectos, os nossos resultados se assemelham mais aos obtidos por Martins e colaboradores (1985). Estes autores caracterizaram a reatividade de soros imunes derivados de camundongos cronicamente infectados frente aos estágios tripo e amastigotas do parasita, buscando comparar o reconhecimento de antígenos imunoprecipitados por soros com ou sem atividade lítica para tripomastigotas. O perfil dos antígenos imunoprecipitados por soros de fase crônica encontrado por Martins e colaboradores (1985) é muito semelhante ao encontrado no presente trabalho, exceto que os nossos soros, mesmo os líticos, não foram capazes de definir antígenos em tripomastigotas com pesos moleculares superiores a 95 KDa.

Outro ponto de concordância entre os nossos resultados e aqueles descritos na literatura diz respeito ao(s) antígeno(s) de 85 KDa de tripomastigotas. Conforme observado anteriormente por Zingales

e colaboradores (1982) e aqui constatado por nós, este componente parece ser exclusivo de tripomastigotas. Existem evidências mostrando que o antígeno detectado na região de 85 KDa se constitui na verdade de um conjunto de proteínas com mesmo peso molecular mas, pontos isoeletrônicos (pI) distintos (Andrews et al., 1984). Através de clonagem de gens de tripomastigotas, foram identificadas até o presente seis proteínas distintas, sem homologia de sequência, com peso molecular de 85 KDa, reconhecidas por soros de pacientes chagásicos crônicos (Frasch et al., 1987). A proteína de Mr 85 KDa e pI entre 6.3 e 7.5, denominada Tc 85, tem sido associada aos fenômenos de interiorização do parasita em células hospedeiras e anticorpos dirigidos contra este componente são capazes de bloquear a infecção dessas células pelo *T. cruzi* (Andrews et al., 1984; Zingales et al., 1985; Alves et al., 1986). Um receptor para fibronectina (Ouaisi et al., 1986 a,b), uma proteína de choque térmico (Dragon et al., 1987) e uma proteína com atividade de DAF (Dias de Silva et al., 1987) também foram associados a componentes de tripomastigotas com peso molecular de 85 KDa.

Os resultados discutidos até aqui expressam a cinética da resposta imune humoral específica de camundongos F1 (CBA x C57Bl/10) infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, os quais permitiram determinar a ocasião em que as células esplênicas destes animais poderiam ser utilizadas na fusão celular para a obtenção de anticorpos monoclonais, representativos da fase crônica da infecção. Desta forma, optamos pela coleta de células esplênicas de camundongos na sétima semana pós-infecção, que haviam ou não recebido uma dose-reforço constituída por tripomastigotas formolados, quatro dias antes da fusão. A dose-reforço foi mantida no esquema de imunização para a fusão por duas razões fundamentais: (1) porquê, conforme pudemos observar, a resposta imune dos

animais infectados não foi alterada significativamente pelo "booster" e (ii) devido ao fato de ser amplamente recomendada uma dose-reforço alguns dias antes da fusão para estimular a proliferação de linfoblastos específicos ao antígeno, os quais apresentam maior eficiência de fusão que os plasmócitos (Fasekas de St Groth & Scheideger, 1980; Kohler, 1981). Apesar do número reduzido de experimentos de hibridização realizados no presente trabalho, os resultados obtidos mostraram que células esplênicas coletadas de animais que receberam o "booster" foram mais eficientes no sentido de liberar híbridos secretores de anticorpos anti-**T.cruzi**.

Das 452 culturas lançadas após as duas fusões, 31 continham anticorpos que reagiram com tripomastigotas e/ou amastigotas por IFI. Ao longo dos subcultivos para congelamento e clonagem, apenas 19 culturas se mantiveram estáveis, secretando anticorpos monoclonais anti-**T.cruzi**. Os títulos de anticorpos encontrados nos sobrenadantes destes hibridomas foram sempre muito baixos (no máximo 1:8). As ascites produzidas também alcançaram títulos de no máximo 1:1000, por reações de IFI contra os antígenos do parasita, apesar de terem sido detectadas concentrações elevadas das subclasses de Ig dos anticorpos monoclonais, através de reações de imunodifusão radial.

As análises dos antígenos de superfície do **T.cruzi** reconhecidos por estes anticorpos monoclonais revelaram apenas duas especificidades antigênicas entre eles. Um grupo de anticorpos ligou um polipeptídeo duplo de 23-27 KDa de amastigotas enquanto que o outro grupo de anticorpos não se ligou a este componente. Por outro lado, todos os anticorpos monoclonais precipitantes se ligaram aos polipeptídeos de 50 KDa de amastigotas e de epimastigotas bem como aos componentes de 65 e 160 KDa de epimastigotas, indistintamente. Todos os anticorpos

que puderam ser testados por imunoprecipitação, revelaram o componente de 50 KDa de tripomastigotas.

A eliminação do parasita através dos anticorpos originados durante a fase crônica da infecção chagásica tem sido atribuída a uma série de fenômenos, dependentes (Kretzili et al., 1979; Kretzili & Brener, 1982) ou não da presença de complemento (Madeira et al., 1979; Okabe et al., 1980; Kierszenbaum et al., 1981; Kipnis et al., 1981a,b; Scott & Snary, 1982; Lages-Silva et al., 1983; Kierszenbaum et al., 1985; Lima Martins et al., 1985; Umekita et al., 1987). A lise de formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* por anticorpo e complemento (Kretzili et al., 1979; Kretzili & Brener, 1982) tem sido considerada como um mecanismo importante de controle do parasitismo na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*.

A atividade lítica de soros de fase crônica da infecção chagásica tem sido relacionada à presença de anticorpos dirigidos à proteína de 160 KDa de tripomastigotas sanguíneas (Martins et al., 1985) e às proteínas de 77, 82 e 88 KDa de tripomastigotas metacíclicos (Yoshida, 1986) do *T. cruzi*. Anticorpos monoclonais com atividade lítica sobre formas metacíclicas do parasita foram obtidos recentemente (Teixeira & Yoshida, 1986). Um desses monoclonais, denominado 1G7, lítico para as formas metacíclicas de 5 linhagens de *T. cruzi* entre as onze testadas, detectou a proteína de superfície de 90 KDa nesse estágio do parasita (Mortara et al., 1988).

No presente trabalho, foram obtidos quatro anticorpos monoclonais (1D8, 5B6, 5C3 e 5C4) com atividade lítica sobre tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*, apresentando índices que variaram entre 30 a 50% de lise. Soros de camundongos F1 cronicamente infectados lisaram 100% dos tripomastigotas presentes nas preparações.

Os anticorpos monoclonais 5B6 e 5C4 detectaram a proteína de superfície de 50 KDa das formas sanguíneas do **T.cruzi**, por imunoprecipitação (tabela VII).

A análise parcial dos parasitas observada após seu tratamento com os anticorpos monoclonais ora obtidos parece indicar que a população de tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do **T.cruzi** é heterogênea quanto a expressão de componentes da sua superfície. Neste sentido, Cavallesco e Pereira (1988) mostraram que apenas 30 a 40% dos tripomastigotas da cepa Y contidos em preparações do parasita derivados de cultura de células eram susceptíveis à lise por anticorpos específicos para a neuraminidase do **T.cruzi**. Estes autores observaram ainda que os tripomanosomas remanescentes do tratamento com o referido soro mais complemento eram destituídos de atividade de neuraminidase, caracterizando a existência de pelo menos duas populações de tripomastigotas na preparação utilizada. A atividade de neuraminidase de tripomastigotas foi detectada em proteína com peso molecular entre 160 e 200 KDa.

A atividade lítica de soros de camundongos F1 cronicamente infectados com o **T.cruzi** e dos anticorpos monoclonais aqui estudados, associada aos resultados encontrados nos experimentos de imunoprecipitação de componentes da superfície de tripomastigotas por esses reagentes, sugerem que outros antígenos além do de 160 KDa, particularmente o de 50 KDa, são também capazes de induzir anticorpos líticos para o estágio infectivo do parasita.

O anticorpo monoclonal 5B6, com atividade lítica sobre tripomastigotas, revelou por "immunoblotting", os componentes de 65 e 72 KDa em lisados deste estágio do parasita. Além desse anticorpo, os monoclonais 5C5 e 5B5C1, ainda não testados quanto a sua atividade lítica, também detectaram os mesmos componentes. Os demais anticorpos mo-

monoclonais testados não interagiram com qualquer componente de tripomastigotas por esta técnica.

Os polipeptídeos de 50, 55, 65 e 72 KDa de tripomastigotas foram os componentes principais deste estágio do parasita reconhecidos por soros de camundongos imunizados com uma protease do *T. cruzi*, denominada F3.2, isolada de epimastigotas por Rangel e colaboradores (1981 a). Nos lisados de epimastigotas, o soro anti-F3.2 detectou um único componente, com 45-50 KDa. Observações preliminares indicam que a imunização de camundongos C57Bl/10 com a enzima F3.2 resulta em proteção contra o desafio com a cepa Y do *T. cruzi* (Sakurada, comunicação pessoal). Entretanto, a transferência passiva dos anticorpos monoclonais anti-*T. cruzi* obtidos no presente trabalho, mesmo daqueles específicos para os componentes de 65 e 72 KDa de tripomastigotas, não resultou em proteção contra o desafio com cepa virulenta do parasita. Apesar de ter sido utilizada uma única dose de parasitas para o desafio nos experimentos de proteção por transferência passiva, estes resultados parecem indicar que várias especificidades são necessárias para se obter resultados positivos neste sistema.

RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve três objetivos principais: (i) estudar a resposta imune humoral específica de camundongos F1 (CBA xC57 B1/10) infectados com a cepa Y do *T.cruzi*, (ii) produzir anticorpos monoclonais anti-*T.cruzi*, através da tecnologia de hibridomas, utilizando-se para as fusões células de mieloma SP2/0 e células esplênicas de camundongos F1 cronicamente infectados com o parasita, (iii) caracterizar os anticorpos monoclonais obtidos quanto a sua reatividade para os antígenos expressos nos diferentes estágios do *T.cruzi*.

Para o primeiro objetivo, camundongos F1, resistentes à infecção pelo *T.cruzi*, foram infectados com 100 formas sanguícolas do parasita. Lotes destes animais foram sacrificados semanalmente para a obtenção de soro imune. A reatividade dos soros imunes contra antígenos dos três estágios do *T.cruzi* foi verificada através de testes de IFI. Anticorpos anti-tripomastigotas e anti-amastigotas foram detectados à partir da segunda semana pós-infecção. A reatividade com as formas epimastigotas foi observada à partir da terceira semana. No decurso da infecção foram encontrados títulos de anticorpos mais elevados para as formas amastigotas e tripomastigotas, respectivamente.

A presença de anticorpos protetores foi também investigada nos soros de camundongos F1 infectados. A detecção deste tipo de anticorpo foi utilizada como critério para determinar o estabelecimento da fase crônica da infecção chagásica nos animais infectados. Verificou-se desta forma que, à partir da sexta semana após a injeção do parasita, os camundongos F1 já se encontravam em fase crônica da infecção

chagásica, produzindo anticorpos capazes de proteger camundongos CBA, susceptíveis à infecção pelo *T.cruzi*, de um desafio com o parasita. Através de experimentos de absorção dos soros protetores, foi verificado que antígenos expressos pelo estágio tripomastigota eram os principais reponsáveis pela indução dos anticorpos protetores nos animais infectados. Através de experimentos de imunoprecipitação e análise por SDS-PAGE, o componente de superfície com Mr 85 KDa foi detectado pelos soros imunes de camundongos F1 exclusivamente em tripomastigotas. Os demais antígenos detectados neste estágio do parasita o foram também nas formas epi e amastigotas.

Na segunda etapa deste trabalho, células provenientes de camundongos F1 cronicamente infectados com a cepa Y do *T.cruzi* foram utilizadas nos experimentos de hibridização com células de mieloma SP2/0. Dezenove clones de hibridomas estáveis, secretando anticorpos monoclonais (AcMo) anti-*T.cruzi*, foram selecionados em dois experimentos de fusão, através de testes de IFI. Estes anticorpos reagiram com as formas tripomastigotas e/ou amastigotas do parasita. Apenas um AcMo reagiu com os três estágios do *T.cruzi* por IFI. Testes de imunodifusão dos sobrenadantes dos hibridomas anti-*T.cruzi*, realizados para caracterizar os isótipos dos AcMo, detectaram 2 IgM, 1 IgG1, 10 IgG2a, 4 IgG2b e 2 IgG3.

Onze anticorpos monoclonais tiveram sua reatividade aos antígenos do *T.cruzi* analisada no presente trabalho. Através de experimentos de imunoprecipitação verificou-se que, nove dos AcMo estudados reconheceram um epítipo presente nos antígenos de epimastigotas com Mr de 160, 65 e 50 KDa. Em amastigotas, os nove anticorpos precipitaram a proteína de 50 KDa e entre eles, apenas três anticorpos (5C4B11, 5B6 e 2C5D6) reagiram com a proteína dupla de 23-27 KDa deste estágio. Três

AcMo (5C5, 5B5C1 e 5B6) foram capazes de interagir com componentes de 65 e 72 KDa das formas tripomastigotas, por "immunoblotting".

Entre os hibridomas obtidos no presente trabalho, quatro clones distintos (1D8, 5B6, 5C3 e 5C4) secretaram anticorpos com atividade lítica sobre tripomastigotas sanguícolas, mediada por complemento. Índices de 30 a 50 % de lise foram observados nos testes com os anticorpos monoclonais, o que sugere a existência de subpopulações em preparações de tripomastigotas sanguícolas obtidas de camundongos infectados com a cepa Y do parasita.

Nenhum dos anticorpos monoclonais estudados apresentou resultado positivo nos testes de proteção passiva de animais susceptíveis, contra um desafio com 10^5 tripomastigotas sanguícolas do *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M.J.M., ABUIN, G., KUWAJIMA, V.Y. & COLLI, W. 1986. Partial inhibition of trypomastigote entry into culture mammalian cells by monoclonal antibodies against surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. Molec.Biochem.Parasitol. 21: 75-82.
- ANDREWS, N.W., KATZIN, A. & COLLI, W. 1984. Mapping surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity. Eur.J.Bioch. 140 : 599-604.
- ARAÚJO, F.G. & REMINGTON, J.S. 1981. Characterization of stages and strains of *Trypanosoma cruzi* by analysis of cell membrane components. J.Immunol. 127 (3): 855-859.
- ARAÚJO, F.G., SHARMA, S.D., TSAI, V., COX, P. & REMINGTON, J.S. 1982. Monoclonal antibodies to stages of *Trypanosoma cruzi* : characterization and use for antigen detection. Infect.Immun. 37: 344-349.
- ATTA, A.M., TAMASHIRO, W.M.S.C. & ATTA, M.L.S. 1987. Análise da antigenicidade dos componentes de uma fração obtida da superfície do *Trypanosoma cruzi*. Resumos do XII Congresso Brasileiro de Imunologia. pp.452.
- ATTA, A.M., TAMASHIRO, W.M.S.C. & SOUZA_ATTA, M.L. 1988. Detecção de anticorpos humanos e de camundongos anti-proteinase do *Trypanosoma cruzi*. Resumos do XIII Congresso Brasileiro de Imunologia. pp.391.

- ATTA, A.M., TAMASHIRO, W.M.S.C. & SOUZA_ATTA, M.L. 1988. Detection of human and mouse antibodies to **Trypanosoma cruzi** proteinase. (submetido à publicação).
- BEARD, C.A., WRIGHTSMAN, R.a. & MANNING, J.E. 1985. Identification of monoclonal antibodies against the trypomastigote stages of **Trypanosoma cruzi** by use of iminobiotinilated surface polypeptide. Mol.Bioch.Parasitol. 16: 199-212.
- BOYER, M.H., HOFF, R., KIPNIS, T.L., MURPHY, E.D. & ROTHS, J.B. 1983. **Trypanosoma cruzi**: Susceptibility in mice carrying mutant gene Ipr (lymphoproliferation). Paras.Immunol. 3: 135-142.
- BOYER, M.H. & JAFFE, C.L. 1984. Increased susceptibility to **Leishmania tropica** injection in autoimmune MRL/MpJ-Ipr mice. J. Parasitol. 70: 145-146.
- BRENER, Z. 1980. Immunity to **Trypanosoma cruzi**. Advances in Parasitology. 18: 247-292.
- BRENER, Z. 1987. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. Mem.Inst.Oswaldo Cruz. 82(Suppl.1): 205-212.
- BRITTO, M.H.S.S. 1988. Evolução da resposta imune humoral e caracterização de antígenos envolvidos na infecção experimental pelo **Trypanosoma cruzi**. Tese de Mestrado. Campinas. Universidade Estadual de Campinas.
- BUDZKO, D.B. & KIERSZENBAUM, F. 1974. Isolation of **Trypanosoma cruzi** from blood. J.Parasitol. 60 (6): 1037-1038.
- BURGESS, D.E. & HANSON, W.L. 1980. **Trypanosoma cruzi**. The T-cell dependence of the primary immune response and effects of depletion of T-cells and IgG-bearing cells on immunological memory. Cell. Immunol. 52: 176-186.

- CAMARGO, M.E. 1966. Fluorescent antibody test for diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 8: 217-234.
- CARDOSO, J.E. & BRENER, Z. 1980. Hematological changes in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 75: 97-104.
- CAVALLESCO, R. & PEREIRA, M.E.A. 1988. Antibody to *Trypanosoma cruzi* neuraminidase enhances infection "in vitro" and identifies a subpopulation of trypomastigotes. J. Immunol. 140: 617-625.
- CHAGAS, C. 1909. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida no homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1: 159-218.
- CHOA, D. & DUSANIC, D.G. 1985. Monoclonal antibodies to metacyclic stage antigens of *Trypanosoma cruzi*. Amer. J. Trop. Hyg. 34: 694-701.
- CLARK, H.F. & SHERPARD, C.C. 1963. A dialysis technique for preparing fluorescent antibody. Virology. 20: 642-644.
- CORSINI, A.C., COSTA, M.G., OLIVEIRA, O.L.P., CAMARGO, I.J.B. & STELLINI, A. 1980a. Susceptibility of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* strain Y. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 22 (4): 192-196.
- CORSINI, A.C., OLIVEIRA, O.L.P., CAMARGO, I.J.B. & RANGEL, H.A. 1980b. A fraction (FAd) from *Trypanosoma cruzi* epimastigote depress the immune response in mice. Immunol. 40: 505-511.
- CORSINI, A.C. & COSTA, M.G. 1981a. Immunossuppression in mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). I - Evidences of policlonal activation in experimental infections mimicked by an

extract prepared from circulating trypomastigotes. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 23 (3): 114-121.

CORSINI, A.C. & COSTA, M.G. 1981b. Immunossuppression in mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). II - Trypomastigote crude extract (TCE) suppress the humoral immune response in mice. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 23 (3): 122-123.

CORSINI, A.C. & STELLINI Jr., A. 1981c. Immune T-cells control *Trypanosoma cruzi* infection. Experientia. 37: 904-905.

CULBERTSON, J.T. & KOLODNY, M.H. 1983. Acquired immunity in rats against *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol. 24: 83-90.

DRAGON, E.A., SIAS, S.R., KATO, E.A. & GABE, J.D. 1987.. The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. Mol. Cell. Biol. 7: 1271-1275.

DIAS DA SILVA, W., KIPNIS, T., SHER, A. & JOINER, K. 1987. Functional analysis of the T-DAF like substances shedded by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Resumos da XIV Reunião anual sobre pesquisa básica em doença de Chagas. p. 139.

EY, P.L., PROWSE, S.J. & JENKIN, C.R. 1978. Isolation of pure IgG, IgG2a e IgG2b immunoglobulins from mouse serum using Protein-A Sepharose. Immunochemistry. 15: 429-436.

FASEKAS DE ST GROTH, S. & SCHEIDEGGER, D. 1980. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. J. Immunol. Meth. 35: 1-21.

FERNANDES, J.F. & CASTELLANI, O. 1966. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 18: 195-202.

- FLINT, J.E., SCHECHETER, M., CHAPMAN, M.D. & MILES, M.A. 1984. Zimodeme and species specificities of monoclonal antibodies raised against *Trypanosoma cruzi*. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 78: 193-202.
- FRAKER, J.F. & SPECK, J.C. 1978. Protein and cell membrane iodinations with sparaling soluble cloroamide 1,3,4,6-tetrachloro 3,6-difenylglycouril. Biochem.Biophys.Res.Comm. 80: 849-857.
- FRASCH, A.C.C., AFFRANCHINO, J.L., IBANES, C. MACINA, R.E., REIS, M.B., CAMARCO, M.E., ASLUND, L. & PETTERSON, U. 1987. Cloning of genes for antigenically relevant proteins of *Trypanosoma cruzi*. Mem.Inst.Oswaldo Cruz. 82 (Suppl.1): 238-251.
- GAVINO, V.A. 1985. Doença de Chagas - Atividade protetora dos soros de camundongos infectados com formas sanguícolas ou de cultura de tecido. Tese de Mestrado. Campinas. Universidade Estadual de Campinas.
- GROLG, M. & KHUN, R.E. 1985. Identification of antigens of *Trypanosoma cruzi* which induces antibodies during experimental Chagas' disease. J.Parasitol. 71 (2): 183-191.
- HANSON, W.L. 1977. Immune response and mechanisms of resistance in *Trypanosoma cruzi*. Pan American Health Organization Scientific Publication. 347: 23-34.
- HART, G., HAIDARIS, C.G. & SO, M. 1987. Purification and characterization of a neuraminidase, a developmentally regulated antigen of *Trypanosoma cruzi*. In: AGABIAN, N., GOODMAN, H. & NOGUEIRA, N., eds. Molecular strategies of parasitic invasion. New York, A.R.Liss. p.213-222.
- HARTREE, E.F. 1972. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal.Biochem 48: 422-427.

- JAFFE, C.L., BENNETT, E., GRIMALDI, G. & MC MAHON-PRATT, D. 1984. Production and characterization of species-specific monoclonal antibodies against *Leishmania donovani* for immunodiagnosis. J.Immunol. 113: 440-447.
- KESSLER, S.W. 1975. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. J.Immunol. 115: 1617-1624.
- KIERSZENBAUM, F. & HOWARD, J.C. 1976. Mechanisms against experimental *T.cruzi* infections: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Blozzi high and low responder mice. J.Immunol. 116: 1208-1211.
- KIERSZENBAUM, F., ACKERMAN, S.J. & GLEICH, G.H. 1981. Destruction of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* by eosinophil granule major basic protein. Amer.J.Trop.Med.Hyg. 30 (4): 775-779.
- KIERSZENBAUM, F., LIMA, M.F. & WIRTH, J.J. 1985. Effects of antiserum to *Trypanosoma cruzi* on the uptake and rate of killing of vector-borne, metacyclic forms of the parasites by macrophages. Int.J.Parasitol. 15: 409-413.
- KIPNIS, T.L., DAVID, J.R., ALPER, C.A., SHER, A. & DIAS DA SILVA, W. 1981a. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of the alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. Proc.Natl.Acad.Sci. 78: 602-605.
- KIPNIS, T.L., JAMES, S.L., SHER, A. & DAVID, J.R. 1981b. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. II. Antibody-dependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils or neutrophils. Am.J.Trop.Med.Hyg. 30 (1): 47-53.

- KOHLER, G. & MILSTEIN, C. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256: 495-497.
- KOHLER, G. 1981. The technique of hybridoma production. In: Immunological Methods. Vol. II. Academic Press: Inc. p.258-298.
- KOLODNY, M.H. 1940. Studies on age resistance to trypanosome infections. VII. The influence of age upon immunological response of rats to infection with *Trypanosoma cruzi*. Amer.J.Hyg. 31: 1-8.
- KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. 1976. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. J.Immunol. 116: 755-760.
- KRETTLI, A.U., WEISZ-CARRINGTON, P. & NUSSENZWEIG, R.S. 1979. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain-differences in susceptibility to complement mediated lysis. Clin.Exp.Immunol. 37: 416-423.
- KRETTLI, A.U. 1982. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* in experimental and human infections. Afr.J.Clin.Exp.Immunol. 3: 327-345.
- KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. 1982. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. J.Immunol. 128 (5): 2009-2012.
- KRETTLI, A.U. 1987. The ubiquitous nature of protective antigens in *T.cruzi* strains. Mem.Inst.Oswaldo Cruz. 82 (Suppl. I - Proceedings of XIV Annual meeting on basic research in Chagas' disease):137.
- LAEMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. Nature. 227: 680-685.
- LALONDE, R.G., ALI-KHAN, E. & TANOWITZ, H. 1985. *Trypanosoma cruzi*: Regulation of mitogenic responses during infection in genetically resistant and susceptible inbred mouse strains. Exp.Parasitol. 59: 33-43.

- LAGES-SILVA, E., KRETLI, A.U. & BRENER, Z. 1983. Effect of protective and non-protective antibodies in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* by mouse peritoneal macrophages. Resumos da X Reunião anual sobre pesquisa básica em doença de Chagas. p.1.35.
- LIBBY, P., ALROY, J. & PEREIRA, M.E.A. 1986. A neuraminidase from *Trypanosoma cruzi* removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells. J.Clin.Invest. 77: 127-135.
- LIMA-MARTINS, M.V.C., SANCHEZ, G.A., KRETLI, A.U. & BRENER, Z. 1985. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. Parasite Immunol. Z (4): 367-376.
- LOUREIRO, I.V.M. 1985. Evolução da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* em camundongos passivamente imunizados. Tese de Mestrado. Campinas. Universidade Estadual de Campinas.
- MADEIRA, E.D., DE ANDRADE, A.F.B., BUNN-MORENO, M.B. & BARCINSKY, M. 1979. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi*. Characterization of the effector cell from normal human blood. Infect. Immun. 25 (1): 34-38.
- MANCINI, G., CARBONARA, A.O. & HEREMANS, J.F. 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single Radial Immunodifusion. Immunochemistry. 2: 235-244.
- MARCH, S.C., PARIKH, I. & CUATRECASAS, P. 1974. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Anal.Biochem. 60: 149-152.
- MARTINS, S.M., HUDSON, L., KRETLI, A.U., CANÇADO, J.R. & BRENER, Z. 1985. Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. Clin.Exp.Immunol. 61: 343-350.

- MARTINS, S.M., KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. 1987. Production of anti-*Trypanosoma cruzi* monoclonal antibodies (MoAbs) for the definition and isolation of antigens involved in protection to infection. Mem.Inst.Oswaldo Cruz. 82 (Suppl.I - Proceedings of XIV Annual meeting on basic research in Chagas' disease). p.137.
- MC HARDY, N. 1977. Passive immunization of mice against *Trypanosoma cruzi* using convalescent mouse serum. Tropenmed.Parasit. 28: 195-201.
- MINOPRIO, P.M., EISEN, H., FORNI, L., D'IMPÉRIO-LIMA, M.R., JOSKOWICZ, M. & COUTINHO, A. 1986a. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. Scand.J.Immunol. 24: 661-668.
- MINOPRIO, P.M., COUTINHO, A., JOSKOWICZ, M., D'IMPÉRIO-LIMA, M.R. & EISEN, H. 1986b. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocyte. Scand.J.Immunol. 24: 669-679.
- MORTARA, R.A., ARAGUTH, M.F. & YOSHIDA, N. 1988. Reactivity of stage-specific monoclonal antibody 1G7 with metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* strains: lytic property and 90.000 mol.wt. surface antigen polymorfism. Parasite Immunology. 10: 369-378.
- NAKANE, P. & KAWAIOI, A. 1974. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. J.Histochem.Cytochem. 22: 1084-1091.
- NICKELL, S.P., HOFF, R. & BOYER, M.H. 1985. Susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in autoimmune strains of mice. Parasite Immunol. 5: 135-142.
- OKABE, K., KIPNIS, T.L., CALICH, V.L.G. & DIAS DA SILVA, W. 1980. Cell mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. I.

Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity to trypomastigote bloodstream forms. Immunopathology. 16: 344-353.

OUAISSI, M.A., CORNETTE, J., AFCHAIN, D., CAPRON, A., GRASS_MASSE, H. & TARTAR, A. 1986a. *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. Science. 234: 603-607.

OUAISSI, M.A., CORNETTE, J. & CAPRON, A. 1986b. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. Molec. Biochem. Parasitol. 19: 201-211.

OUCHTERLONY, O. 1958. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Prog. Allergy. 5: 1-78.

PEREIRA, M.E.A. 1983a. A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. Science. 219: 1444-1446.

PEREIRA, M.E.A. 1983b. A rapid and sensitive assay for neuraminidase using peanut lectin hemagglutination: application to *Vibrio cholerae* and *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. Meth. 63: 25-34.

PEREIRA, M.E.A. & HOFF, R. 1986. Heterogeneous distribution of neuraminidase activity in strains and clones of *Trypanosoma cruzi* and its possible association with parasite myotropism. Molec. Biochem. Parasitol. 20: 183-189.

PERRIN, L.H., RAMIREZ, E., ER-HSIANG, L. & LAMBERT, P.H. 1980. *Plasmodium falciparum*: characterization of defined antigens by monoclonal antibodies. Clin. Exp. Immunol. 41: 91-96.

PERRIN., L.H., RAMIREZ, E., LAMBERT, P.H. & MIESCHER, P.A. 1981. Inhibition of *P. falciparum* growth in humans erythrocytes by monoclonal antibodies. Nature. 289 (22): 301-304.

- POTOCNJAK, P., YOSHIDA, N., NUSSENZWEIG, R.S. & NUSSENZWEIG, V. 1980. Monovalent fragment (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect against malarial infection. J.Exp.Med. 51: 1504-1513.
- RANGEL, H.A., ARAÚJO, P.M.F., REPKA, D. & COSTA, M.G. 1981a. **Trypanosoma cruzi**: Isolation and characterization of a proteinase. Exp.Parasitol. 52: 199-209.
- RANGEL, H.A., ARAÚJO, P.M.F., CAMARGO, I.J.B., BONFITO, M., REPKA, D., SAKURADA, J.K. & ATTA, A.M. 1981b. Detection of a proteinase common to epimastigote, trypomastigote and amastigote of different strains of **Trypanosoma cruzi**. Tropenmed.Parasit. 32 (2): 87-92.
- REPKA, D., CAMARGO, I.J.B., SANTANA, E.M., CUNHA, W.M., SAKURADA, J.K. & RANGEL, H.A. 1980. Surface antigenic determinant of epimastigote forms common to trypomastigote and amastigote forms of different strains of **Trypanosoma cruzi**. Tropenmed.Parasit. 31 (2): 239-246.
- REPKA, D., GAVINO, V.A., ATTA, A.M. & RANGEL, H.A. 1982. Protective antibodies in experimental Chagas' disease. Resumos da IX Reunião anual sobre pesquisa básica em doença de Chagas. p.74.
- ROBERSON, E.L. & HANSON, W.L. 1974. Transfer of immunity to **T. cruzi**. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg. 68: 338-
- SCHMATZ, D.M. & MURRAY, P.K. 1981. **Trypanosoma cruzi**: Selective isolation of pure trypomastigotes from cultured muscle cells. J. Parasitol. 67 (4): 517-521.
- SCHMUNIS, G.A., GONZALEZ-CAPPA, S.M., TRAVERSA, O.C. & JANOVISKY, J.F. 1971. The effect of immuno depression due to neonatal tymectomy on infections with **Trypanosoma cruzi** in mice. Trans.Roy. Soc.Trop.Med.Hyg. 65: 89-94.

- SCHULMAN, M., WILDE, C.D, & KOHLER, G. 1978. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. Nature. 276: 269-270.
- SCOTT, M.T. & SNARY, D. 1982. American trypanosomiasis (Chagas' disease). In: COHEN, S. & WARREN, K.S., eds. Immunology of parasitic infections. London, Blackwell Scientific Publications. p.261-298.
- SCOTT, M.T. & GROSS-SAMPSON, M. 1984. Restricted IgG isotype profiles in *T.cruzi* infected mice and Chagas' disease patients. Clin.Exp.Immunol. 58: 372-379.
- SETHY, K.K. & BRANDIS, H. 1981. Generation of hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies against *Toxoplasma gondii* or rabbiés virus following fusion of an "in vitro"-immunized spleen cells with mieloma cells. Ann.Immunol. (Inst.Pasteur). 123C: 29-41.
- SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin.Biol. 20: 191-207.
- SNARY, D., FERGUSON, M.A.J., SCOTT, M.T. & ALLEN, A.K. 1981. Cell surface antigens of *T.cruzi*: Use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. Mol.Bioch.Parasitol. 3: 343-356.
- SNARY, D. 1985. Receptors and recognition mechanisms of *Trypanosoma cruzi*. Trans.Roy.Soc.Med.Hyg. 79: 587-590.
- STELLINI Jr, A. 1986. Resistência à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909): A importância da resposta celular na fase aguda da infecção experimental em camundongos. Tese de Mestrado. Campinas. Universidade Estadual de Campinas.

- TACHIBANA, H., NAKAGURA, K. & KANEDA, Y. 1986a. Species-specific monoclonal antibodies for a membrane antigen(s) in all developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. Z.Parasitenkd. 72: 433-441.
- TACHIBANA, H., MONTENEGRO, L.T., KUHIIHARA, K., NAKAGURA, K., KANEDA, Y. & KOMATSU, N. 1986b. Localization of *Trypanosoma cruzi*-specific Mr25,000 antigen by immune electron microscopy using monoclonal antibodies. Z.Parasitenkd. 72: 701-707.
- TACKACS, B. 1979. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide slab gels. In: Immunological Methods. Academic Press. Inc. p.81-105.
- TAKEHARA, H.A., PERINI, A., SILVA, M.H. & MOTTA, I. 1981. *Trypanosoma cruzi*: Role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. Exp.Parasitol. 52: 137-
- TAMASHIRO, W.M.S.C., REPKA, D., SAKURADA, J.K., CAMARGO, I.J.B., ARAÚJO, P.M.F., ATTA, A.M. & RANGEL, H.A. 1983. *Trypanosoma cruzi*: Surface antigenic determinants. Z.Parasitenkd. 69: 425-434.
- TANOWITZ, H., MINATO, N., LALONDE, R. & WITTNER, M. 1981. *Trypanosoma cruzi*: Correlation of resistance and susceptibility in infected mice with the "in vitro" primary antibody response to sheep red blood cells. Exp.Parasitol. 52: 233-242.
- TARLETON, R. & SCOTT, D. 1987. Initial induction of immunity, followed by suppression of response to parasite antigens during *Trypanosoma cruzi* infection of mice. Parasit.Immunol. 8: 579-589.
- TEIXEIRA, M.M.G. & YOSHIDA, N. 1986. Stage-specific antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. Molec.Biochem.Parasitol. 18: 271-280.

- TITO, E.H. & ARAÚJO, F.G. 1987. Mechanism of cell invasion by *Trypanosoma cruzi* importance of sialidase activity. Acta Tropica. 44 (3): 273-282.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc.Natl.Acad.Sci. 76 (9) 4350-4354.
- 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. Exp.Parasitol. 45: 160-168.
- TRISCHMANN, T. & BLOOM, B. 1982. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. Infection and Immunity. 35: 546-551.
- UMEKITA, L.F., TAKEHARA, H.A. & MOTA, I. 1988. Role of the antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. Immunol. Letters. 17: 85-89.
- VOLLER, A. & SHAW, J.J. 1965. Immunological observations on an antiserum to *Trypanosoma cruzi*. Tropenmed.Parasitol. 16: 181-187.
- WRIGHTSMAN, R.A., LEON, W. & MANNING, J.E. 1986. Variation in antigenic determinants specific to the infective stage of *Trypanosoma cruzi*. Infection and Immunity. 53 (2): 235-239.
- YOSHIDA, N., NUSSENZWEIG, R.S., POTOENJACK, P., NUSSENZWEIG, V. & AIKAWA, M. 1980. Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. Science. 204 (4): 71-73.
- YOSHIDA, N. 1986. *Trypanosoma cruzi*: Recognition of trypomastigote surface antigens by lytic antisera from mice resistant to acute infection. Exp.Parasitol. 61: 184-191.

- ZANOLLI, E., FERREIRA, H.H.A., CUNHA-TAMASHIRO, W.M.S., SAKURADA, J.K. & RANGEL, H.A. 1985. Specific inhibition of *T.cruzi* neuraminidase activity by mouse serum. Brasilian J.Med.Biol.Res. 18 (5-6): 600.
- ZANOLLI, E. 1986. Neuraminidase de *T.cruzi*: Detecção da atividade em extratos de formas tripomastigotas e inibição por soros de camundongos infectados. Tese de Mestrado. Campinas. Universidade Estadual de Campinas.
- ZINGALES, B., ANDREWS, N.W., KUWAJIMA, V.Y. & COLLI, W. 1982. Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: Possible correlation with interiorization process in mammalian cells. Mol.Biochem.Parasitol. 6: 111-124.
- ZINGALES, B. & COLLI, W. 1985. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with host cells. Cur.Top.Microb.and Immunol. 117: 129-152.