

CARMELINDA SCHMIDT UNTERKIRCHER

ANTICORPOS NATURAIS E INFECÇÃO
ANTICORPOS NATURAIS NA DOENÇA DE CHAGAS
E NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP, para concurso de Livre - Docência na Disciplina de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Patologia.

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

1993



Ao meu marido José Luiz e aos meus filhos

Guilherme e Luiz Gustavo

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Stratis Avrameas, chefe da unidade de Imunocitoquímica, do Instituto Pasteur, pelo carinho com que me recebeu em seu laboratório.

Ao prof. Dr. Luis Rodolpho Travassos, Professor titular do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina pelas sugestões e revisão crítica deste trabalho.

Ao prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, Professor adjunto do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina, pelo auxílio e apoio técnico e científico que permitiram a realização deste trabalho.

À direção desta Faculdade na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Rogério Lacaz Neto pelo apoio e incentivo que tem dado às disciplinas básicas.

Aos colegas do departamento de Patologia desta faculdade pelo incentivo e, em especial, à profa. Dra. Elizabeth de Moraes pela atenção em revisar a redação final desta tese.

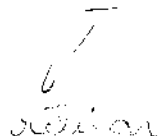
As secretárias do departamento de Patologia pelo auxílio prestado no trabalho de datilografia.

As bibliotecárias Leila Novaes, Zélia S. I. Borgest e demais funcionários da biblioteca, pela solicitude com que sempre me atenderam.

Trabalho desenvolvido no laboratório de
Imunocitoquímica do Instituto Pasteur,
dirigido pelo prof. Dr. Stratis Avrameas e
na Faculdade de Odontologia de São José
dos Campos (UNESP) com apoio financeiro
da FAPESP e FUNDUNESP.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
3	PROPOSIÇÃO	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1	População estudada	26
	4.1.1 Indivíduos infectados pelo <i>T. cruzi</i>	26
	4.1.2 Pacientes com Paracoccidioidomicose	26
	4.1.3 Grupo controle	
4.2	Concentração sérica de IgG nos grupos em estudo	27
4.3	Antígenos Utilizados	27
	4.3.1 Antígeno de <i>T. cruzi</i>	27
	4.3.2 Antígeno citoplasmático de <i>P. brasiliensis</i>	27
	4.3.3 Auto-antígenos	28
	4.3.4 Purificação do polipeptídeo de 62 kDa	29
	4.3.5 Conjugados TNP-OVA e FC-BSA	29
4.4	Concentração dos antígenos para sensibilização das placas	30
4.5	Conjugados	30
4.6	Determinação de anticorpos antiGal utilizando eritrócitos de coelho	30
4.7	Técnica de ELISA	31



4.7.1	Determinação das subclasses de IgG	32
4.8	Purificação de anticorpos antiGal em Proteína-A-Sepharose	32
4.9	Purificação de anticorpos antiGal em DNA-Sepharose	33
4.10	Isolamento de imunocomplexos	34
4.11	SDS-PAGE	35
4.12	Western-Blotting	36
4.13	Dosagem Bioquímica	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Expressão dos resultados	39
5.2	Anticorpos naturais em indivíduos infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
5.3	Anticorpos naturais na Paracoccidioidomicose	44
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÕES	94
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
	RESUMO	123
	ABSTRACT	125

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
AgC	Antígeno citoplasmático
AR	Artrite reumatóide
BME	β -mercaptoetanol
BSA	Soro albumina bovina
CDR2	Região determinante de complementariedade 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de dupla fita
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	"Enzyme-linked immunosorbent assay"
ETA-1	"Early T lymphocyte activator 1"
FC-BSA	Fosforilcolina conjugada a soro albumina bovina
FR3	Região do "framework" 3
gp43	Glicoproteína de 43,000 daltons
ICC	Imunocomplexo circulante
IDR	Região determinante de idiótipo
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
kDa	Quilodaltos
LES	Lupus eritematoso sistêmico
NaCl	Cloreto de sódio
NP40	Nonidet P40 (detergente não iônico)

ONPG	Orto-nitrofenil- β -D- galactopiranosídeo
OPD	Orto-fenilenodiamino
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBS-G	PBS acrescido de gelatina
PBS-NP40	PBS acrescido de Nonidet P40
PBS-T-G	PBS acrescido de Tween20 e gelatina
PCM	Paracoccidiodomicose
PEG	Poli(etil)enoglicol 6000
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonil
SCH	Soros chagásicos
SDS	Lauril sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em poliacrilamida com lauril sulfato de sódio
SHN	Soro humano normal
ssDNA	Acido desoxirribonucleico de fita simples
T15	Idiótipo de um anticorpo antifosforilcolina
TCA	Acido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamino
TNP-OVA	Conjugado trinitrofenil + ovoalbumina
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
VH	Região variável da cadeia pesada
WGA	Aglutinina de germe de trigo

1 INTRODUÇÃO

Este trabalho tem por objetivo analisar as variações no nível dos anticorpos naturais na doença de Chagas e na Paracoccidioidomicose.

A doença de Chagas é um importante problema de saúde pública na América do Sul e Central, calculando-se em 20 milhões o número de indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* (Kierzenbaum⁷⁰ 1986). O estudo desta doença mostrou que pelo menos 10% dos indivíduos infectados desenvolvem um quadro crônico caracterizado por alterações inflamatórias e fibróticas do miocárdio, esôfago e cólon (Petry & Eisen¹⁰² 1989). Todavia, acredita-se que um exame mais cuidadoso poderá revelar diferentes graus de anormalidade eletrocardiográfica em indivíduos infectados e sem sintomas clínicos (Carrasco et al. ²⁹ 1982).

A patogênese das manifestações tardias, ainda não é bem compreendida, e a autoimunidade foi sugerida para explicar o achado de lesões em locais, onde o parasita não é prontamente observado (Hudson⁵⁹ 1985). Entretanto, esta hipótese não é totalmente aceita (Kierzenbaum⁷⁰ 1986).

Estudos sobre a participação de linfócitos citotóxicos na patogênese das lesões cardíacas foram realizados já na década de 70. Naquela época, no entanto, os experimentos foram feitos num sistema alogênico (Teixeira et al.¹²⁵ 1978). Assim, as respostas observadas podem ter sido devidas a antígenos de histocompatibilidade.

Recentemente, utilizando um sistema singênico, (Mortatti et al.⁹² 1990) analisaram a ligação de células T citotóxicas e de macrófagos a tecido cardíaco de camundongos infectados. Os resultados deste trabalho mostraram que, além do infiltrado celular ser escasso, os linfócitos presentes não eram específicos para *T. cruzi*.

A presença de auto-anticorpos no soro de pacientes chagásicos foi descrita há alguns anos (Cossio et al.³³ 1974) e desde então, vários estudos foram realizados (Khoury et al.⁶⁹ 1979; Szafrman et al.¹²⁴ 1982). A partir daí, tentou-se identificar antígenos de reação cruzada entre os tecidos humanos e o parasita. Estas investigações levaram à caracterização de um anticorpo monoclonal (CE5), que reagia com tecido nervoso e com *T. cruzi* (Wood et al.¹⁴¹ 1982). Segundo Van Voorhis & Eisen¹³⁶ (1989), tripomastigotas de *T. cruzi* possuem uma glicoproteína de superfície de 160 kDa, que mimetiza uma proteína de 48 kDa presente em axônios de nervos periféricos e no plexo mesentérico. O epítipo de reação cruzada foi identificado por Van Voorhis et al.¹³⁷ (1991) como um peptídeo de doze aminoácidos.

Nos últimos anos o grupo de Travassos tem desenvolvido estudos sobre os anticorpos anti- α -galactosil na doença de Chagas. Estes anticorpos, descritos inicialmente como antilaminina de camundongo por Szafrman et al.¹²⁴ (1982) são específicos para estruturas terminais Gal α 1,3Gal, presentes nas cadeias oligossacarídicas daquela glicoproteína

(Towbin et al.¹³⁰ 1987). Anticorpos antiGal são considerados naturais e estão presentes principalmente na fração IgG do soro humano normal. Segundo Galili et al.⁴⁷ (1984); Galili et al.⁴⁸ (1985) estes anticorpos estão envolvidos no mecanismo de remoção de eritrócitos senescentes da circulação, sendo seu nível modulado pelo estímulo constante exercido por microrganismos da microbiota intestinal. Níveis aumentados de anticorpos antiGal foram encontrados nas infecções causadas por estreptococos, na artrite reumatóide juvenil (Avila et al.¹⁰ 1987), nas infecções devidas a parasitas da família kinetoplastidea (Avila et al.¹¹ 1984; Avila et al.^{8,9} 1988a, 1988b) e na malária causada pelo *Plasmodium falciparum* (Winograd et al.¹⁴⁰ 1987; Ravidran et al.¹⁰⁵ 1988).

Travassos et al.¹³¹ (1988) e Almeida et al.² (1991) mostraram de forma conclusiva que os anticorpos antiGal da fase crônica têm ação lítica sobre as formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, envolvendo um mecanismo dependente da via alternativa do complemento. Recentemente, Gazzinelli et al.⁵⁰ (1991) verificaram que anticorpos antiGal gerados durante a fase aguda da infecção chagásica, lisam diretamente as formas sanguíneas de *T. cruzi*, por um mecanismo independente das vias clássica e alternativa do Complemento. Estes achados, sugerem um papel potencial para os anticorpos antiGal na imunoterapia da infecção chagásica.

Towbin et al.¹³⁰ (1987) observaram uma expressão anômala de epitopos Gal α 1,3Gal, em processos inflamatórios e tumorais. Este fenômeno poderia, também, estar associado a processos de natureza auto-imune.

A PCM é outra doença tropical de ocorrência frequente na América Latina. É causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* e tem um caráter granulomatoso crônico (San Blas¹¹³ (1985). No homem observa-se uma grande variedade de quadros clínicos, que vão desde a forma pulmonar localizada até a doença disseminada em indivíduos jovens. Esta micose profunda acomete principalmente trabalhadores rurais, que estão em íntimo contato com a forma saprofítica do fungo (Restrepo¹⁰⁷ 1978). Nestas regiões apenas uma pequena porcentagem de indivíduos infectados desenvolve a doença, que pode ser considerada como resultado da reativação de uma lesão quiescente (Franco et al.⁴⁶ 1989).

Os fatores que determinam a suscetibilidade a PCM ainda são desconhecidos, todavia a heterogeneidade biológica das cepas de *P. brasiliensis* pode contribuir para a variedade de quadros clínicos observados (Kashino et al.⁶⁵ 1985).

Pacientes com PCM apresentam graus variáveis de depressão da resposta imune celular e sua mensuração permite classificar o doente entre dois polos da doença: as formas hiperérgicas, com resposta imune celular conservada e as formas anérgicas, onde a resposta imune celular está

seriamente comprometida e o prognóstico é desfavorável (Musatti et al.⁹⁴ 1976).

A resposta imune humoral não está seriamente comprometida na PCM e altos níveis de anticorpos específicos podem ser detectados por diferentes técnicas sorológicas (Siqueira¹²¹ 1982; Camargo et al.^{25,26, 27} 1988,1989,1991).

Bem caracterizados são os anticorpos da classe IgG para a gp43, um antígeno imunodominante do *P. brasiliensis*, presentes em 100% dos soros de pacientes com a doença ativa (Puccia et al.¹⁰⁴ 1986; Puccia & Travassos¹⁰³ 1991).

Outras características da resposta imune humoral na PCM incluem a presença de imunocomplexos circulantes (Arango et al.⁵ 1982; Chequer-Bou-Habib et al.³¹ 1989) e a hiperprodução de IgE (Arango & Yarzabal⁶ 1982). Não obstante, o conhecimento sobre a resposta imune humoral nesta doença ainda é incompleto.

2 REVISÃO DA LITERATURA
Anticorpos naturais

Os anticorpos naturais foram descritos, pela primeira vez, por Landsteiner⁷³ (1947) que no início deste século descobriu, no soro humano, anticorpos dirigidos contra antígenos de eritrócitos, com os quais o indivíduo não tinha tido nenhum contato anterior. Estes antígenos, de natureza sacarídica foram denominados substâncias de grupo sanguíneo A e B e os anticorpos dirigidos contra estas substâncias de hemaglutininas naturais. Os experimentos de Landsteiner mostraram que indivíduos que apresentavam o antígeno A, em seus eritrócitos, tinham anticorpos séricos antiB e que indivíduos portadores de antígeno B sintetizavam anticorpos antiA.

Em 1955, Jerne⁶⁰ volta a discutir a presença destas globulinas séricas e propõe a existência no soro de anticorpos dirigidos a todos os antígenos para os quais o indivíduo possa responder. De acordo com Jerne o papel do antígeno seria o de selecionar seu anticorpo específico e, posteriormente, induzir sua síntese. Anticorpos dirigidos para componentes próprios seriam removidos após ligação com os auto-antígenos.

Assim, a possibilidade de responder contra constituintes próprios foi considerada por muito tempo como um evento perigoso e, associada a certos estados patológicos (doenças auto-imunes). Estes conceitos eram, em parte, reforçados pelos trabalhos pioneiros de Ehrlich⁴³ (1900) que, trabalhando com cabras, observou que estes animais não eram capazes de responder às suas próprias hemácias, o que

denominou de *Horror autotoxicus*. Mais tarde, Burnet²³ (1959), em sua teoria da seleção clonal, postula que clones celulares capazes de responder contra antígenos próprios seriam eliminados no timo, durante a ontogenia.

No decorrer dos últimos anos, tornou-se claro, que a auto-reatividade é um fenômeno imunológico normal. Descobriu-se que o reconhecimento de antígenos estranhos pelo receptor de células T implica num reconhecimento simultâneo de antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (antígenos de classe I e II). Desta forma, a auto-reatividade passou a ser considerada como parte integrante dos mecanismos de regulação do sistema imune (Shoenfeld & Isenberg ¹¹⁹ 1989)

Em 1981, o grupo de Avrameas¹³ começa a investigar de forma sistemática a presença de auto-anticorpos em soros humanos normais. São detectados anticorpos das classes IgG, IgA e IgM, para várias proteínas, estruturalmente bem conservadas, durante a evolução tais como: actina, miosina, tubulina e mioglobina; e também, contra proteínas plasmáticas como: albumina, fetuina, tireoglobulina e transferrina. Prosseguindo estes estudos, Guilbert et al.⁵² (1982) purificaram anticorpos sobre imunoadsorventes preparados com esses antígenos. Foram analisadas três amostras de soros individuais e um "pool" de 800 soros de doadores de sangue. Os anticorpos isolados foram estudados por técnicas imunoenzimáticas do tipo competitivo e não

competitivo e classificados em três categorias. O primeiro grupo era constituído por anticorpos antitubulina e antitireoglobulina, inibidos somente pelos antígenos homólogos; o segundo grupo, representado pelos anticorpos antiactina era inibido por actina e por dois ou tres antígenos adicionais. E finalmente, o terceiro grupo, compreendendo os anticorpos antialbumina, não era inibido pelos antígenos homólogos. Estes achados sugeriam a existência de uma população de anticorpos com características especiais - os anticorpos polirreativos, denominados "anticorpos naturais e/ou auto-anticorpos naturais". A existência destes anticorpos foi posteriormente confirmada pelo estudo de 62 imunoglobulinas monoclonais humanas de pacientes com gamopatias, onde se observou uma alta incidência de anticorpos monoclonais reativos com diferentes antígenos e vários constituintes celulares (Dighiero et al.⁴⁰ 1982). Continuando nesta mesma linha de investigação Avrameas et al.¹⁵ (1983) examinaram 600 imunoglobulinas monoclonais humanas de indivíduos com doenças imunoproliferativas, demonstrando que 5% desses anticorpos tinham características similares às dos auto-anticorpos naturais. Resultados semelhantes, foram obtidos *in vitro*, pelo estudo de linfócitos imortalizados pelo vírus de Epstein-Baar (Seigneurin et al.¹¹⁷ 1988). Linfócitos de indivíduos normais e de doentes secretavam quantidades substanciais de anticorpos monoclonais naturais. Utilizando técnica

imunocitoquímica, os autores demonstraram que estes anticorpos reagem com diferentes tecidos, tais como: mucosa gástrica, pituitária anterior e ilhotas do pâncreas.

Nos últimos anos, importantes informações foram obtidas com a utilização de modelos murinos. A pesquisa de anticorpos naturais em camundongos confirmou as observações iniciais realizadas no homem e sugeriu um papel para estas imunoglobulinas nos mecanismos de regulação do sistema imune. Dighiero et al.⁴² (1983) prepararam hibridomas a partir de esplenócitos de camundongos Balb/c adultos, não imunizados, e observaram que os híbridos secretavam anticorpos polirreativos da classe IgM. Cento e sessenta e um híbridos foram analisados e dois destes propagados. Os dois anticorpos monoclonais resultantes eram dirigidos um para DNA nativo e o outro reagia com diferentes moléculas estruturalmente não relacionadas, como: miosina, actina, tubulina, espectrina e DNA.

Resultados similares foram obtidos com híbridos preparados de Balb/c imunizados com vários antígenos, em adjuvante de Freund completo (Guilbert et al.⁵³ 1985). Dois a 5% dos híbridos secretavam anticorpos monoclonais, reativos com dois ou mais antígenos. Todos os anticorpos analisados pertenciam à classe IgM e possuíam cadeia leve do isotipo K. Análise posterior de camundongos recém-nascidos indicou uma alta proporção de células B, sintetizando anticorpos naturais (20%), sugerindo que o reconhecimento de

componentes próprios seja uma função primária do sistema imune, em fases precoces do desenvolvimento. Dighiero et al.⁴¹ (1985) confirmaram estes achados e, Mahana et al.^{85,86} (1989) demonstraram que camundongos neonatos respondem mais facilmente à imunização com antígenos próprios.

Outros estudos mostraram a síntese de anticorpos naturais por linfócitos de camundongos nus, "germ-free" (Underwood et al.¹³³ 1985) e mesmo por animais "antigen-free" (Pereira et al. ¹⁰¹ 1986).

Os anticorpos trazem, ao nível de sua região variável, determinantes antigênicos chamados idiótipos, cuja estrutura é codificada pelos genes das regiões variáveis das imunoglobulinas. Os idiótipos são portanto marcadores fenotípicos dos genes V (Hahn et al.⁵⁴ 1987). Nos últimos anos, o estudo dos determinantes idiotípicos dos anticorpos tem despertado grande interesse, pela sua relevância nos mecanismos de regulação do sistema imune e por constituir a primeira linha de investigação sobre a origem genética de um anticorpo (Jerne⁶¹ 1974).

Com o objetivo de conhecer os idiótipos encontrados em anticorpos naturais, Lymberi et al.⁸³ (1985) prepararam soros antiidiotípicos contra dois anticorpos monoclonais murinos, poliespecíficos, da classe IgM (D23 e E7). Os soros antiidiotípicos foram utilizados para analisar 12 imunoglobulinas, de Balb/c neonatos e adultos, com atividade

de auto-anticorpo natural. Oito anticorpos foram reconhecidos por antiD23 e 5 por antiE7. A reação idiótipo-antiidiótipo era inibida pelo antígeno, sugerindo uma ligação dentro do sítio combinatório. Entretanto, a reação entre antiD23 e anticorpos antimiosina induzidos não era inibida por miosina, o que sugeria uma ligação fora do sítio combinatório.

Recentemente, Baccala et al.¹⁶ (1989) estudaram a sequência nucleotídica das regiões variáveis e constantes das cadeias pesadas e leves dos anticorpos D23 e E7. A análise mostrou que estes anticorpos originavam-se da linhagem germinativa, como sugerido pela alta homologia com genes VH não rearranjados. Comparando-se o gene VH 1210.7 ao gene do anticorpo E7, existia uma única diferença de nucleotídeo na posição 15, levando a uma mutação silenciosa. Já o anticorpo D23 parecia ser codificado por VH 101, com uma única diferença de nucleotídeo, causando a substituição de serina 84 por alanina. Assim, a alta frequência dos idiótipos D23 e E7 em anticorpos naturais sugere uma origem, em genes da linhagem germinativa.

Ultimamente, acumularam-se evidências de que os anticorpos codificados pelos genes da linhagem germinativa têm a possibilidade de autocomplexar (Kaveri et al.⁶⁷ 1990). Este fenômeno observado com os anticorpos antifosforilcolina da família T15/S107, deve-se ao reconhecimento de uma sequência conservada na região variável da cadeia pesada destes anticorpos (CDR2/FR3). Este peptídeo T15H(50-70)

e/ou o hapteno fosforilcolina podem inibir a autoligação (formação de complexos anticorpo-anticorpo). O peptídeo T15H é um IDR e parece estar envolvido na regulação da resposta imune a certos organismos patogênicos. No soro humano, já foram identificados anticorpos para este peptídeo, porém ainda não se conhece sua especificidade em termos de antígeno.

Os anticorpos poliespecíficos são sintetizados pela subpopulação de células B, que trazem o antígeno de superfície de células T CD5, células B CD5+ (Casali & Notkins³⁰ 1989). As células B CD5+ compõem o repertório normal de células B e são abundantes no baço fetal (Antin et al.⁴ 1986) e no sangue do cordão umbelical (Hardy et al.⁵⁶ 1987). Embora estas células sintetizem quase exclusivamente IgM, trabalho de Nawata et al.⁹⁵ (1990) sugere que possa ocorrer síntese limitada de outras classes de anticorpos, especialmente de IgA ao nível do trato intestinal. Células B CD5+ estão amplamente distribuídas na mucosa intestinal e na cavidade peritonial, onde participam, juntamente com células T com receptores do tipo γ/δ , do mecanismo de imunidade natural (Nawata et al.⁹⁵ 1990; O'Brien et al.⁹⁶ 1989). Trabalhos realizados nos últimos anos sugerem que os anticorpos naturais representem a primeira linha de defesa contra infecções, promovendo a fagocitose e a lise mediada pelo complemento. Somente infecções por organismos mais virulentos exigiriam a proliferação de células T, com

receptores do tipo α/β e de células B CD5-, com produção de anticorpos de especificidade mais restrita. Além deste papel no mecanismo de defesa contra infecções, os anticorpos polirreativos parecem estar envolvidos nos fenômenos de auto-imunidade (Tron & Bach¹³² 1989) e nos mecanismos de regulação do sistema imune (Rossi et al.¹¹¹ 1989; Rossi & Kazatchkine¹¹² 1989). Anticorpos naturais antiidiotípicos presentes em preparações de imunoglobulinas humanas, para uso intravenoso, foram utilizados no tratamento de doenças auto-imunes, produzindo diferentes graus de remissão neste doentes (Rossi et al.¹¹¹ 1989).

O nível dos anticorpos naturais sofre modificações no decorrer da vida. Elevações transitórias são observadas nas infecções por bactérias (Cunningham et al.³⁷ 1986) parasitas (Ternynck et al.¹²⁶ 1990; Ternynck et al.¹²⁷ 1991) e vírus (Matsiota et al.⁸⁷ 1987) com os níveis retornando ao normal após a resolução do processo.

Anticorpos poliespecíficos também estão envolvidos na patogênese do Lupus (Fadhel et al.⁴⁴ 1987) e da artrite reumatóide (Burastero et al.²² 1990). No LES Matsiota et al.⁸⁸ (1987) isolaram anticorpos poliespecíficos de eluatos de biópsias renais de pacientes com glomerulonefrite e na AR Burastero et al.²² (1990) detectaram quantidades aumentadas de células B CD5+, comprometidas com a síntese de fator reumatóide polirreativo.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho tem por objetivo estudar os anticorpos naturais em duas importantes doenças tropicais: a doença de Chagas e a Paracoccidioidomicose.

Em relação a doença de Chagas pretendemos fazer um estudo comparativo de antígenos de procedência humana e animal, com o objetivo de verificar se existe diferença de reatividade para estas proteínas, quando se analisa as especificidades de anticorpo natural. Pretendemos, ainda avaliar a reatividade dos soros chagásicos frente a dois haptenos (TNP e FC) muito utilizados em estudos sobre a resposta imune humoral. Também estamos interessados em estudar mais profundamente, o anticorpo natural antilaminina, seu envolvimento na formação de imunocomplexos e as correlações existentes entre antilaminina e os anticorpos que reagem com a proteína de banda 3 e seus produtos de degradação.

Em relação a PCM pretendemos verificar se existe elevação dos níveis de anticorpos naturais nesta doença, que relação guardam estes anticorpos com os específicos anti*P.brasiliensis* e, quais são as especificidades mais representadas nos soros de pacientes com a forma crônica e juvenil. Também desejamos analisar se estes anticorpos estão envolvidos na formação dos imunocomplexos presentes nesta micose.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

4.1.1 Indivíduos infectados pelo *T. cruzi*.

Foram analisados 80 soros de indivíduos adultos, de ambos os sexos, infectados pelo *T. cruzi*. O diagnóstico da infecção chagásica foi estabelecido por três provas sorológicas: 1) Fixação de complemento, 2) Hemaglutinação passiva, 3) Imunofluorescência.

4.1.2 Pacientes com PCM

Foram estudados 30 soros de pacientes de ambos os sexos com PCM crônica e 10 soros de pacientes com PCM juvenil.

Os indivíduos incluídos neste estudo foram triados pela clínica médica e o diagnóstico da PCM confirmado por exame micológico direto e pelo teste de imunodifusão, utilizando como antígeno o filtrado de cultura de fase leveduriforme, como descrito por Camargo et al.²⁶ (1988).

4.1.3 Grupo controle

Foram utilizados 40 soros de indivíduos adultos, saudáveis, de ambos os sexos, residentes no estado de São Paulo. Todos os soros foram submetidos às provas sorológicas para diagnóstico de HIV, Sífilis, Hepatite B, Doença de Chagas e PCM com resultados negativos.

4.2 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE IgG NOS GRUPOS EM ESTUDO

A concentração sérica de IgG foi determinada em 10 soros de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, pela técnica de imunodifusão radial simples (Mancini). Foram usadas placas Nor-Partigen-IgG-Hc compradas do laboratório Behring. Os soros escolhidos apresentavam diferentes níveis de reatividade contra os antígenos do painel.

Também foram analisados 10 soros de PCM, sendo 5 de pacientes crônicos e 5 da forma juvenil.

4.3 ANTIGENOS UTILIZADOS

4.3.1 Antígeno de *T. cruzi*

T. cruzi, cepa Y (Silva & Nussenzweig¹²⁰ 1953) foi cultivada em meio LIT, adicionado de 10% de soro bovino fetal (Camargo²⁴ 1964). Após o crescimento, as formas epimastigotas foram separadas por centrifugação, lavadas com PBS e lisadas no mesmo tampão, adicionado de inibidores de proteases. O lisado de células foi centrifugado e o sobrenadante liofilizado e conservado a -20° C.

4.3.2 Antígeno citoplasmático de *P. brasiliensis*

A cepa de *P. brasiliensis* B339 utilizada foi gentilmente enviada pela Dra. Angela Restrepo e procedia de Medellín,

Colômbia. A cepa era mantida no laboratório, na forma miceliana, em Sabouraud dextrose ágar (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) a temperatura ambiente. O fungo foi convertido na forma leveduriforme em Sabouraud dextrose contendo 0,01% de tiamina (Difco) e 0,14% de asparagina (Difco) a 35°C.

P. brasiliensis foi cultivado na forma leveduriforme em meio de Negroni modificado (Siqueira¹²¹ 1982). O inóculo utilizado foi de 2×10^5 células. A cultura era mantida por 7 dias a 35°C, em agitador giratório (Ética, S. A. SP). e após este período as células eram mortas com mertiolate (0,2g/L), separadas por filtração e lavadas três vezes em tampão Tris 50mM, EDTA 2mM, PMSF 5mM, pH 8,0.

Em seguida, procedia-se à ruptura das células em agitador mecânico (250rpm) com pérolas de vidro, a 4°C, por 18 horas. O lisado obtido era então centrifugado a 10000 rpm, por 30 minutos para remover fragmentos da parede celular e células não rompidas e depois a 100000g para separar fragmentos de membrana.

O sobrenadante resultante era então liofilizado e conservado a -20°C.

4.3.3 Auto-antígenos

Actina foi purificada de músculo estriado esquelético humano e de coelho de acordo com o método de Spudish & Watt¹²² (1971), miosina humana e de vitelo como descrito por Whalen et al.¹³⁹ (1978) e tubulina de porco segundo

Shelansky et al.¹¹⁸ (1973). Mioglobina e DNA foram comprados de Sigma (St. Louis, Mo, USA).

Laminina de camundongo foi isolada do sarcoma de Engelbreth Holm-Swarm e gentilmente doada pelo Dr. J. C. Lissitzky, da Faculdade de Medicina de Marseille.

Tireoglobulina humana foi purificada de acordo com Mclachlan et al.⁸⁹ (1982) e tireoglobulina de procedência animal (tipo II) comprada de Sigma (St Louis, Mo, USA).

Espectrina e banda 3 foram preparadas a partir de eritrócitos humanos, de acordo com os procedimentos descritos, respectivamente, por Bennett & Branton¹⁷ (1977) e Kahlenberg,⁶² (1976) com pequenas modificações.

4.3.4 Purificação do polipeptídeo de 62kDa

O polipeptídeo de 62 kDa foi preparado a partir de eritrócitos humanos por tratamento com butanol, seguido por cromatografia de afinidade em WGA, para retirar uma fração contaminante, com afinidade por esta lectina.

4.3.5 Conjugados TNP-OVA e FC-BSA

TNP foi conjugado a ovoalbumina, como descrito por Little & Eisen⁷⁸ (1966) e FC, conjugada a soro albumina bovina como proposto por Rifai & Wong¹⁰⁸ (1986).

4.4 CONCENTRAÇÃO DOS ANTÍGENOS PARA SENSIBILIZAÇÃO DAS PLACAS

Actina, miosina, mioglobina, tubulina, TNP-OVA e FC foram usados na concentração de 5 µg/ml. DNA 10 µg/ml, Laminina 2,5 µg/ml, Banda-3 1 µg/ml, espectrina 1 µg/ml e 62 kDa 1µg/ml. Os extratos brutos de *T. cruzi* e de *P. brasiliensis* foram utilizados a 5µg/ml e as frações de 43 kDa e 70 kDa de *P. brasiliensis* a 500ng/ml.

As concentrações ótimas de cada antígeno foram determinadas variando as quantidades de antígeno na fase sólida de 10µg a 500ng/ml.

4.5 CONJUGADOS

Na técnica de ELISA foram utilizados conjugados marcados com β-galactosidase (anticadeia pesada γ, α e μ humanos) preparados de acordo com Avrameas et al.¹⁴ (1978) e conjugados marcados com peroxidase (anti γ, α e μ humanos) comprados de Sigma (St Louis, Mo, USA).

4.6 DETERMINAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTIGAL UTILIZANDO ERITRÓCITOS DE COELHO

A determinação de anticorpos antiGal nos soros dos pacientes com PCM foi realizada de acordo com o método proposto por Ravidran et al.¹⁰⁵ (1988).

4.7 TÉCNICA DE ELISA

Placas de poliestireno, com 96 orifícios (CML, Nemours, France e Hemobag, São Paulo), foram sensibilizadas com 100 μ l de cada antígeno em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6 e incubadas 2 horas a 37°C e por 18 horas, a 4°C. Após sensibilização as placas foram guardadas a 4°C até o uso.

Antes do uso, as placas eram lavadas uma vez com salina tamponada com fosfato (PBS) e os sítios livres do poliestireno, bloqueados com 0,5% de gelatina (G) em PBS, por 30 minutos, a 37°C. Após este período as placas eram lavadas com PBS, contendo 0,1% de Tween 20 (PBS-T).

Todos os soros eram, então, diluídos a 1/100, em PBS-T-G e adicionados aos orifícios em duplicatas e as placas incubadas a 37°C por 2 horas e a 4°C por toda noite. No dia seguinte, as placas eram lavadas 5 vezes com PBS-T e o conjugado adicionado numa concentração de 1 μ g/ml.

A atividade de β -galactosidase foi revelada pela adição de ONPG (Sigma) preparado diluindo-se 2 ml de ONPG (solução estoque 4 mg/ml em H₂O destilada) em 8 ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, adicionado de 70 μ l de β ME.

A reação com o substrato (100 μ l) se processava por 1h 30min horas a 37°C. As densidades óticas (DO) eram lidas a 414 nm, num leitor de ELISA (Titertek, Flow Laboratories) equipado com um computador.

Quando a enzima utilizada era a peroxidase, o substrato consistia de 6mg de OPD (Sigma) preparado em 12 ml de

tampão citrato-ácido cítrico 0,1M, pH 5,5. A reação se processava em 10 minutos e era bloqueada pela adição de 50 μ l de ácido sulfúrico 2,5N e sulfito de sódio 0,5%.

4.7.1 Determinação das subclasses de IgG

Utilizou-se a técnica de ELISA descrita anteriormente, com pequenas modificações. Após a adição dos soros, na diluição 1/100 e incubação por 1h 30min a 37°C e por toda a noite a 4°C, as placas eram lavadas e os anticorpos monoclonais específicos de cada subclasse adicionados a 1/500 e incubados por 1h 30min a 37°C. As placas eram então lavadas e adicionado o conjugado antilgG de camundongo a 1 μ g/ml, marcado com β -galactosidase (ou antilgG de camundongo marcada com peroxidase) Estes conjugados eram previamente absorvidos em coluna de IgG humana. Foram utilizados os seguintes monoclonais: NL16 para IgG1, GOM2 para IgG2, ZG4 para IgG3, RJ4 para IgG4. Todos comprados de Oxoid (Wade Road, Basingstoke, Hants, RG24, OPW).

4.8 PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTIGAL EM PROTEÍNA-A-SEPHAROSE

Soros normais e chagásicos foram testados como se segue: 500 μ l de soro diluído a 1/2 em PBS foi aplicado a uma coluna de 1ml de Proteína-A-Sepharose comprada de Sigma (St. Louis, Mo, USA), com fluxo lento. Em seguida, a coluna era

lavada, exaustivamente com PBS, até que a DO fosse inferior a 0,02. e eluída com galactose 0,2M em PBS. Os anticorpos eluídos eram dialisados por 48 horas contra 2 litros de PBS (2 trocas) e em seguida concentrados em saco de diálise com polietilenoglicol 6000. Após a primeira eluição, a coluna era novamente lavada com PBS e eluída com tampão ácido (glicina-HCl 0,1M, pH 2,8). A segunda fração eluída era, então, rapidamente neutralizada com TRIS 1M, pH 9,0 e dialisada contra PBS e em seguida concentrada.

Depois de cada processo de purificação a coluna era lavada com PBS-azida e conservada a 4°C.

Neste experimento serviram como controle colunas preparadas com Sepharose ativada pelo HCl, Sepharose ativada pelo HCl e bloqueada com etanolamina 1M, Sepharose não ativada. Além disso, também se experimentou eluir a coluna Proteína-A-Sepharose com glicose 0,2M. Finalmente, submeteu-se os soros a uma pré-absorção com Sepharose não ativada como descrito por Hamilton & Adkinson⁵⁵ (1985).

4.9 PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTIGAL EM DNA-SEPHAROSE

Utilizou-se uma coluna de DNA-Sepharose preparada de acordo com o método proposto por Kubota et al.⁷¹ (1985). O DNA foi comprado de Sigma (DNA de dupla fita de timo de vitelo) e a Sepharose de Pharmacia. Os anticorpos foram

eluídos com tampão carbonato de sódio 20mM, pH 10,5 contendo 5% de DMSO.

4.10 ISOLAMENTO DE IMUNOCOMPLEXOS

Numa primeira fase foi utilizado o protocolo descrito por Ohlson & Zetterstrand⁹⁷ (1985). Posteriormente, modificou-se a concentração de PEG para 10% como descrito no trabalho de Kaveri et al.⁶⁷ (1990).

As amostras foram preparadas em tubos eppendorf, acrescentando-se a 400 µl de soro diluído a 1/2, em PBS, igual volume PEG 5% e/ou 20% (PM: 6000) em tampão fosfato 20mM e NaCl 150mM, pH 7,4, e incubadas por toda noite a 4°C. No dia seguinte, as amostras eram centrifugadas (1500g, 20 minutos a 4°C) e lavadas 2 vezes com PEG 2,5% e/ou 10%, preparado no tampão acima descrito.

Os complexos obtidos eram dissolvidos em 200 µl de tampão fosfato pH 7,4, 20mM, NaCl. 150mM, EDTA 10mM, Tween 20 0,05% e Timerosol 0,1%.

Para aumentar a quantidade de anticorpos livres, acrescentava-se a 100µl da preparação, 50µl de glicina-HCL 0,2M, pH 2,8 e incubava-se 15 minutos a 4°C. A seguir a amostra era neutralizada com 25µl de K₂HPO₄ 1M, diluída a 1/20 e analisada imediatamente.

4.11 SDS-PAGE

Foi usado o protocolo proposto por Laemmli⁷² (1970) que consiste na utilização de um gel de separação linear a 10% de acrilamida (dimensões 10 cm x 14 cm) e um gel de concentração (dimensões 4 cm x 14 cm), polimerizados entre duas placas de vidro separadas por espaçadores de 0,8 mm de espessura. Os géis eram preparados a partir de soluções estoque contendo 30% de peso de acrilamida e 0,8% de peso de N,N-bis-metilenoacrilamida.

No gel de separação a polimerização foi feita em solução contendo 0,375M de Tris-HCL pH 8,8 e 0,1% de SDS, em presença de Temed e persulfato de amônio. O gel de concentração foi polimerizado em presença de 0,125M de Tris-HCL pH 6,8 e 0,1% de SDS, 0,1% de persulfato de amônio e 0,05% V/V de Temed.

As amostras foram preparados em tampão de amostra (0,0625M de Tris-HCL pH 6,8, 20% SDS, 10% Glicerol e 0,0005% de azul de bromofenol) adicionado de 5% de β 2-mercaptoetanol, como agente redutor e aquecidas a 100°C, por 3 minutos.

Paralelamente às amostras analisadas, em cada corrida foi utilizada uma mistura de proteínas de tamanho molecular conhecido, compradas de Sigma (St.Louis, MO, USA), que serviram como referência (marcadores de PM).

A corrida foi processada a 25mA em tampão Tris 0,025M, Glicina 0,192M e SDS 0,1%, pH 8,3. Para a visualização das

frações eletroforéticas, os géis foram corados pelo "coomassie brilliant blue" e pela prata Ansorge³ (1983).

4.12 WESTERN-BLOTTING

A técnica de Western-blotting foi desenvolvida de acordo com Towbin et al.¹²⁹ (1979). Após a eletroforese em gel de poliacrilamida, obteve-se a réplica do gel em nitrocelulose (Amersham, Schleicher-Schuell ref: BA85 ou similar). Para isso o gel foi colocado em contato com a nitrocelulose, entre quatro folhas de papel Whatman nº3 e duas esponjas embebidas em tampão de transferência (Tris 0,025M, Glicina 0,192M e metanol 20%).

A transferência eletroforética foi realizada por toda noite a 150 mA e 50V. Para monitorar a transferência a nitrocelulose foi corada pelo Ponceau S 0,05%, em TCA 3% (5 minutos) e descorada com água destilada. Os padrões foram marcados e os "slots" individualizados. A seguir os sítios livres da nitrocelulose foram saturados com PBS pH 7,4, contendo 0,2% de NP40 e 2% de BSA (4 horas, a temperatura ambiente), e em seguida incubadas por toda noite, com o soro do paciente diluído a 1/40, no mesmo tampão. Após a incubação e uma etapa de lavagem em PBS-NP40, as fitas foram incubadas com um conjugado antiIgG humana ou antiIgG humanas totais marcado com peroxidase (2 horas a temperatura ambiente, sob agitação). Após este período, as

fitas foram lavadas e incubadas com o substrato DAB (Sigma) 0,01% em 0,1M de Tris-HCl, pH 7,5 e 0,003% de H₂O₂.

Reveladas as frações, as fitas eram lavadas em água destilada e a reação bloqueada com ácido acético a 10% e conservadas ao abrigo da luz.

4.13 DOSAGEM BIOQUÍMICA

As dosagens de proteína nas amostras foram realizadas de acordo com o método de Schaffner & Weissmann¹¹⁶ (1973).

5 RESULTADOS

5.1 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Todas as amostras de soros (SHN, SCH, PCM) foram testadas individualmente. Os resultados são expressos como níveis de reatividade, considerando-se nível 1 de reatividade a média obtida em oito orifícios da placa de ELISA, contendo o soro controle (pool de 40 soros normais). Esta conduta evita erros devido a variáveis que podem interferir nas reações imunoenzimáticas

Nos testes em que a reatividade dos soros normais estava próxima de zero, como no caso da análise de subclasses, os resultados foram expressos como densidades óticas. Neste caso todos os soros foram testados de uma só vez para evitar erros.

O teste "t" de "Student" para valores não pareados foi utilizado para determinar os níveis de significância. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

Na tabela 1 foram considerados positivos os valores superiores a média obtida nos soros normais ($n=40$), mais dois desvios-padrão ($M+2DP$).

5.2 ANTICORPOS NATURAIS EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO *T. CRUZI*

Os resultados deste trabalho indicam que altos níveis de anticorpos naturais podem ser encontrados nos soros de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*.

Na figura 1 mostramos as médias de reatividade obtidas para os anticorpos da classe IgG contra os antígenos do painel. As médias mais altas foram observadas para os anticorpos antibanda3 (M=6,65, DP±4,53), antitubulina (M=6,39, DP±6,11) e antiactina (M=5,54, DP±5,73). Uma grande variabilidade de resposta foi encontrada para estes três antígenos, como pode ser observado, tendo-se em conta os desvios-padrão apresentados. A reatividade para laminina no grupo SCH foi mais baixa, porém o grupo reagiu de forma homogênea (M=4,75, DP ±1,88). Os aumentos observados para os anticorpos naturais eram estatisticamente significantes ($p < 0,01$). Nenhuma correlação foi notada entre estes anticorpos e os anticorpos específicos anti*T.cruzi* e correlações negativas foram encontradas entre os anticorpos antiactina, antitubulina e anti*T.cruzi*. Quando se considerou apenas os anticorpos naturais, correlações positivas foram vistas entre antiespectrina e antimiosina ($R=0,913$); antiDNA e antimiosina ($R=0,865$); antiDNA e antibanda3 ($R=0,864$).

Na figura 2 mostramos as médias de reatividade para os anticorpos da classe IgM. As médias mais altas foram observadas para antibanda3 (M=2,87, DP±4,06), antiDNA (M=2,42, DP±2,28), antilaminina (M=2,39, DP±2,23). Em IgM a resposta do grupo SCH para laminina mostrou grande variabilidade. Reatividades mais baixas foram vistas para tubulina e mioglobina. A análise estatística mostrou que os aumentos dos anticorpos IgM antibanda3, antiespectrina e

antilaminina eram significantes ($p < 0,01$). Menos significantes foram os aumentos verificados para miosina ($p < 0,02$) e actina ($p < 0,04$). Estudamos as correlações destes anticorpos entre si e com *T. cruzi*. As maiores correlações foram notadas entre antilaminina e antiespectrina ($R = 0,936$) e antilaminina e antibanda 3 ($R = 0,912$). Os anticorpos que mais se correlacionavam com *T. cruzi* eram os antibanda3.

Na tabela 1 mostramos as porcentagens de indivíduos positivos em IgG e IgM, para os antígenos do painel. Cerca de 91,2% do grupo estudado apresentava anticorpos IgG específicos para *T. cruzi*. A porcentagem de reatividade variou de 11,2% para os anticorpos IgG antiTNP a 80% para os anticorpos IgG antilaminina. Quanto aos anticorpos IgM podemos verificar que apenas 38,7% dos indivíduos examinados tinham IgM específica para *T. cruzi*. Encontramos a mais baixa positividade para tubulina (6,2%) e a mais alta para espectrina e DNA (55%).

Verificamos que a auto-reatividade encontrada nestes soros não guardava, em muitos casos, uma relação direta com as concentrações séricas de imunoglobulinas. Observamos alta reatividade para alguns antígenos do painel em pacientes com concentrações de IgG de 1,56g/dl e baixa reatividade em indivíduos com 3,5g/dl (Tabela 2).

Selecionamos 20 soros chagásicos e testamos frente a três antígenos de origem humana: actina, miosina e tireoglobulina e comparamos estes resultados com aqueles

obtidos com antígenos de procedência animal (Figura 3). Nenhuma diferença foi observada em relação a actina e tireoglobulina, porém, observamos que com miosina de origem animal os resultados eram mais elevados. A diferença encontrada foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Também testamos a reatividade dos anticorpos IgG para os haptenos TNP e FC (Figura 4). A elevação dos anticorpos antiTNP, embora significativa era inferior a de outros anticorpos ($p < 0,03$). Porém, os anticorpos antiTNP apresentavam uma característica interessante, pois podiam ser detectados numa diluição de 1/100, por anticorpos monoclonais específicos para as subclasses de IgG (Figura 5). Os soros chagásicos apresentavam um aumento de IgG4 antiTNP. Nenhum aumento foi observado em relação ao hapteno FC.

Como alguns dos antígenos utilizados nesta análise eram componentes do citoesqueleto, decidimos investigar a reatividade dos soros chagásicos frente a membranas de eritrócitos humanos. Para isso utilizamos a técnica de "Western-Blotting". A figura 6 mostra que outros componentes do citoesqueleto também são reconhecidos.

Alguns destes polipeptídeos são produtos de degradação da banda 3, como confirmado pela utilização de um anti-soro antibanda 3, gentilmente enviado por Lutz, H. (Dept° de Bioquímica, Instituto de Tecnologia, Zurique, Suíça). Entre os polipeptídeos observados, detectamos um que apresentava

uma forte reação com SCH. Este peptídeo de 62 kDa foi purificado por extração com butanol e testado na reação de ELISA frente a 80 soros de indivíduos infectados. Cerca de 78,7% dos soros deram resultados positivos (Figura 7 a e b) sendo a média de reatividade igual a 5,18. Os aumentos observados em relação ao peptídeo de 62 kDa correlacionavam-se com os anticorpos antibanda 3 ($R=0,722$) e antilaminina ($R= 0,811$).

Na figura 8 apresentamos o perfil de reatividade dos anticorpos isolados de um soro chagásico, diretamente de uma coluna de Proteína-A-Sepharose, com 0,2M de galactose e/ou com 0,15M de melibiose. Foram recuperados 361 μ g de anticorpos a partir de 0,5ml de soro. Estes anticorpos e aqueles posteriormente eluídos da coluna com glicina-HCl 0,1M, pH 2,8 (5,9mg) foram testados a 10 μ g/ml frente aos diferentes antígenos do painel. Anticorpos poliespecíficos, reativos com laminina, foram demonstrados no primeiro eluato. A análise de subclasses mostrou que estes anticorpos pertenciam, principalmente, a subclasse IgG3. A pesquisa nestes eluatos de IgM e IgA reativas com os antígenos do painel resultou negativa, o que não exclui a presença destas classes de imunoglobulinas, com outras especificidades, no material eluído. Dosagens de IgG, IgM e IgA totais não foram realizadas.

Os resultados obtidos com os controles mostraram que anticorpos antiagarose estão presentes nos soros normais e

chagásicos (dados não mostrados) e que podem ser retirados da amostra, por uma pré-absorção com Sepharose não ativada. Amostras de soro pré-absorvidas ainda apresentam anticorpos que podem ser eluídos com galactose da Proteína-A-Sepharose. Estes anticorpos também reagiram com eritrócitos de coelho (dados não mostrados). Baixa reatividade foi observada no eluato obtido com glicose.

Os soros que apresentavam níveis mais elevados de anticorpos IgG antiDNA foram utilizados para constituir um "pool". Este "pool" foi aplicado num imunoabsorvente de DNA, já utilizado para isolar anticorpos com esta especificidade de soros de camundongos F1(NZB X NZW) com ótimos resultados.

A figura 9 mostra que os anticorpos isolados a partir de soros de indivíduos chagásicos sobre este imunoabsorvente, reagem, quase exclusivamente, com laminina. A reação foi revelada com um conjugado anticadeia γ humana, marcado com β galactosidase.

Na figura 10, são apresentados os resultados obtidos na análise dos imunocomplexos circulantes, precipitados com 2,5% de PEG, a partir de cinco soros chagásicos. Aqui também, destacam-se os anticorpos antilaminina.

5.3 ANTICORPOS NATURAIS NA PCM

Inicialmente, utilizando a enzima β galactosidase, analisamos 20 soros de PCM crônica e 10 casos de PCM juvenil. Não encontramos grandes alterações nos níveis de anticorpos

naturais, nos primeiros casos analisados de PCM crônica e detectamos algumas alterações na PCM juvenil. Posteriormente, utilizando a enzima peroxidase estudamos mais 10 soros de PCM crônica, acrescentando ao painel de antígenos: mioglobina, o conjugado FC-BSA e eritrócitos de coelho. Também isolamos os imunocomplexos presentes em 20 soros de PCM crônica e estudamos a reatividade dos anticorpos envolvidos na sua formação..

A figura 11 mostra os níveis de reatividade apresentados pelos soros de PCM crônica. Todos os soros normais (n=20) e os de PCM (n=20) foram testados individualmente. Foram considerados positivos os soros com níveis de reatividade superiores a média obtida em vinte soros normais mais dois desvios-padrão ($M + 2DP$).

Na figura 12 mostramos as médias de reatividade e os desvios-padrão obtidos na análise dos anticorpos da classe IgM presentes nos soros normais e nos soros de PCM crônica. Não se observou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados.

Na figura 13 apresentamos a mesma análise para os anticorpos da classe IgA. Aqui também não se observa qualquer diferença significativa.

Na figura 14 são apresentados os resultados obtidos por ELISA no grupo de PCM juvenil. Sete soros foram positivos para actina, um para DNA e um para miosina. Um soro ficou no limite

de normalidade em relação a tubulina. Finalmente nove foram positivos para o AgC de *P. brasiliensis*.

No teste "t" apenas antiactina ($M=2,42$, $DP\pm 1,35$) apresentava diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo normal ($p<0,03$).

Observamos uma redução nos níveis de anticorpos naturais, da classe IgM, para DNA e TNP na forma juvenil. O teste "t" mostrou que esta diferença era estatisticamente significativa (DNA $p<0,02$ e TNP $p<0,01$).

Na figura 15 mostramos a distribuição dos anticorpos específicos anti*P. brasiliensis* nas diferentes subclasses de IgG. Foram analisados soros de PCM crônica ($n=20$). Os resultados são apresentados como densidades óticas obtidas a 492nm (médias das duplicatas). Os anticorpos específicos concentravam-se principalmente em IgG₁, com uma média de 0,7 de densidade ótica. Cinco pacientes tinham um nível aumentado de IgG₂ e aumento de IgG₃ só foi demonstrado em um caso.

IgG₄ podia ser detectada em 6 pacientes, sendo 4 casos correlacionados com altos níveis de IgG₁.

A figura 16 apresenta uma segunda análise de anticorpos naturais, utilizando um painel de antígenos ampliado. Foram analisados dez soros de pacientes com PCM crônica. Os níveis de anticorpos naturais para actina estão aumentados em relação a população normal ($p<0,02$). Também encontram-se elevados os níveis de antimiosina e antigal ($p<0,01$) no soro de

alguns destes pacientes. Uma correlação razoável foi observada entre antiactina e antimiosina ($R=0,754$). Nenhuma correlação foi encontrada entre os aumentos dos anticorpos naturais e dos anticorpos específicos anti*P.brasiliensis*. IgG específica anti*P. brasiliensis*, estava aumentada ($p<0,01$).

Uma análise dos anticorpos presentes nos imunocomplexos precipitados com 10% de PEG é mostrada na figura 17. Foram analisados 10 soros. Anticorpos naturais da classe IgG para alguns dos antígenos do painel foram observados. Dois complexos foram positivos para actina, um para DNA, dois para Gal α 1,3Gal, quatro para mioglobina e miosina, um para TNP e tubulina. No teste "t" foram significantes as diferenças observadas para Gal α 1,3Gal ($p<0,01$), mioglobina ($p<0,03$) e miosina ($p<0,02$). Correlação entre os aumentos observados nos soros e nos imunocomplexos isolados foi demonstrada no caso dos anticorpos antiGal ($R=0,930$). Também investigamos a presença de anticorpos específicos, anti

43 e anti70kDa. Os resultados estão nas figuras 18 e 19.

Finalmente, o exame da tabela 3 mostra que existe uma correlação ($R=0,887$) entre os aumentos observados nas concentrações séricas de IgG e os anticorpos antiactina. Esta correlação é bem menos evidente em relação a antiGal ($R=0,586$) e, está abaixo de 0,1 em relação a antiDNA.

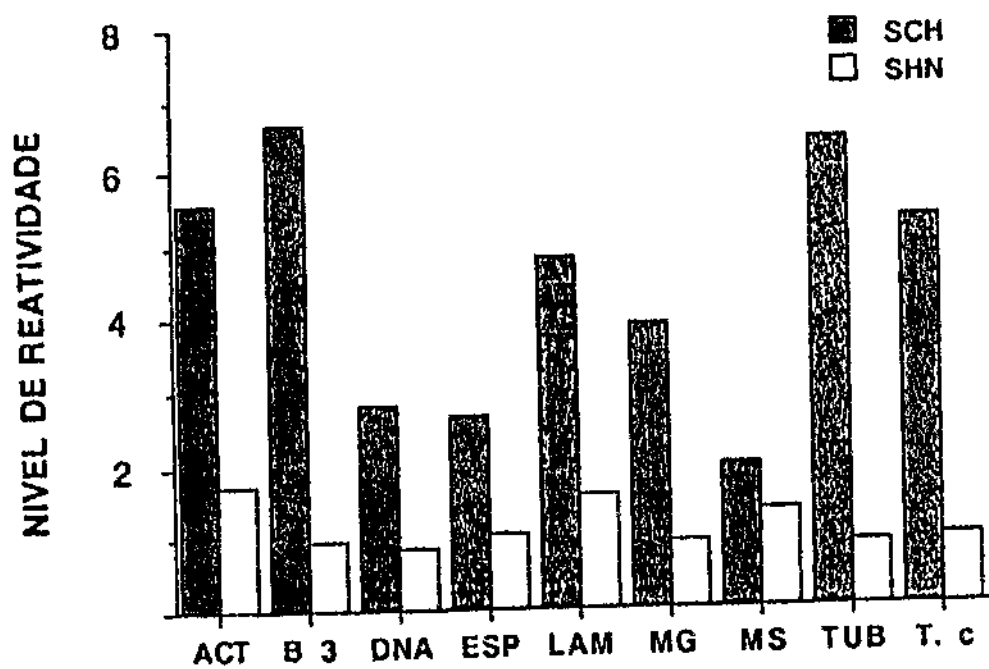


FIGURA 1 - Reatividade média de anticorpos da classe IgG contra os antígenos do painel. SCH (n=80), SHN (n=40). Os soros foram testados individualmente e a reação de ELISA revelada com um conjugado anticadeia γ humana marcado com β galactosidase. A reatividade dos soros humanos normais situa-se em torno de 1.

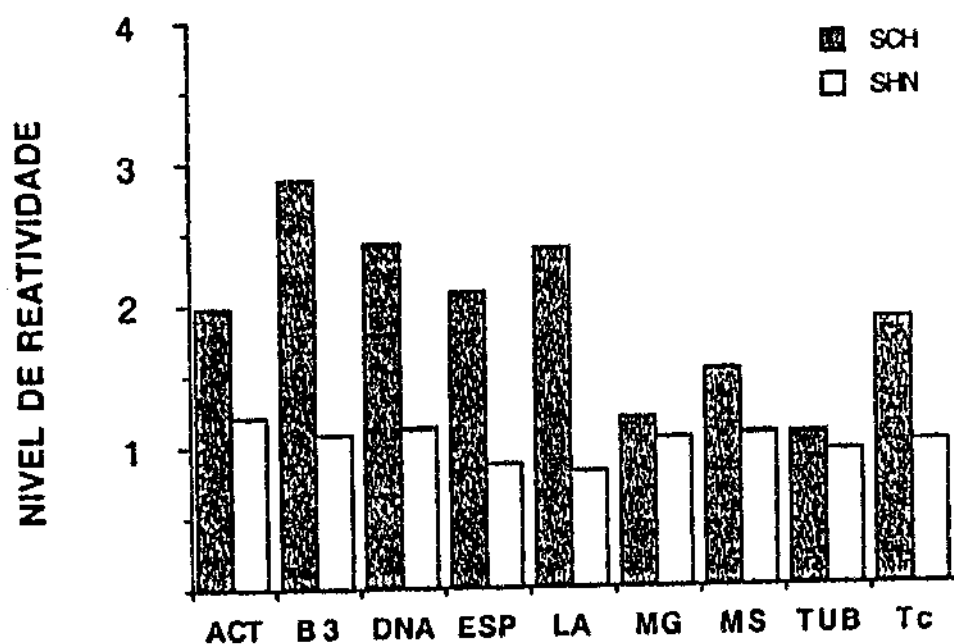


FIGURA 2 - Reatividade média de anticorpos da classe IgM contra os antígenos do painel. SCH (n=80), SHN (n=40). Os soros foram testados individualmente e a reação de ELISA revelada com um conjugado anticadeia γ humana marcado com β galactosidase. A reatividade média dos soros humanos normais situa-se em torno de 1.

Tabela 1

**PORCENTAGEM DE SOROS POSITIVOS NO GRUPO SCH
(80 soros) PARA OS ANTIGENOS DO PAINEL**

	ACT	B3	DNA	ESP	LA	MG	MS	TNP	TUB	Tc
IgG	55	68,7	73,7	58,7	80	53,7	21,2	11,2	38,7	91,2
IgM	20	35	55	55	31,2	18,7	27,5	11,2	6,2	38,7

Os soros foram considerados positivos quando seus valores foram iguais ou superiores a Média + 2 Desvios Padrão de 40 soros de indivíduos saudáveis, calculado para cada antígeno.

Tabela 2
Hipergamaglobulinemia e anticorpos naturais na doença de Chagas.

	IgG (x)	ACT	DNA (y)	MS	Tc
1	15,6	12,3	8,3	2,46	12,55
2	12,5	3,8	9,4	0,75	12,75
3	15,6	8,5	24,6	0,82	8,49
4	22,6	13,6	1,9	1,44	15,30
5	19,0	6,5	0,8	0,73	6,54
6	35,0	1,6	0,8	0,41	8,46
7	26,5	4,0	3,3	3,09	7,74
8	22,6	2,5	3,1	3,12	7,42
9	26,5	1,6	1,6	1,20	2,71
R	(X/y)	-0,381	-0,595	0,002	-0,402

Valores normais: IgG = 8,02 a 17,6g/l, X) Concentração sérica de IgG, y) Nivel de reatividade na reação de ELISA, R) Correlação entre os níveis séricos de IgG e os anticorpos naturais.

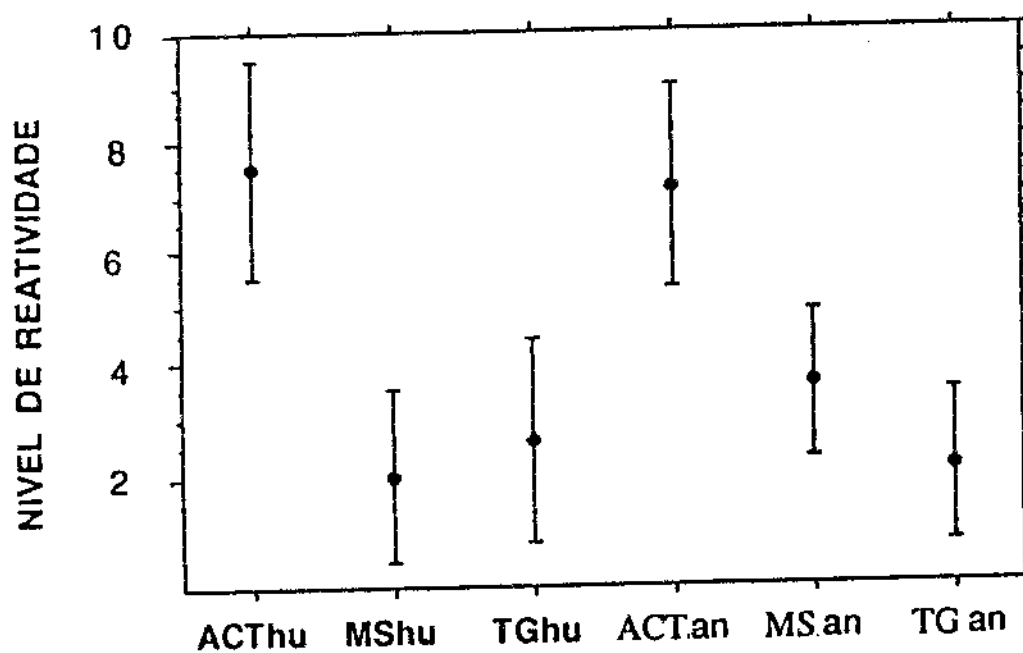


FIGURA 3 - Reatividade de SCH (n=20) para os antígenos actina, miosina e tireoglobulina de procedência humana (hu) e animal (an). A reação foi revelada com um conjugado anticadeia γ humana marcado com β galactosidase. Controle da reação: "pool" de 20 soros humanos normais.

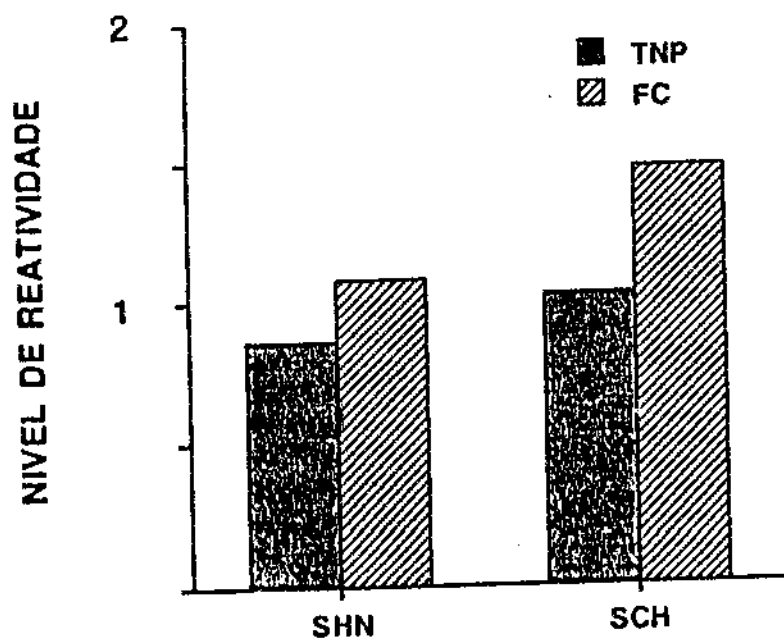


FIGURA 4 - Reatividade média de SHN (n=40) e SCH (n=80) para os haptenos TNP e FC complexados a ovalbumina e soro albumina bovina, respectivamente. Os soros foram testados individualmente e a reação de ELISA revelada com um conjugado anticadeia γ humana marcado com β galactosidase.

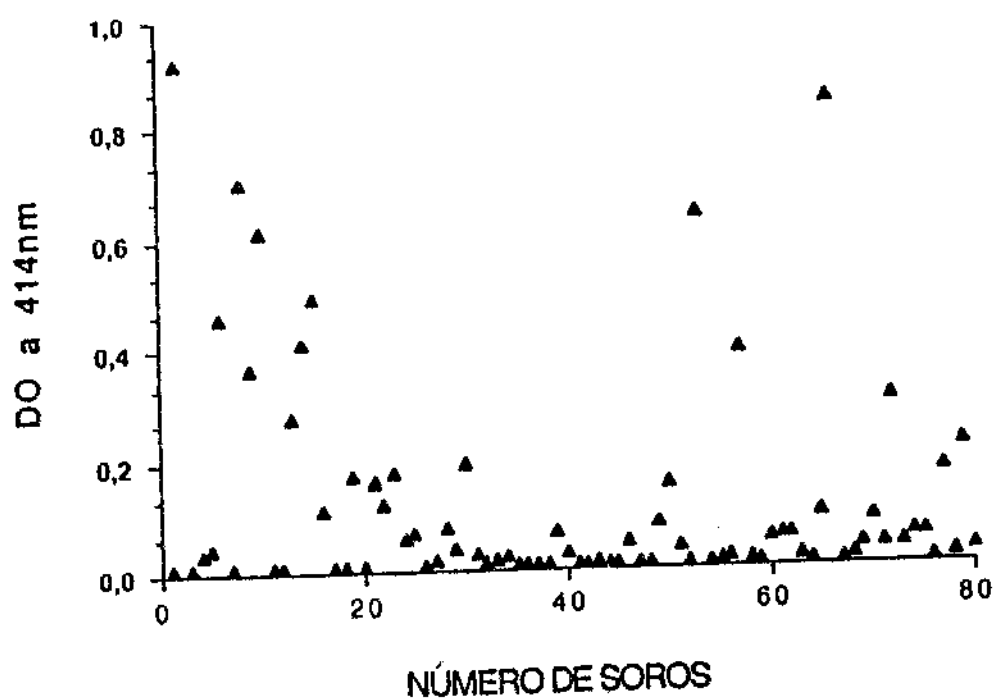


FIGURA 5 - IgG4 antiTNP no grupo SCH (n=80). Os soros foram testados a 1/100 e processados em bloco. Na reação de ELISA foi utilizado anticorpo monoclonal específico para IgG4 humana e um conjugado antiIgG de camundongo marcado com β galactosidase. Serviu como controle um "pool" de 40 SHN.

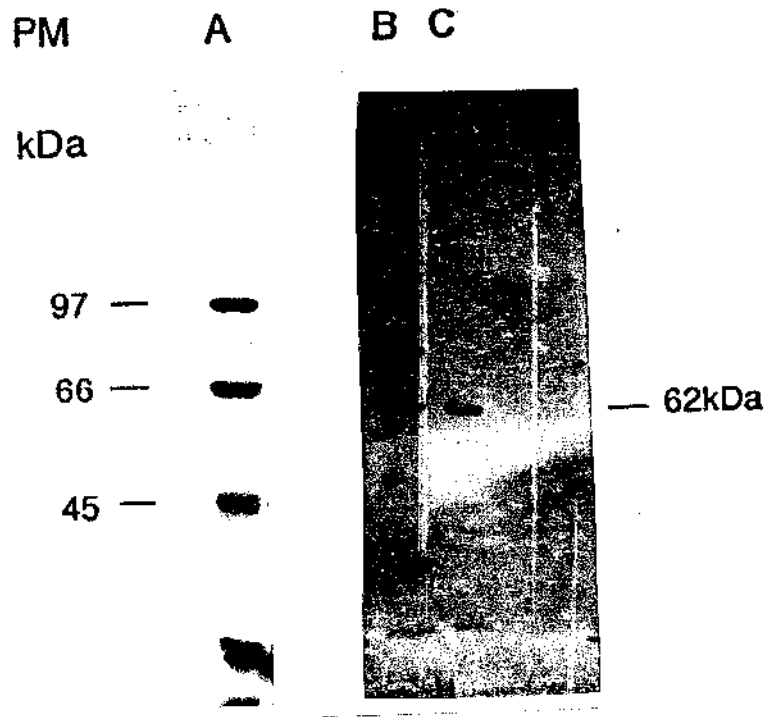


FIGURA 6 - Membranas de eritrócitos humanos foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e as frações eletroforéticas transferidas para papel de nitrocelulose. A) Padrão de peso molecular, B) Perfil de proteínas reativas com antibanda 3 humana, C) Reação do peptídeo de 62 kDa com antibanda 3 humana. A reação foi revelada com um conjugado antimunoglobulina humana marcado com peroxidase.

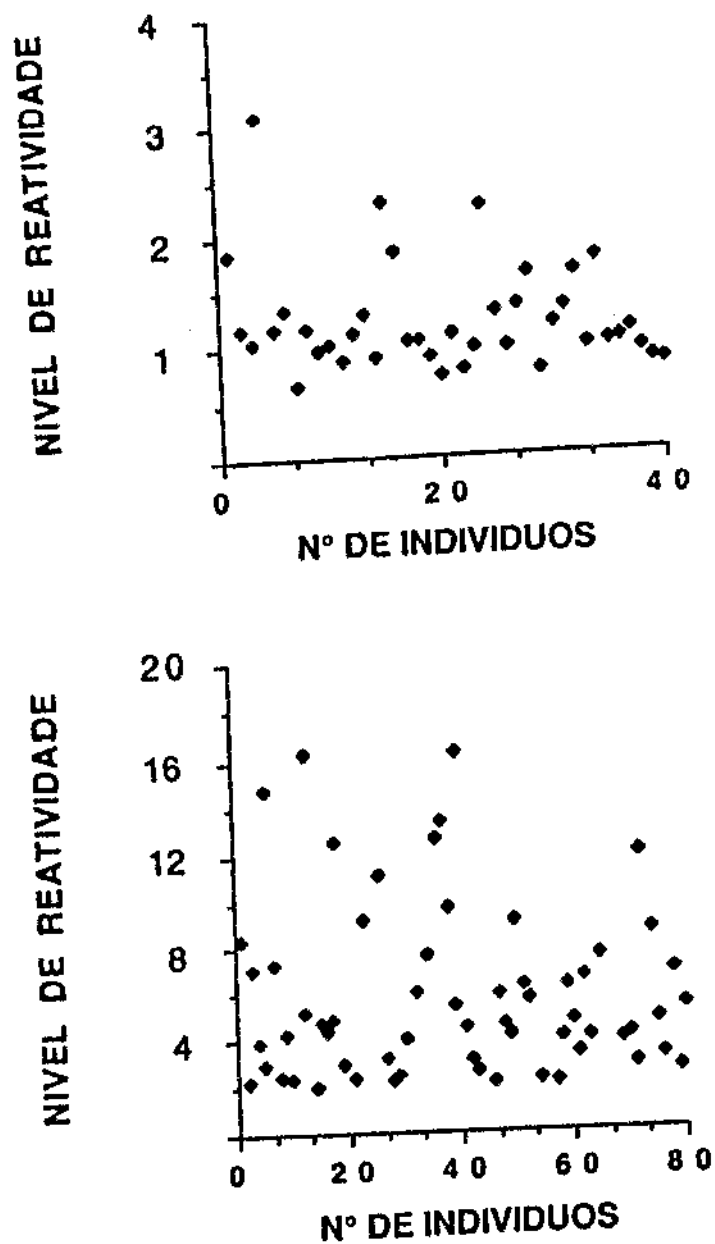


FIGURA 7 - a) Reatividade de SHN (n=40) e b) SCH (n=80) para o polipeptídeo de 62 kDa de eritrócitos humanos. Os soros foram testados individualmente com a fração purificada. A reação de ELISA foi revelada com um conjugado anticadeia γ humana marcado com β galactosidase.

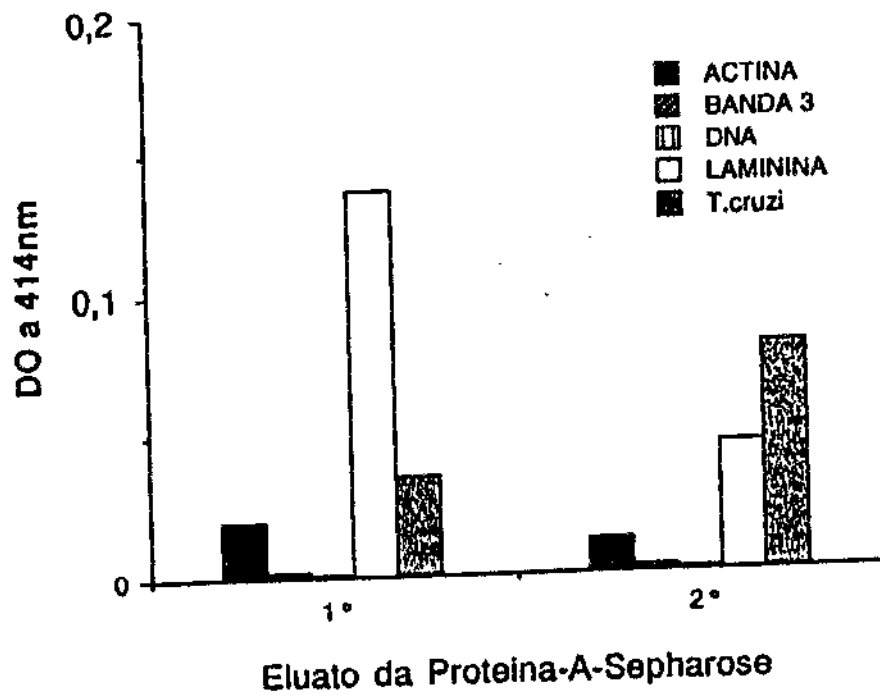


FIGURA 8 - Reatividade dos anticorpos da classe IgG de SCH eluidos com galactose 0,2M de uma coluna de Proteina-A-Sepharose. A reação de ELISA foi revelada com anticadeia γ humana marcado com β galactosidase. 1°) Anticorpos eluidos com galactose; 2°) Anticorpos eluidos com tampão ácido, após a primeira etapa.

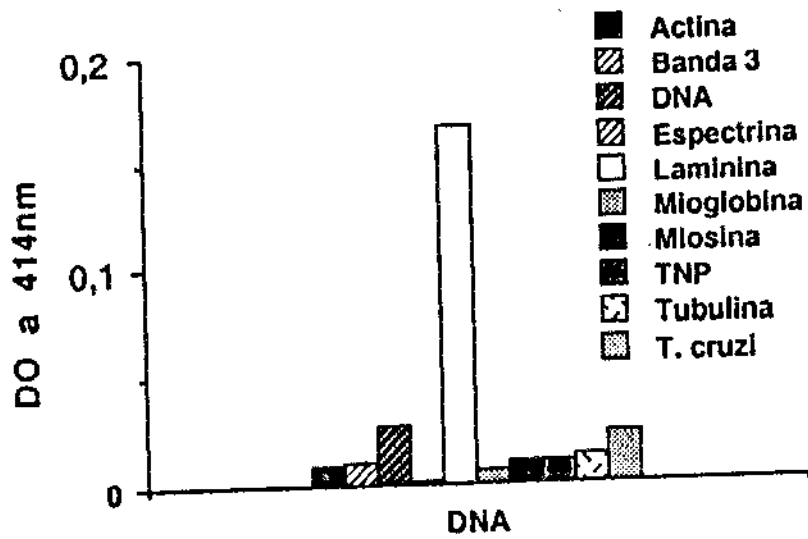


FIGURA 9 - Reatividade de anticorpos isolados de SCH sobre o imunoadsorvente DNA. Resultados apresentados como DO a 414 nm. A reação foi revelada com um conjugado anticadeia γ humana marcado com β galactosidase.

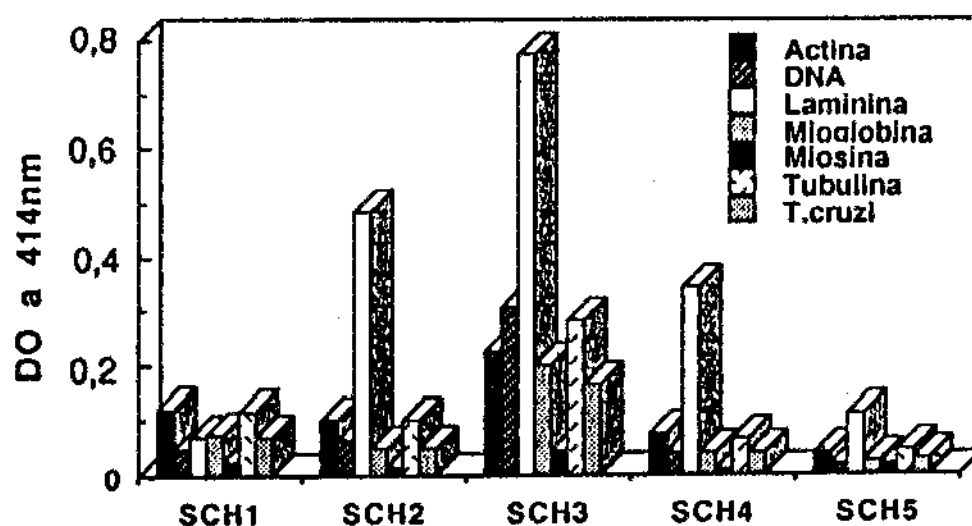


FIGURA 10 - Reatividade dos anticorpos presentes nos ICC após dissociação com ácido. SCH (n=5). Os ICC foram isolados com PEG 2,5%. Resultados apresentados como DO a 414 nm. A reação foi revelada com um conjugado anticadeia γ humana marcado com β galactosidase.

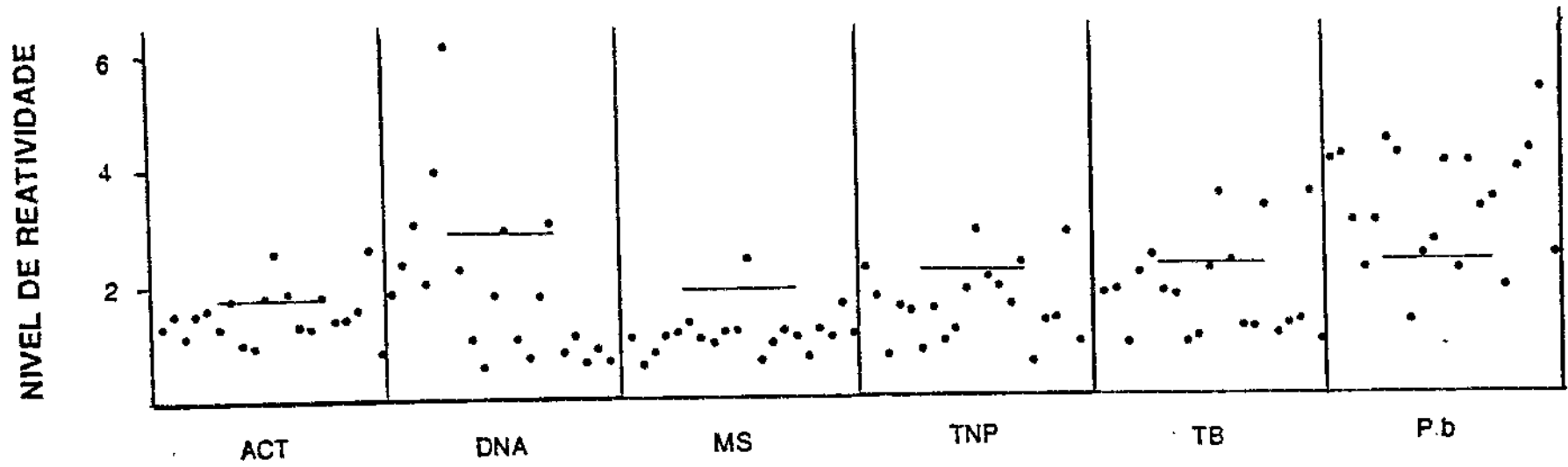


FIGURA 11 - PCM crônica (n=20). Os soros foram testados individualmente e a reação de ELISA revelada com um conjugado anticadeia y humana marcado com β galactosidase. A barra indica a média obtida em 20 SHN mais dois desvios-padrão. São positivos os soros cujos valores estão acima da barra.

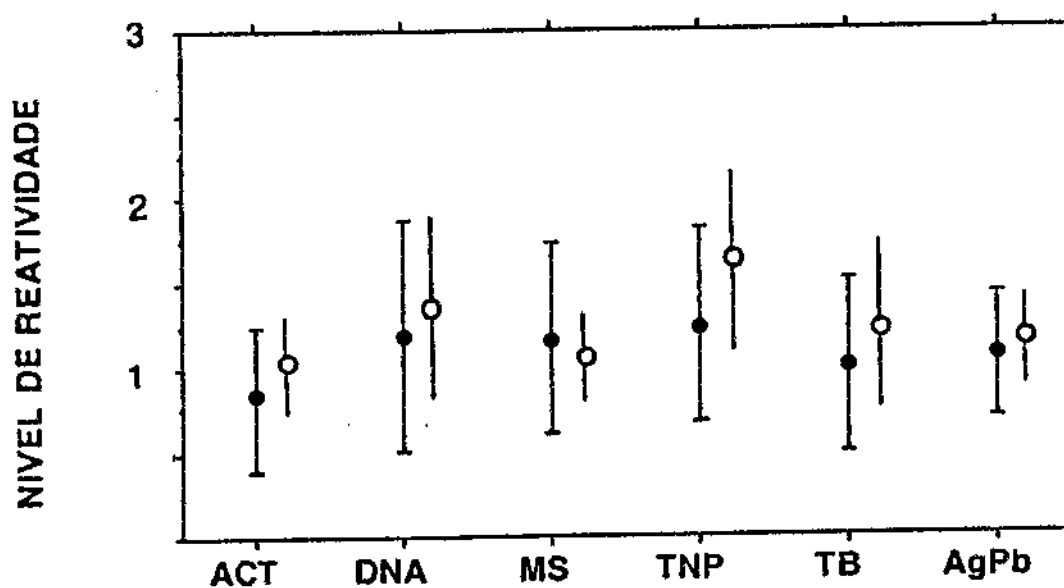


FIGURA 12 - Reatividade média e desvios-padrão dos anticorpos naturais da classe IgM para os antígenos do painel. ● PCM crônica (n=20) ○ SHN (n=20). A reação de ELISA foi revelada com um conjugado anticadeia μ humana marcado com β galactosidase.

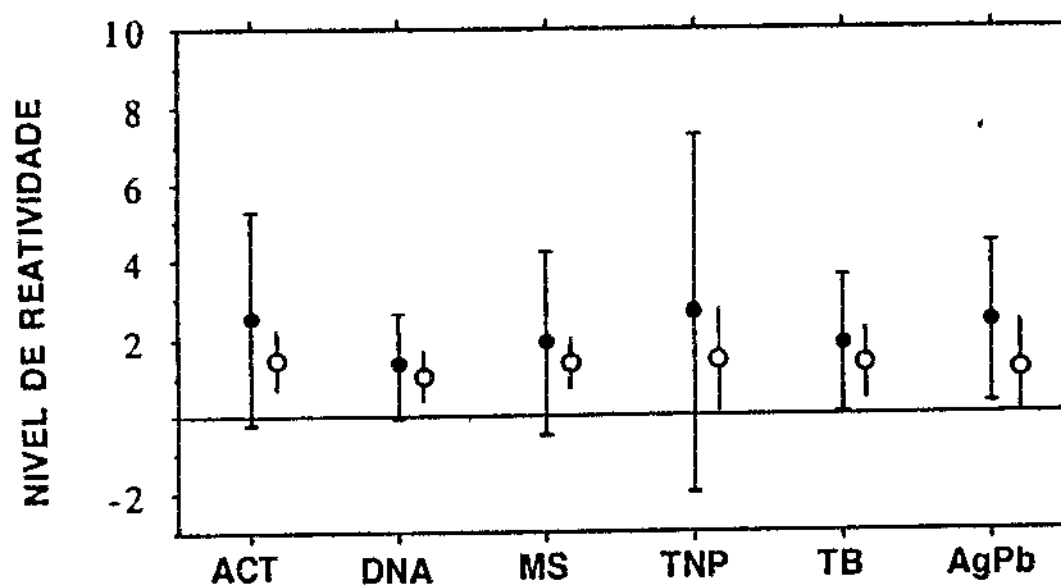


FIGURA 13 - Reatividade média e desvios-padrão dos anticorpos naturais da classe IgA para os antígenos do painel. ● PCM crônica (n=20) ○ SHN (n=20). A reação de ELISA foi revelada com um conjugado anticadeia α humana marcado com β galactosidase.

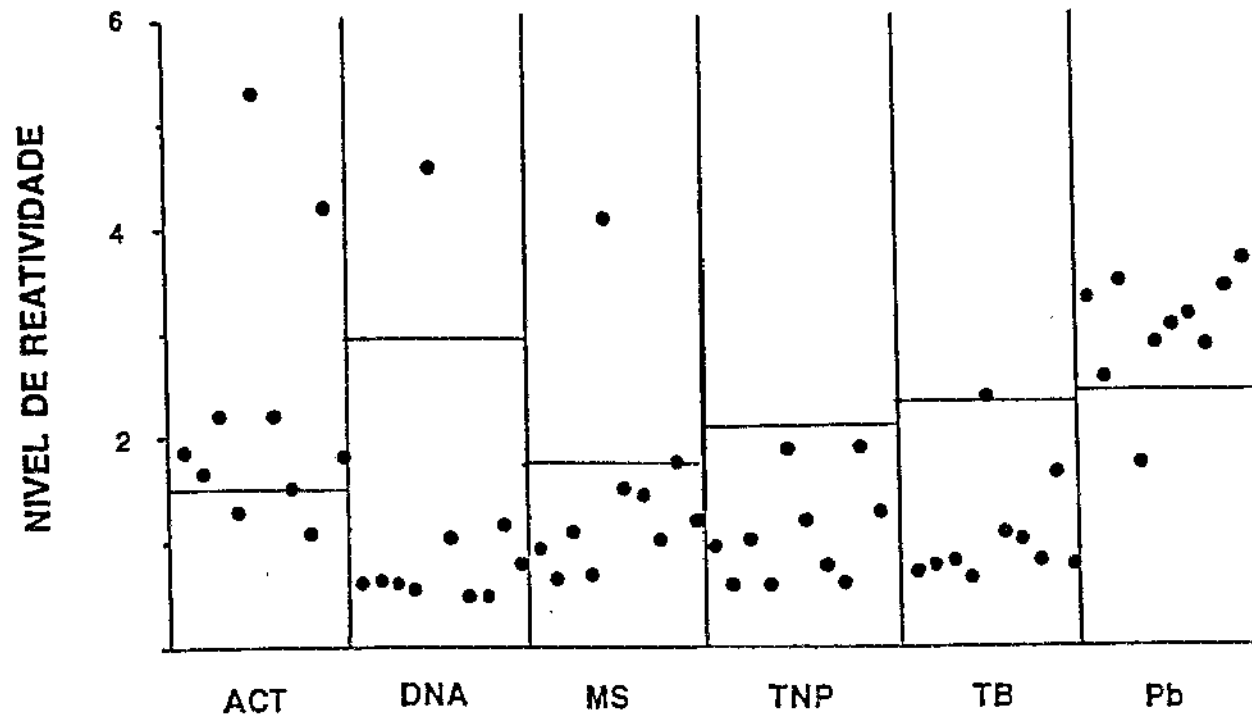


FIGURA 14 - PCM juvenil (n=10). Os soros foram testados individualmente e a reação de ELISA revelada com um conjugado anticadeia γ humana marcado com β galactosidase. A barra indica a média obtida em 20 SHN mais dois desvios-padrão. São positivos os soros cujos valores estão acima da barra.

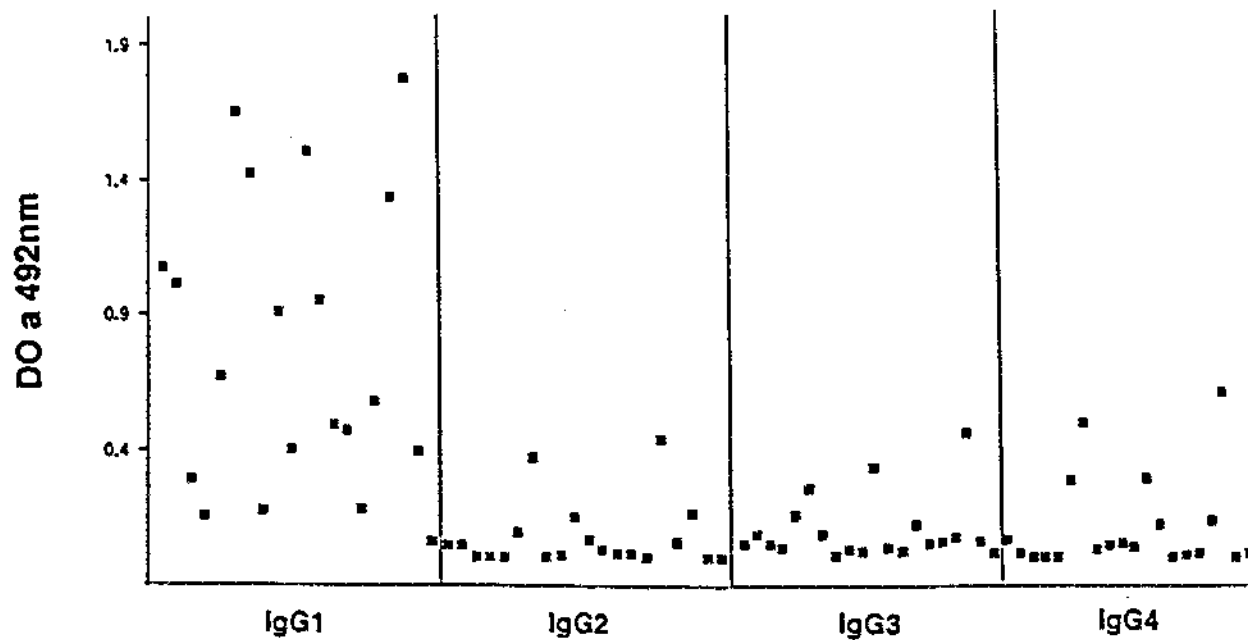


FIGURA 15 - Distribuição dos anticorpos IgG anti*P. brasillensis* nas diferentes subclasses de IgG. Os soros foram testados individualmente e processados em bloco. Na reação de ELISA foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para as subclasses de IgG humana e um conjugado antiIgG de camundongo marcado com peroxidase. Serviu como controle um "pool" de 20 SHN.

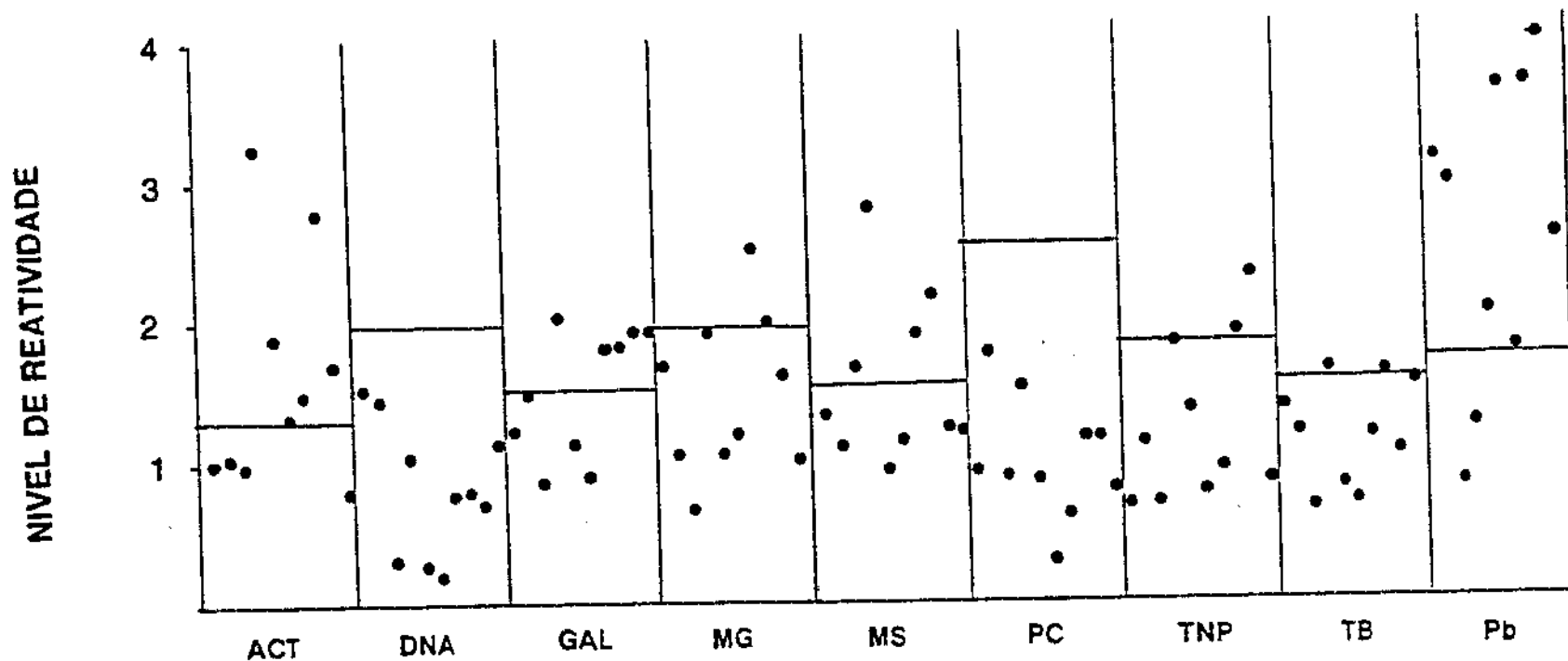


FIGURA 16 - PCM crônica (n=10). Reatividade dos anticorpos da classe IgG contra os antígenos do painel. Os soros foram testados individualmente e a reação de ELISA revelada com um conjugado antilgG humana marcado com peroxidase. A barra representa a média de reatividade de 10 soros humanos normais mais dois desvios-padrão

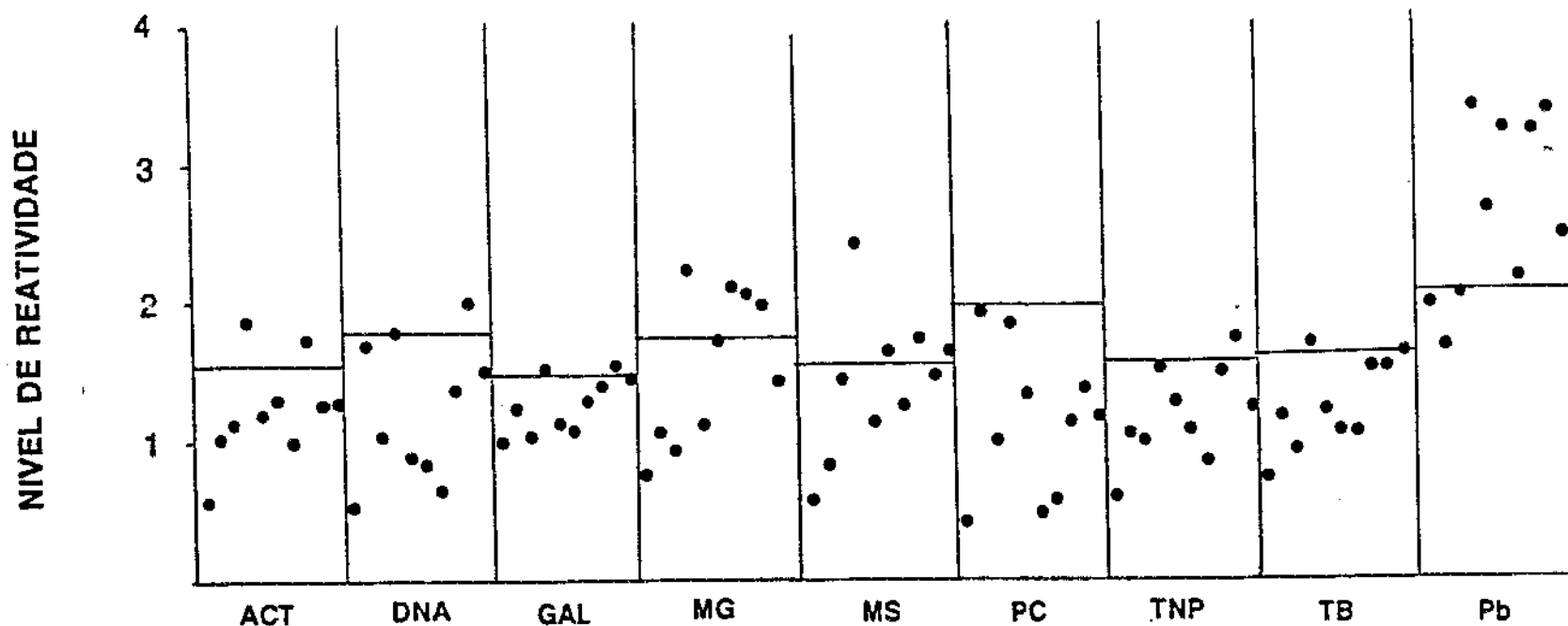


FIGURA 17 - PCM crônica (n=10). Reactividade dos anticorpos presentes nos ICC após dissociação com ácido. Os anticorpos foram testados numa diluição 1/60 e a reação de ELISA revelada com um conjugado antiIgG humana marcado com peroxidase. A barra representa a média de reatividade de 10 soros humanos normais mais dois desvios padrão

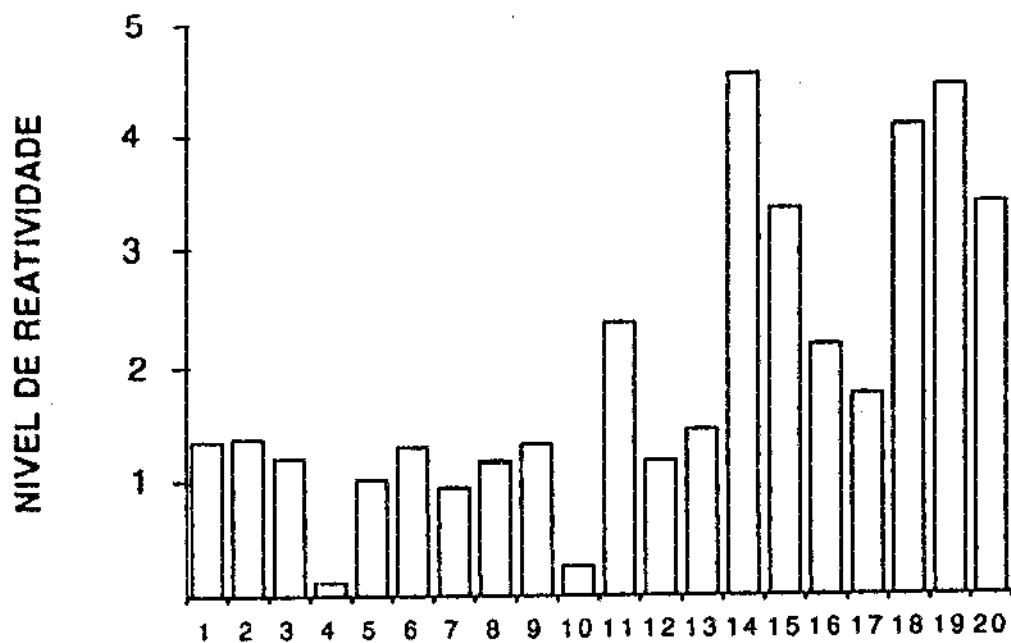


FIGURA 18 - PCM crônica. Reatividade dos anticorpos presentes nos ICC para a glicoproteína de 43 kDa, após dissociação com ácido. SHN (1 a 10), PCM (11 a 20). A reação de ELISA foi revelada com um conjugado antiIgG humana marcado com peroxidase.

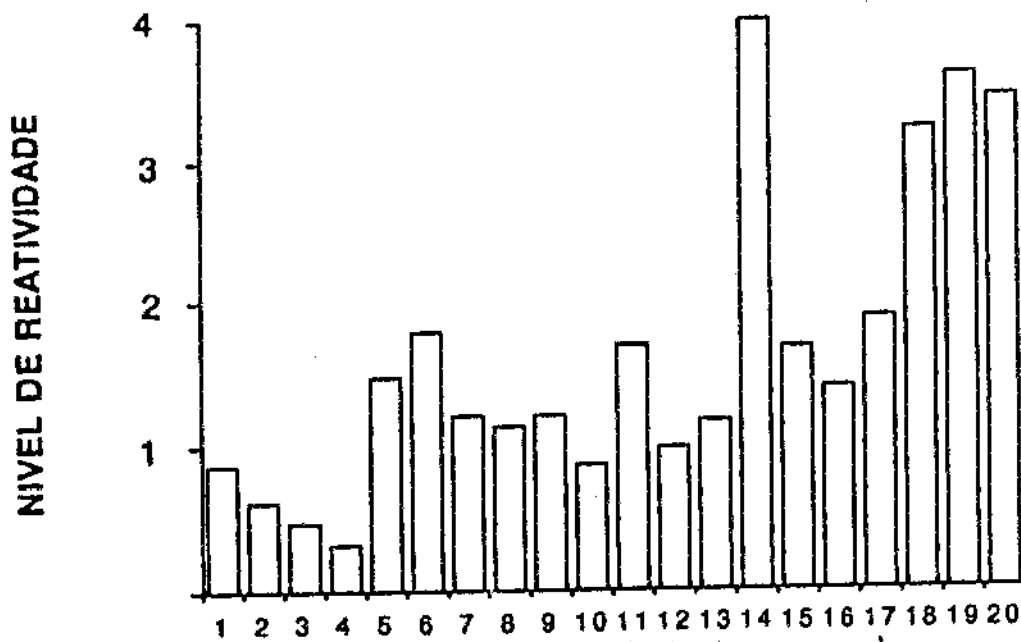


FIGURA 19 - Reatividade dos anticorpos presentes nos ICC para a glicoproteína de 70 kDa, após dissociação com ácido. SHN (1 a 10), PCM (11 a 20). A reação de ELISA foi revelada com um conjugado antiIgG humana marcado com peroxidase.

Tabela 3
Hipergamaglobulinemia e anticorpos naturais na
Paracoccidioidomicose

	IgGg/l (x)	ACT	DNA (y)	GAL	Pb
1	9.0	1,0	1,5	1,2	3,3
2	10.2	1,0	1,4	1,4	3,2
3	11.9	0,9	0,3	0,8	1,6
4	37.7	3,2	1,0	2,0	1,9
5	12.5	1,8	0,2	1,1	2,5
6	11.3	1,3	0,2	0,9	3,7
7	11.3	1,4	0,7	1,8	2,3
8	22.6	2,7	0,8	1,8	3,7
9	16.9	1,7	0,7	1,9	4,0
10	13.7	0,7	1,1	1,9	2,9
R	(x/y)	0,887	0,064	0,586	0,224

Valores normais: IgG = 8,02 a 17,6g/l, X) Concentração sérica de IgG, y) Nível de auto-reatividade na reação de ELISA, R) Correlação

6 DISCUSSÃO

O soro humano normal contém anticorpos poliespecíficos conhecidos como anticorpos naturais e/ou auto-anticorpos naturais (Avrameas et al.¹³ 1981; Guilbert et al.⁵² 1982; Lutz & Wipf⁸¹ 1982; Galili et al.^{47,48} 1984, 1985; Lutz et al.⁸² 1987). Estas imunoglobulinas, aparentemente sintetizadas sem qualquer estímulo antigênico, estão presentes nos soros de diferentes espécies animais como coelhos, camundongos, ratos e peixes e apresentam uma propriedade particular de reagir com antígenos exógenos e com constituintes do próprio organismo (Karsenti et al.⁶⁴ 1977; Avrameas et al.¹² 1991; Gonzalez et al.⁵¹ 1988). Cunningham & Swerlick³⁶ (1986) estudando anticorpos monoclonais anti-*Streptococcus pyogenes* observaram que eram poliespecíficos. Um destes anticorpos reagia com miosina, DNA e polinucleotídeos sintéticos e o outro com miosina, queratina e actina, uma família de proteínas com estrutura α helicoidal.

Neste trabalho examinamos o nível dos anticorpos naturais presentes nos soros de indivíduos cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. Para isso, utilizamos um painel de antígenos, comumente empregado no estudo de doenças auto-imunes. Nossos resultados, em relação a doença de Chagas, mostram um nítido aumento dos níveis dos anticorpos naturais das classes IgG e IgM dirigidos contra os antígenos do painel; achado que confirma as observações feitas por Ternynck et

al.¹²⁶ (1990) em camundongos híbridos (C57BL/6 x BALB/C) infectados pela cepa CL de *T. cruzi*. Carlier et al.²⁸ (1987) também observaram fenômeno idêntico em camundongos Balb/c infectados pelo mesmo parasita. Os autores detectaram altos níveis de anticorpos anti-ssDNA, fatores reumatóides e imunocomplexos circulantes.

Elevação transitória dos anticorpos naturais também foi observada na malária murina, onde eritrócitos normais induziram uma resposta anamnésica em camundongos infectados e, posteriormente, tratados pela cloraquina (Ternynck et al.¹²⁷ 1991). Este aumento secundário dos níveis de anticorpos naturais era acompanhado por uma elevação dos anticorpos específicos anti*P. chabaudii*.

Nossos achados também confirmam trabalhos anteriores que demonstraram a presença de auto-anticorpos na doença de Chagas (Cossio et al.³³ 1974; Khoury et al.⁶⁹ 1979; Wood et al.¹⁴¹ 1982). Ouassi et al.⁹⁹ (1988) identificaram um auto-anticorpo com atividade antiacetilcolinesterase, enfatizando que a enzima em questão e *T. cruzi* compartilhavam um epítipo de natureza sacarídica. Sterin-Borda et al.¹²³ (1988) detectaram anticorpos contra receptores β adrenérgicos, mostrando que se tratava de um auto-anticorpo distinto daquele dirigido contra endocárdio, vasos e tecido intersticial (sistema EVI).

Nosso objetivo principal, ao iniciar este trabalho, era traçar um perfil das especificidades presentes nos soros

chagásicos e identificar uma especificidade que fôsse predominantemente reconhecida pela maioria dos soros. Entretanto, uma notável variabilidade de resposta foi observada no grupo experimental. Alguns soros reagiam com diferentes especificidades, enquanto outros apresentavam um padrão de reatividade mais restrito.

Analisando a reatividade dos soros chagásicos para antígenos homólogos e heterólogos verificamos, que uma superestimação de anticorpos antimiosina podia ocorrer, quando se utilizava miosina de procedência animal, o mesmo não acontecendo em relação aos outros antígenos. Nenhuma análise deste gênero foi realizada anteriormente.

Hipergamaglobulinemia estava presente em alguns soros chagásicos analisados, mas não houve uma correlação entre níveis elevados de imunoglobulinas e a auto-reatividade. Indivíduos com níveis normais ou pouco elevados apresentavam, muitas vezes uma reatividade exacerbada contra os antígenos do painel. Achados semelhantes foram encontrados por Argov et al.⁷ (1989) na leishmaniose, onde anticorpos para antígenos nucleares, tais como, Sm, RNP, SS-A e SS-B foram demonstrados na forma cutânea, onde a hipergamaglobulinemia não é um achado característico.

O achado de níveis elevados de anticorpos naturais na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* sugere uma ativação policlonal, persistente, de células B, que pode representar o passo inicial para a desregulação do sistema, induzindo

fenômenos de auto-imunidade. Minoprio et al.⁹¹ (1987) mostraram que esta ativação policlonal depende de células T auxiliares, pois o anticorpo monoclonal GK-1.5 (antiL3T4) foi capaz de abolir completamente a síntese de imunoglobulinas pelas células B esplênicas, dos camundongos C57BL/6 infectados pela cepa CL de *T. cruzi*. Soma-se a esta observação, a recente descoberta de uma citocina, denominada ETA-1, que se liga a macrófagos e células B, mantendo estas células em estado de constante ativação. A citocina ETA-1 é sintetizada por células T com o fenótipo CD1+CD45R+CD4-CD8-. Estas células possuem receptores de antígeno do tipo α/β e se originam tarde na ontogenia dos precursores CD4+. A citocina ETA-1 foi caracterizada em camundongos MRL/l, um modelo murino que desenvolve uma doença auto-imune sistêmica, com características de LES e AR (Patarca et al.¹⁰⁰ 1990; Lampe et al.⁷⁴ 1991).

O aumento dos anticorpos naturais observado em certas doenças infecciosas pode estar associado a presença de ativadores policlonais de células B, presentes no microrganismo, mas também a um certo grau de mimetismo molecular (Oldstone⁹⁸ 1987). É provável que agentes infecciosos que compartilham antígenos em comum com o hospedeiro induzam uma elevação persistente destes anticorpos, que se manteria durante a fase crônica da infecção (Bretaña et al.¹⁹1986; Winograd et al.¹⁴⁰1987). Ao contrário, organismos antigenicamente distintos do

hospedeiro, acarretariam uma elevação transitória dos anticorpos naturais, como parte de uma resposta imune específica (Guilbert et al.⁵³ 1985; Casali & Notkins³⁰ 1989). Entretanto, estes níveis não se manteriam elevados durante a fase crônica da infecção.

Neste trabalho, 80% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* apresentavam anticorpos para laminina de camundongo. Laminina é uma glicoproteína que promove a ligação de células endoteliais e epiteliais ao colágeno tipo IV. É diferente de fibronectina e nidogen e contém muitas unidades terminais de Gal α 1,3Gal (Timpl et al.¹²⁸ 1979; Towbin et al.¹²⁹ 1987). Anticorpos para esta glicoproteína foram descritos pela primeira vez por Szarfman et al.¹²⁴ (1982) nos soros de pacientes chagásicos e de macacos infectados pelo *T. cruzi*. Segundo Szarfman et al.¹²⁴ (1982) estes anticorpos não são encontrados em soros de camundongos, sendo característicos de primatas. De fato, examinamos trinta soros de camundongos F1(C57BL/6 X BALB/C), cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, e em nenhuma amostra detectamos estes anticorpos (dados não mostrados).

O mimetismo molecular pode ser evocado em relação aos anticorpos antilaminina, graças a identificação de uma proteína "como laminina" em tripomastigotas de *T. cruzi* e em amastigotas e promastigotas de *Leishmania spp* por Bretaná et al.¹⁹ (1986). Utilizando uma técnica de imunocitoquímica

aliada a microscopia eletrônica, estes autores mostraram que esta proteína é estágio-específica naqueles parasitas.

Anticorpos para determinantes crípticos da banda 3 estão envolvidos na remoção de eritrócitos senescentes da circulação (Lutz et al.⁸⁰ 1984; Lutz et al.⁸² 1987; Kay⁶⁸ 1984). Estes anticorpos estão presentes na fração IgG do soro humano normal e possuem segundo Galili et al.^{47,48} (1984 e 1985) especificidade para resíduos de Gal α 1,3Gal.

Em nossa casuística 68,7% dos SCH tinham anticorpos da classe IgG para a banda 3, e 35% tinham anticorpos IgM. Quando testamos o polipeptídeo de 62 kDa, derivado da Banda 3, 78,7% dos soros deram resultados positivos. A análise dos aumentos observados para estas duas especificidades mostrou que existia uma correlação razoável, entre os anticorpos antibanda3 e anti-62 kDa ($R=0,711$). A falta de 100% de correlação entre os anticorpos estudados não é surpreendente, pois diferentes epítopos podem estar presentes nas moléculas de banda 3 e 62 kDa. Além disso, a degradação da molécula de banda 3, por proteinases endógenas pode expor determinantes, que não aparecem na molécula intacta. Lipham et al.⁷⁷ (1991) demonstraram que peptídeos crípticos, imunopatogênicos, do interfotoreceptor da retina, não podiam ser gerados "in vitro", por células apresentadoras de antígenos. Isto significa que a degradação *in vivo* por endoproteinases produz fragmentos peptídicos diferentes.

A natureza química dos epítomos reconhecidos pelos anticorpos antibanda 3 não foi estabelecida, mas é bem provável que se trate em parte de resíduos de carboidrato, pois a ligação destes anticorpos à fase sólida foi inibida, em 25%, por melibiose (dados não mostrados). Portanto, se parte dos anticorpos reativos com a banda 3 são dirigidos a epítomos de galactose, uma correlação deveria ser esperada com laminina, como de fato observamos ($R=0,811$). Níveis elevados de anticorpos antiGal também foram relatados na malária humana, onde Ravidran et al.¹⁰⁵ (1988) observaram uma predominância da subclasse IgG₃ em indivíduos infectados, enquanto os controles, de região não endêmica, tinham principalmente, IgG₂. Segundo Winograd et al.¹⁴⁰ (1987) eritrócitos infectados pelo *P. falciparum* expressam o antígeno de eritrócitos senescentes e, ligam-se a anticorpos IgG presentes no soro humano normal.

O polipeptídeo de 62 kDa isolado neste trabalho tem o mesmo peso molecular que o antígeno de eritrócitos senescentes, descrito por Kay⁶⁸ (1984) e reage com anticorpos específicos para a banda 3.

Anticorpos IgG antitubulina foram encontrados em 38,75% do grupo examinado e IgM antitubulina em apenas 6,25%. Estes resultados diferem daqueles obtidos no modelo murino, onde Ternynck et al.¹²⁶ (1990) observaram altos níveis de anticorpos antitubulina um ano após a infecção inicial. Os anticorpos derivados de camundongos infectados

apresentavam uma constante de afinidade superior à dos anticorpos antitubulina naturais. Além disso, os anticorpos induzidos, pela infecção chagásica, reconheciam epítopos diferentes daqueles reconhecidos pelos anticorpos antitubulina presentes em soros murinos normais. Estes achados, aliados às nossas observações, indicam que embora o modelo murino seja extremamente útil no estudo da infecção chagásica, não deve ser tomado como referência quando o objetivo é estudar o repertório de especificidades expressas pelas células B humanas.

Anticorpos IgG anti-dfDNA foram detectados em 73,75% dos indivíduos do grupo SCH. Esta especificidade também foi uma das mais representadas entre os anticorpos IgM, juntamente com antiespectrina (55%).

Anticorpos anti-dfDNA podem ser frequentemente demonstrados em pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico (Fadhel et al.⁴⁴ 1987; Matsiota et al.⁸⁸ 1987) e em camundongos auto-imunes (Hentati et al.⁵⁷ 1991).

Neste trabalho, utilizando um imunoadsorvente comprovadamente eficiente na purificação de anticorpos anti-dfDNA e soros com altos títulos destes anticorpos, não fomos capazes de demonstrar uma alta reatividade antiDNA na fração eluída da coluna. Os anticorpos isolados reagiam fracamente com DNA e fortemente com laminina.

Segundo Mackworth-Young & Schwartz⁸⁴ (1988) anticorpos antiDNA reconhecem três tipos de epítopos na

molécula de DNA; o arcabouço, as bases e porções do arcabouço mais bases. Os anticorpos antiDNA não reconhecem bases individuais, mas epítopos mais complexos compostos pelo arcabouço mais bases. A reatividade cruzada de anticorpos antiDNA com fosfolípidos e proteoglicanos, sugere a participação de grupamentos fosfato na formação de certos determinantes (grupos fosfodiéster). A polirreatividade é uma característica marcante de anticorpos antiDNA, derivados do soro ou de sobrenadantes de hibridomas. O espectro de ligação destas imunoglobulinas inclui, proteínas do citoesqueleto, fosfolípidos, imunoglobulinas, plaquetas, polissacarídeos e componentes da matrix extracelular, tais como fibronectina (Mackworth-Young & Schwartz⁸⁴ 1988). Matsiota et al.⁸⁸ (1987) estudando anticorpos eluídos de biópsias renais de pacientes com glomerulonefrite lúpica observaram reatividade cruzada entre DNA e TNP.

Hentati trabalhando com anticorpos eluídos de rins de camundongos F1(NZB X NZW), observaram ao lado da especificidade antiDNA, forte reatividade com laminina (comunicação pessoal). Este fenômeno é curioso, pois, como discutido anteriormente, anticorpos antilaminina não são encontrados nos soros de camundongos.

Para Brikman et al.²¹ (1989) a polirreatividade de anticorpos antiDNA são artefatos devidos a complexos de DNA-antiDNA nas preparações analisadas.

Não concordamos com esta afirmativa, pois trabalhando com anticorpos antiDNA e diferentes procedimentos, como o preconizado por Kanai et al.⁶³ (1989) para dissociar imunocomplexos, não observamos alterações de reatividade (dados não mostrados). Todavia, acreditamos que somente o tratamento com DNAase poderia esclarecer definitivamente este ponto.

Reatividade cruzada de anticorpos IgG antiDNA com TNP não pode ser evocada neste trabalho pois, como já discutido, a reatividade para este hapteno foi baixa na amostra analisada (11,25%). Curiosamente, os anticorpos antiTNP foram detectados por anticorpos monoclonais específicos para subclasses de IgG, enquanto outras especificidades (exceção de anti*T. cruzi* e antilaminina) não eram detectadas a menos que se procedesse ao isolamento da fração IgG em Proteína-A-Sepharose.

Neste trabalho, IgG antiTNP pertencia, principalmente, a subclasse IgG4. IgG4 representa cerca de 4% da fração de IgG total, todavia a contribuição de IgG4 na resposta de IgG total varia consideravelmente para alguns antígenos (Van der Zee et al.¹³⁵ 1986). Títulos significantes são encontrados após estimulação antigênica persistente e após terapia de hipossensibilização (Aalberse et al.¹ 1983). Concentrações dez vezes superiores aos valores normais foram encontradas por Boctor & Peter¹⁸ (1990) em pacientes com esquistossomose crônica. IgG4 não ativa o sistema

complemento e pode inibir a precipitação e a ativação induzida por IgG₁.

Ainda não sabemos qual a importância dos níveis elevados de IgG₄ antiTNP no grupo SCH, mas a presença de IgG₄ nos imunocomplexos circulantes poderia proteger contra a ação de outras subclasses, capazes de ativar o complemento e de induzir lesões teciduais. Isto poderia explicar, porque as glomerulopatias não são frequentes em indivíduos cronicamente infectados pelo *T.cruzi*. Em camundongos (C3H-HeJ), cronicamente infectados pelo mesmo parasita, Costa et al.³⁴ (1991) descreveram uma glomerulopatia mesangial, induzida por complexos imunes contendo antígenos do parasita e fatores reumatóides, do tipo IgG.

A alta porcentagem de soros positivos para laminina e, o frequente encontro desta especificidade nos ICC, levou-nos a suspeitar da existência de complexos imunes contituidos por anticorpos antilaminina.

Para esclarecer este ponto utilizamos a cromatografia de afinidade em Proteína-A-Sepharose, procedendo a uma eluição prévia com galactose e/ou melibiose. Este procedimento mostrou que anticorpos IgG reativos com laminina, podiam ser eluídos, com o carboidrato da Proteína A, a partir de soros normais e de chagásicos. A análise de subclasses mostrou que nos soros chagásicos estes anticorpos pertenciam, principalmente a subclasse IgG₃.

O achado de anticorpos antilaminina na fração eluída com carboidrato deve ser interpretado com muito cuidado, pois anticorpos antiagarose estão presentes em soros humanos normais e poderiam reagir com a matriz da coluna. A Sepharose é um polímero constituído por unidades repetitivas de D-Gal3,6-anidro-L-Gal. Segundo Hamilton & Adkinson⁵⁵ (1985) anticorpos antiagarose podem ser induzidos por componentes da dieta (algas) e por polissacarídeos de microrganismos da microbiota intestinal, e representam um sério problema para os ensaios imunológicos utilizando agarose e/ou celulose como fase sólida. Para contornar este problema fizemos diferentes controles, entre os quais, uma pré-absorção com Sepharose. Os anticorpos eluídos com carboidrato, após esta pré-absorção, também reagiram com laminina. Assim, sugerimos três possibilidades para explicar este achado. Em primeiro lugar estes anticorpos poderiam estar complexados pelo seu Fab a um outro anticorpo ligado à Proteína A (via região Fc de IgG, ou via sítio combinatório). O primeiro tipo de ligação pode ocorrer com anticorpos apresentando atividade de FR, e o segundo com anticorpos antiidiotípicos.

Anticorpos da classe IgG, com atividade de FR, já foram demonstrados nos rins de camundongos infectados pelo *T. cruzi* (Costa et al.³⁴ 1991) e anticorpos antiidiotípicos também foram caracterizados em soros murinos, de tripanosomíase africana e em soros humanos normais (Rose et

al.¹¹⁰ 1982; Rossi & Kazatchkine¹¹² 1989). Outra explicação possível seria a ligação direta destes anticorpos pelo seu Fab à Proteína A. Segundo Sasso et al.¹¹⁵ (1990) a Proteína A de *S. aureus* possui, além de sua bem conhecida afinidade pelo fragmento Fc γ , dois ou mais sítios alternativos de ligação com afinidade para a região Fab de certas IgM, IgA, IgG, IgE. Esta afinidade é altamente restrita a moléculas de imunoglobulinas contendo cadeias pesadas do subgrupo VHIII, codificadas pelos genes da linhagem germinativa. Como os anticorpos naturais também são codificados pelos genes da linhagem germinativa, existe uma boa possibilidade daqueles anticorpos de pertencerem ao subgrupo VHIII.

Complexos imunes circulantes aparecem numa variedade de condições patológicas e numa grande maioria dos casos não guardam uma relação óbvia com um antígeno (doenças auto-imunes, mononucleose infecciosa, tripanosomíase) (Rose et al.¹¹⁰ 1982). A persistência destes complexos na circulação está frequentemente associada a uma intensa ativação policlonal de células B.

Nossos achados sugerem que a ativação policlonal de células B, induzida por *T. cruzi*, leve a proliferação de clones produzindo anticorpos antiGal natural e provavelmente de seu antiidiótipo; e, que estas duas populações possam, então, interagir formando complexos imunes. O achado de antilaminina como principal especificidade dos ICC reforça esta hipótese.

O estudo dos anticorpos naturais na PCM sugere um padrão mais restrito de especificidades, com um predomínio dos anticorpos específicos anti*P. brasiliensis*. A elevação de antiGal nos soros de alguns destes pacientes era esperada, pois este anticorpo natural é o mais representado, em termos quantitativos, nos soros humanos normais (Galili et al.⁴⁷ 1984). Assim, uma ativação policlonal de células B se traduz automaticamente em elevação dos níveis de IgG antiGal natural (Avrameas¹² 1991; Unterkircher et al.¹³⁴ 1993).

Os níveis pouco elevados de anticorpos naturais nos primeiros vinte casos de PCM crônica estudados, podem ser atribuídos a amostra analisada (forma clínica?). É possível que alguns dos pacientes da segunda amostra sejam portadores de formas clínicas mais graves. Também, não podemos excluir a possibilidade, que o tratamento quimioterápico possa ter influenciado nossos resultados. O achado mais frequente de níveis elevados de anticorpos naturais na PCM juvenil associa este padrão de resposta a doença disseminada. É provável que o exame de pacientes, virgens de tratamento, e com a forma severa de PCM crônica também revele o mesmo perfil sorológico.

Outro fato que nos chamou a atenção foram os aumentos pouco expressivos dos anticorpos naturais encontrados na forma crônica PCM, quando comparados com aqueles detectados na doença de Chagas.

Na amostra total analisada (n=40), não detectamos anticorpos antidfDNA, resultado que está de acordo com Argov et al.⁷(1989) que também não detectaram esta especificidade, em pacientes com leishmaniose mucocutânea crônica. Anticorpos para ssDNA, frequentemente observados na malária, na tripanosomíase e na leishmaniose, não foram pesquisados neste trabalho. Também é importante frisar que os resultados observados na análise dos anticorpos antidfDNA por ELISA, não podem ser comparados aos de outros autores, utilizando a imunofluorescência com *Crithidia lucillae*, pois os resultados obtidos pelas duas técnicas, não se correlacionam (Fadhel et al.⁴⁴ 1987).

O alto conteúdo de carboidratos presentes na parede de *P. brasiliensis*, deve ter um papel decisivo na resposta imune humoral observada nesta micose. A intensa glicosilação das proteínas de superfície deve exigir uma resposta mais elaborada por parte das células B CD5-, que sintetizam principalmente anticorpos monoespecíficos (Nawata et al.⁹⁵ 1990).

O achado de níveis normais e/ou pouco elevados de anticorpos antifosforilcolina na doença de Chagas e na PCM pode significar que esta especificidade de anticorpo natural, não é tão importante no homem quanto no camundongo, onde protege contra infecções causadas por pneumococos (Briles et al.²⁰ 1992).

A presença de ICC nos soros de pacientes com PCM foi descrita por Arango et al.⁵ (1982). Posteriormente, Arango & Yarzabal⁶ (1982) demonstraram a presença nestes soros de Hiperimmunoglobulinemia E. Recentemente, Chequer-Bou-Habib et al.³¹ (1989) utilizando duas técnicas diferentes evidenciaram grande quantidade de imunocomplexos circulantes em 53,6% dos soros de PCM examinados.

Creighton et al.³⁵ (1973) foram os primeiros a observar que o PEG precipitava as proteínas séricas sem desnaturá-las, mas foram Digeon et al.³⁹ (1977) que estabeleceram as principais diretrizes a serem seguidas para se obter uma precipitação seletiva de ICC. Depois, Olson & Zetterstrand⁹⁷ (1985) associaram a reação de ELISA, com a finalidade de estudar os anticorpos presentes e finalmente Louzir et al.⁷⁹ (1988) demonstraram que a dissociação com ácido, seguida de neutralização poderia aumentar a quantidade de anticorpos livres, intensificando desta forma a sensibilidade do método.

Não conseguimos isolar os ICC, utilizando a técnica de precipitação com PEG 2,5%, preconizada por Ohlson & Zetterstrand⁹⁷ (1985). Provavelmente, porque os complexos, na PCM, têm características físico-químicas diferentes daquelas encontradas nos ICC observados nas infecções causadas por parasitas e nas doenças auto-imunes. A ausência, na literatura, de trabalhos sobre lesões teciduais devidas a ICC na PCM, apoiam esta premissa. A indução de lesões teciduais está relacionada a possibilidade de

deposição dos IC em certos locais, como no glomérulo renal e nas articulações. De acordo com Gauthier & Mannik⁴⁹ (1990) a deposição depende da presença ou não no IC de uma certa porcentagem de anticorpos catiônicos, sugerindo que no decorrer de uma doença crônica, como no LES, os ICC modificam-se em termos qualitativos.

A formação de IC *In situ*, também foi demonstrada nas glomerulonefrites, onde anticorpos antiDNA de alta afinidade ligam-se ao DNA retido na membrana basal glomerular e/ou a antígenos presentes neste local, induzindo diferentes graus de disfunção (Devey et al.³⁸ 1988; Raz et al.¹⁰⁶ 1989). Elevação transitória dos anticorpos séricos antiDNA, com alteração de sua afinidade funcional podem antecipar um agravamento de doença renal (Devey et al.³⁸ 1988).

Neste trabalho utilizamos uma concentração de 10% de PEG, para isolar os ICC. Esta mesma concentração foi usada, num outro protocolo, por Kaveri et al.⁶⁷ (1990), para a caracterização de anticorpos que se autocomplexam "autobodies". Os anticorpos murinos antifosforilcolina (T15), codificados pelo gene V1 de cadeia pesada da família S107, tem uma propriedade única de autocomplexar. A formação destes complexos envolve o Fab destas imunoglobulinas. Segundo Kaveri et al.⁶⁶ (1990) um peptídeo derivado da região V destes anticorpos inibe esta autoligação. Uma sequência de 23 aminoácidos dentro do CDR2/FR3 está implicada na formação destes homodímeros. Anticorpos específicos para

este peptídeo já foram identificados no soro humano, embora não se conheça sua especificidade em termos de antígeno. Estas imunoglobulinas humanas também formam homodímeros e apresentam um idiótipo de reação cruzada com os anticorpos murinos antifosforilcolina (T15). Kaveri et al.⁶⁷ (1990) mostraram ainda, que o meio sérico não interferia na precipitação destes complexos com PEG 10%.

Nossos resultados, utilizando esta concentração de PEG, mostraram que esta técnica pode ser adaptada para a pesquisa de imunocomplexos em soros humanos, embora não se possa fazer qualquer referência a respeito de autoligação. Se anticorpos com estas características estão presentes nos soros estudados, outros experimentos serão necessários para caracterizá-los.

Na nossa amostra encontramos soros com sorologia negativa e ICC positivos, todavia nenhuma análise estatística foi realizada quanto a este aspecto. Esta observação apoia a tese de precipitação seletiva e sugere que uma sorologia negativa possa realmente refletir a presença de complexos, contendo aquela especificidade de anticorpo. Yamashita¹⁴² (1992) utilizando a precipitação com PEG a 2,5% caracterizou ICC nos soros de pacientes com hanseníase. As formas multibacilares continham quantidades maiores de complexos, formados com anticorpos das classes IgG e IgM contra dois antígenos de natureza lipídica: um

glicofosfolípídeo e um sulfolípídeo. Já nas formas paucibacilares, os resultados desta prova foram variáveis.

O achado de uma correlação positiva entre o antiGal sérico e antiGal nos ICC, apenas coloca esta especificidade em posição de destaque entre os anticorpos naturais.

Como não pesquisamos a presença de ICC na PCM juvenil, a redução observada nos níveis de IgM antiTNP continuam sem explicação. Diminuição dos níveis de anticorpos naturais também foi observada em algumas doenças psiquiátricas, como na esquizofrenia e na anorexia nervosa (Avrameas, comunicação pessoal).

Detectamos nos ICC, anticorpos da classe IgG para antígenos solúveis de *P. brasiliensis*, gp43 e fração de 70 kDa. De acordo com Heyman⁵⁸ (1990) complexos desta natureza estimulam a síntese de IgG específica ou por estímulo direto de células B, via receptores CR1 e CR2, ou por localizarem de forma adequada o antígeno sobre as células foliculares dendríticas dos centros germinativos. O achado de imunocomplexos, contendo anticorpos para antígenos solúveis de *P. brasiliensis*, mostra porque os títulos de anticorpos específicos mantêm-se elevados durante os períodos de atividade da doença (Vaz et al.¹³⁸ 1992). Como já foi demonstrado por Mendes-Gianini et al.⁹⁰ (1988), durante os períodos de atividade da doença, a gp43 encontra-se disponível na circulação, facilitando assim a formação de imunocomplexos.

Os anticorpos específicos anti*P.brasiliensis* foram encontrados, principalmente na subclasse IgG₁. IgG₁ também é a principal subclasse dos anticorpos antivírus. Na fase precoce da infecção pelo citomegalovírus, os anticorpos antivirais pertencem a subclasse IgG₃, mas esta distribuição modifica-se mais tarde, durante o período de convalescença, quando são encontrados, principalmente na subclasse IgG₁ (Linde et al.⁷⁵ 1983). Em pacientes com imunodeficiência variável comum a administração de imunoglobulinas, por via intramuscular e/ou venosa, eleva os títulos de IgG₁ específica para os herpes vírus; enquanto os níveis de IgG₃ caem ou permanecem inalterados (Linde et al.⁷⁶ 1988).

Neste estudo anticorpos da subclasse IgG₃ foram raramente encontrados entre os anticorpos específicos, enquanto IgG₄ aparecia num número maior de casos, e se correlacionava com os níveis de IgG₁.

IgG₄, além de refletir uma imunização de longa duração, é uma das principais subclasses entre os anticorpos bloqueadores, que impedem a ligação de IgE a seus receptores específicos em mastócitos e basófilos. Assim, IgG₄ exerce uma ação protetora, impedindo reações de hipersensibilidade do tipo I.

Na esquistossomose crônica, Boctor et al.¹⁸ (1990) detectaram altos níveis de IgE e IgG₄. IgG₄ tinha aumentado de 3% para 30% nestes pacientes e apenas 4,7% deste total era específica para *S. mansoni*.

A expressão das subclasses de IgG está, em parte, associada com a localização e com a sequência de transcrição dos genes C_H de imunoglobulinas no DNA ($5'\gamma3-\gamma1-\psi\epsilon1-\alpha1-\gamma2-\gamma4-\epsilon-\alpha2$) (Flanagan & Rabbitts⁴⁵ 1982). Todavia, trabalhos recentes demonstram que a expressão dos diferentes isótipos e subclasses de imunoglobulinas é fortemente influenciada pelas interleucinas derivadas de células T auxiliares (TH₁ e TH₂) (Mossman & Coffman⁹³ 1987). Células B murinas estimuladas pelo LPS sintetizam IgE e IgG₁ na presença de IL4 (Coffman et al.³² 1988). No homem, IL4 estimula a síntese de IgE, que está como vimos anteriormente, altamente ligada à expressão de IgG₄ (Romagnani¹⁰⁹ 1991).

Neste estudo hipergamaglobulinemia foi encontrada em alguns soros, resultados que estão de acordo com Arango & Yarzarbal⁶ (1982) e Sassine et al.¹¹⁴ (1985).

Uma correlação importante foi observada entre as concentrações séricas de imunoglobulinas e os níveis dos anticorpos antiactina, sugerindo a necessidade de estudar melhor esta relação em pacientes com a forma juvenil.

Na esquistossomose crônica as concentrações de IgG variam consideravelmente de 1,15g/dl a 4,4g/dl (Boctor & Peter¹⁸ 1990). Na leishmaniose, os níveis de imunoglobulinas variam de normais, na forma cutânea, a elevados, na forma visceral (Argov et al.⁷ 1989).

O achado de níveis aumentados de anticorpos naturais, em alguns pacientes com PCM crônica e na forma juvenil, sugere uma associação com o quadro clínico, que deverá ser melhor investigada. Além disso, será necessário analisar futuramente, um número maior de pacientes, virgens de tratamento, para poder estabelecer de forma definitiva, se os aumentos observados neste trabalho são de fato devidos a infecção pelo *P. brasiliensis*. Acreditamos, que a pesquisa de anticorpos naturais na PCM, possa dar uma informação útil sobre o estado de ativação do sistema imune, em pacientes com formas graves da doença.

7 CONCLUSÕES

O estudo dos anticorpos naturais na doença de Chagas mostrou que indivíduos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* apresentam altos níveis de anticorpos naturais. Na pesquisa destes anticorpos proteínas de procedência animal podem ser utilizadas, desde que se leve em conta que superestimulações podem ocorrer em relação a miosina animal.

Na doença de Chagas a principal especificidade de anticorpo natural era IgG antilaminina, que também estava envolvida na formação de imunocomplexos nos SCH. Os níveis elevados de IgG antilaminina correlacionavam-se, de forma marcante, com IgG antibanda 3 e anti-62 kDa, sugerindo a expansão de clones de células B sintetizando anticorpos naturais, alguns dos quais devem estar envolvidos na remoção de eritrócitos senescentes da circulação.

A especificidade antilaminina estudada deve envolver, ao que tudo indica, epítopos de carboidrato que podem ser terminações do tipo Gal α 1,3Gal, presentes em grandes quantidades na molécula de laminina de camundongo. Em IgM, todas as especificidades aumentadas estavam correlacionadas com antilaminina.

Elevação dos anticorpos naturais também foi observada na PCM, onde estava principalmente associada a quadros clínicos de natureza disseminada, como na forma juvenil da doença. IgG antiactina era a principal especificidade nestes casos.

A forma crônica de PCM não estava ligada a uma especificidade em particular. Anticorpos naturais reativos com actina, epítomos Gal α 1,3Gal, miosina e mioglobina foram observados em alguns soros.

Anticorpos naturais foram raramente observados nos complexos imunes da PCM, onde predominavam os anticorpos específicos anti*P.brasiliensis*, que pertenciam principalmente a subclasse IgG₁.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

1. AALBERSE, R. C., VAN DER GAAG, R., VAN LEEWEN, J.
Serological aspects of IgG4 antibodies.I.Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *J.Immunol.*, v.130, p.722-6, 1983.
2. ALMEIDA,I.et al.Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti- α -galactosyl antibodies. *J.Immunol.*, v.146, p.2394-400, 1991.
3. ANSORGE,W. Fast visualization of protein bands by impregnation in potassium permanganate and silver nitrate.In: *Electrophoresis 82*. 1983. Berlin: D Stathakos Walter de Gruyter, p.235-42.
4. ANTIN, J. R. et al. Leu-1+ (CD5+)B-cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: phenotypic and functions.*J. Immunol.*, v.136, p.505-10, 1986.
5. ARANGO, M. et al. Circulating immune complexes and in vitro cell reactivity in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, v.79, p.153-8, 1982.
6. ARANGO, M., YARZABAL, L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, v.79, p.115-24, 1982.

7. ARGOV, S. et al. Autoantibody production by patients infected with *Leishmania*. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 76, p.190-7, 1989.
8. AVILA, J. L., ROJAS, M., GARCIA, L. Persistence of elevated levels of galactosyl- α (1-3)galactose antibodies in sera from patients cured of visceral Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 26, p.1842-7, 1988.
9. AVILA, J. L., ROJAS, M., RIEBER, M. Antibodies to laminin in American cutaneous Leishmaniasis. *Infect. Immun.*, v.43, p.402-6, 1984.
10. AVILA, J. L., ROJAS, M., TOWBIN, H. Serological activity against galactosyl- α (1-3) galactose in sera from patients with several Kinetoplastidea infections. *J. Clin. Microbiol.*, v.26, p.126-32, 1988.
11. AVILA, J. L. et al. Antibodies to basement membrane proteins nidogen and laminin in sera from streptococcal-related diseases and juvenil rheumatoid arthritis patients. *Clin. Exp. Immunol.*, v.70, p. 555-61, 1987.

12. AVRAMEAS,S. Natural autoantibodies: from horror autotoxicus to gnothi seauton. *Immunol. Today*, v.12, p.154-9, 1991.
13. AVRAMEAS, S., GUILBERT, B., DIGHIRO,G. Natural antibodies against tubulin, actin, myoglobin, thyroglobulin, fetuin, albumin and transferrin are present in normal sera and monoclonal immunoglobulins from multiple myeloma and Waldenstrom's macroglobulinemia may express similar antibody specificities.*Ann.Inst.Pasteur Immunol.*, v.132C, p.231- 6, 1981.
14. AVRAMEAS, S., TERNYNCK, T., GUESDON, J-L. Coupling of enzyme to antibodies and antigens.*Scand. J. Immunol.*, v.8, p.7-23, 1978.
15. AVRAMEAS,S. et al. Studies on natural antibodies and autoantibodies.*Ann. Immunol. Inst. Pasteur*, v.134D, p.103-13, 1983.
16. BACCALA, R. et al. Two murine natural polyreactive auto-antibodies are encoded by nonmutated germ-lines genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.86, p.4624-8, 1989.

17. BENNETT,V, BRANTON,D. Selective association of spectrin with the cytoplasmatic surface of human erythrocyte plasma membranes.*J. Biol. Chem.*, v.252, p.2753-63, 1977.
18. BOCTOR, F. N.,PETER, J. B. IgG subclasses in human chronic schistosomiasis: over-production of schistosome-specific and non specific IgG4.*Clin. Exp. Immunol.*, v.82, p.574-8,1990.
19. BRETANA, A. et al. *Trypanosoma cruzi* and *American Leishmania spp.*: Immunocytochemical localization of a laminin-like protein in the plasma membrane. *Exp. Parasitol.*, v.61, p.168-75, 1986.
20. BRILES, D. E., FORMAN, C., CRAIN, M. Mouse antibody to phosphocoline can protect mice from infection with mouse virulent isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, v.60, p.1957-62, 1992.
21. BRINKMAN, K. et al. Cross-reactive binding patterns of monoclonal antibodies to DNA are often caused by DNA-anti-DNA immune complexes.*Res.Immunol.Inst.Pasteur*, v.140, p.595-612,1989.



22. BURASTERO, S. et al. Monoreactive and polyreactive rheumatoid factors produced by in vitro Epstein-Barr virus-transformed peripheral blood and synovial B lymphocytes from rheumatoid arthritis patients. *Scand. J. Immunol.*, v.32, p.347-57, 1990.
23. BURNET, F. M. *The clonal selection theory of acquired immunity*. 1959. London: Cambridge University Press.
24. CAMARGO, E. P. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, v.6, p.93-100, 1964.
25. CAMARGO, Z. P. et al. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. *J. Med. Vet. Mycol.*, v.27, p.407-12, 1989.
26. CAMARGO, Z. P. et al. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J. Clin. Microbiol.*, v.26, p.2147-51, 1988.
27. CAMARGO, Z. P. et al. The use of cell-free antigen of *P. brasiliensis* in serological tests. *J. Med. Vet. Mycol.*, v.29, p.31-8, 1991.

28. CARLIER, Y. et al. Pregnancy and humoral immune response in mice chronically infected by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, v.55, p.2496-501, 1987.
29. CARRASCO, G.H. et al. La biopsia miocárdica: un recurso diagnóstico? Experiencia clínica en pacientes chagásicos y con otras miocardiopatías. *Rev. Latinoam. Cardiol.*, v.3, p.105-15, 1982.
30. CASALI, P., NOTKINS, A. L. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B cell repertoire. *Immunol. Today*, v.10, p.364-8, 1989.
31. CHEQUER-BOU-HABIB, D. et al. The possible role of circulating immune complexes in the deficiency of cell-mediated immunity in Paracoccidioidomycosis. *Brazilian. J. Med. Biol. Res.*, v.22, p.205-12, 1989.
32. COFFMAN et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol. Rev.*, v.102, p.5-27, 1988.
33. COSSIO, P.M. et al. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, v.4, p.13-21, 1974.

34. COSTA, R. S. et al. Immune complex-mediated glomerulopathy in experimental Chagas'Disease. *Clin. Immunol. Immunopath...*, v.58, p.102-14, 1991.
35. CREIGHTON,W.D.,LAMBERT,P.H.,MIESCHER, P.A. Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol. *J. Immunol.*, v.111, p.1219-27, 1973.
36. CUNNINGHAM, M. W., SWERLICK, R. A. Polyspecificity of antistreptococcal murine monoclonal antibodies and their implications in autoimmunity. *J. Exp. Med.*, v.164, p.998-12,1986.
37. CUNNINGHAM, M. W. et al. A study of anti-group A streptococcal monoclonal antibodies cross-reactive with myosin. *J. Immunol.*, v.136, p.293-8, 1986.
38. DEVEY, M. E. et al. Serial studies of the IgG subclass and functional affinity of DNA antibodies in Systemic lupus Erythematosus. *J. Autoimm.*, v.1, p.483-94, 1988.
39. DIGEON, M. et al. Detection of circulating immune complexes in humansera by simplified assays with polyethylene glycol.*J. Immunol. Methods*, v.16, p.165-83, 1977.

40. DIGHIERO, G., GUILBERT, B., AVRAMEAS, S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in humans sera. II. High incidence of monoclonal Ig exhibiting antibody activity against actin and tubulin and sharing antibody specificities with natural antibodies. *J. Immunol.*, v.128, p.2788-92, 1982

41. DIGHIERO, G. et al. High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice. *J. Immunol.*, v.134, p.765-71, 1985.

42. DIGHIERO, G. et al. Murine hybridomas secreting natural monoclonal antibodies reacting with self antigens. *J. Immunol.*, v.131, p.2267-72, 1983.

43. ERLICH, P. The croonian lecture on immunity with special reference to cell life. *Proc. Royal. Soc.*, v.66, p.424-48, 1900.

44. FADHEL, F. B. et al. Natural antibodies in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Lab. Anal.*, v.1, p.275-9, 1987.

45. FLANAGAN, J. G., RABBITTS, T. H. Arrangement of human immunoglobulin heavy chain constant region genes implies evolutionary duplication of a segment containing gamma, epsilon and alpha genes. *Nature*, v.300, p.709-13, 1982.
46. FRANCO, M. F. et al. Paracoccidioidomycosis. *Bailliere's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases*.. v.4, p.185-219, 1989.
47. GALILI, U. et al. A unique natural human IgG antibody with anti- α -galactosyl specificity. *J. Exp. Med.*, v.160, p.1519-31, 1984.
48. GALILI, U. et al. Human natural anti-a-galactosyl IgG. II. The specific recognition of α (1-3) - linked galactose residues. *J. Exp. Med.*, v.162, p.573-82, 1985.
49. GAUTHIER, V. J., MANNIK, M. A small proportion of cationic antibodies in immune complexes is sufficient to mediate their deposition in glomeruli. *J. Immunol.*, v.145, p.3348-52, 1990.

50. GAZZINELLI, R.T. et al. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: a novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. *Parasitol. Immunol.*, v.13, p.1-12, 1991.
51. GONZALES, R. et al. Specificity of natural serum antibodies present in phylogenetically distinct fish species. *Immunology*, v.63, p.31-6, 1988.
52. GUILBERT, B., DIGHIERO, G., AVRAMEAS, S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation, and characterization. *J. Immunol.*, v.128, p.2779-87, 1982.
53. GUILBERT, B. et al. Presence of natural autoantibodies in hyperimmunized mice. *Immunology*, v.56, p.401-7, 1985.
54. HAHN, B. H. et al. Idiotype regulatory networks promote autoantibody formation. *J. Rheumatol.*, v.14, Supp 113, p.143-8, 1987.
55. HAMILTON, R. G., ADKINSON, N. F. Naturally occurring carbohydrate antibodies interference in solid-phase immunoassays. *J. Immunol. Methods.*, v.77, p.95-107, 1985.

56. HARDY, R.R. et al. Rheumathoid factor secretion from human Leu-1+ cells. *Science*, v.236, p.81-3, 1987.
57. HENTATI, B. et al. Comparison of natural antibodies arising during lupus in (NZB x NZW) F1 mice. *J. Autoimmun.*, v.4, p.346-56,1991.
58. HEYMAN, B. The immune complex: possible ways of regulating the antibody response. *Immunol.Today*, v.11, p.310-3, 1990.
59. HUDSON, L. Autoimmune phenomena in chronic chagasic cardiophathy. *Parasitol.Today.*, v.1, p.6-9, 1985.
60. JERNE, N. K. The natural selection theory of antibody formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.41, p.849, 1955.
61. JERNE, N. K. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol. Inst. Pasteur*, v.125C, p.373-89, 1974.
62. KAHLENBERG, A. Preparative isolation of band 3, the predominant polypeptides of the human erythrocyte membranes. *Anal. Biochem.*, v.74, p.337-42, 1976.

63. KANAI, Y., KUBOTA, T. A novel trait of naturally occurring anti-DNA antibodies: dissociation from immune complexes in neutral 0.3-0.5M NaCl. *Immunol. Lett.*, v.22, p.293-300, 1989.
64. KARSENTI, E. et al. Antibodies to tubulin in normal nonimmunized animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.74, p.3997-4001, 1977.
65. KASHINO, S. S. et al. In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia*, v.92, p.173-8, 1985.
66. KAVERI, S. V., KANG, C. Y., KOHLER, H. Natural mouse and human antibodies bind to a peptide derived from a germline VH chain. Evidence for evolutionary conserved self-binding locus. *J. Immunol.*, v.145, p.4207-13, 1990.
67. KAVERI, S.-V. et al. Self-binding antibodies (autobodies) form specific complexes in solution. *J. Immunol.*, v.145, p.2533-8, 1990.
68. KAY, M. M. B. Localization of senescent cell antigen on band 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.81, p.5753-7, 1984.

69. KHOURY, E. L. et al. Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. Exp. Immunol.*, v.36, p.8-15, 1979.
70. KIERSZENBAUM, F. Is there autoimmunity in Chagas' disease? *Parasitol. Today*, v.1, p.4-6, 1985.
71. KUBOTA, T., AKATSUKA, T., KANAI, Y. DNA affinity column chromatography: application in the isolation of distinct antibody populations from SLE sera. *Clin. Exp. Immunol.*, v.62, p.321-8, 1985.
72. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p. 680-5, 1970.
73. LANDSTEINER, K. *The specificity of serological reactions*. 1947. Cambridge, Ma: Harvard University Press.
74. LAMPE, M.A. et al. Polyclonal B cell activation by the Eta-1 cytokine and the development of systemic autoimmune disease. *J. Immunol.*, v.147, p.2902-6, 1991.

75. LINDE, G. A. et al. Virus-specific antibody of different subclasses of immunoglobulins G and A in cytomegalovirus infections. *Infect. Immun.*, v.42, p.237-44, 1983.
76. LINDE, G.A., HAMMARSTROM, L., SMITH, E.C.I. IgG subclass distribution of antiviral antibodies in common variable immunodeficiency: effect of substitution therapy. *Clin. Immunol. Immunopath.*, v.49, p.341-8, 1988.
77. LIPHAM, W. J. et al. Recognition of peptides that are immuno-pathogenic but cryptic. Mechanisms that allow lymphocytes sensitized against cryptic peptides to initiate pathogenic autoimmune processes. *J. Immunol.*, v.146, p.3757-62, 1991.
78. LITTLE, J. R., EISEN, H. N. Preparation and characterization of antibodies specific for the 2,4,6, trinitrophenyl group. *Biochemistry*, v. 5, p. 3385-95, 1966.
79. LOUZIR, H. et al. Enzyme immunoassay analysis of antibody specificities present in the circulating immune complexes of selected pathological sera. *J. Immunol. Methods*, v.114, p.145-53, 1988.

80. LUTZ, H. U., FLEPP, R., STRINGARO-WIPF, G. Naturally occurring autoantibodies to exoplasmic and cryptic regions of band-3 protein, the major integral membrane protein of human red blood cells. *J. Immunol.*, v.133, p.2610-8, 1984.
81. LUTZ, H. U., WIPL, G. Naturally occurring autoantibodies to skeletal proteins from human red blood cells. *J. Immunol.*, v.128, p.1695-99, 1982.
82. LUTZ, H. et al. Naturally occurring anti-band-3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p.7368-72, 1987.
83. LYMBERI, P. et al. A high incidence of cross-reactive idiotypes among murine natural autoantibodies. *Eur. J. Immunol.*, v.15, p.702-7, 1985.
84. MACKWORTH-YOUNG, C., SCHWARTZ, R.B. Antibodies to DNA. *CRC* , v.8, Issue 3, p.147-73, 1988.

85. MAHANA, W., GUILBERT, B., AVRAMEAS, S. Studies on active immunization with self antigens.I. Production of antibody to unmodified proteins by neonatal immunization.*Scand. J. Immunol.*, v.30, p.295-302, 1989.
86. MAHANA, W. et al. Studies on active immunization with self antigens. II. Production of antibody related to hapten substitution. *Scand. J. Immunol.*, v.30, p.303-13, 1989.
87. MATSIOTA, P. et al. Detection of natural autoantibodies in the serum of anti-HIV-positive individuals. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.*, v.138, p.223-33, 1987.
88. MATSIOTA, P. et al. Natural autoantibodies in systemic lupus erythematosus.*Clin. Exp. Immunol.*,v.69, p.79-88, 1987.
89. MCLACHLAN,S.M.S. et al. Studies of thyroglobulin autoantibody synthesis using a micro-ELISA. *Immunol. Lett.*, v.4, p.27-34, 1982.
90. MENDES-GIANINI, M. J. et al. Detection of 43,000 molecular weight glycoprotein in sera of patients with Paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.27, p.2842-5, 1989.

91. MINOPRIO, P. et al. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi* infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. *J. Immunol.*, v.139, p.545-50, 1987.
92. MORTATTI, R. C. et al. Immunopathological of experimental Chagas'disease: binding of T cells to *Trypanosoma cruzi* infected heart tissue. *Infect. Immun...*, v.58, p.3588-93, 1990.
93. MOSMANN, T. R., COFFMAN, R. L. Two types of mouse helper T-cell clone. *Immunol. Today*, v.8, p.223-7, 1987.
94. MUSATTI, C. C. et al. In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Cell Immunol.*, v.24, p.365-78, 1976.
95. NAWATA, Y. et al. Surface immunoglobulin ligands and cytokines differentially affect proliferation and antibody production by human CD5+ and CD5- B lymphocytes. *Intern. Immunol.*, v.2, p.603-14, 1990.

96. O'BRIEN, R.L. et al. Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor $\gamma\delta$ by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*, v.57, p. 667-74, 1989.
97. OHLSON, S., ZETTERSTRAND, K. Detection of circulating immune complexes by PEG precipitation combined with ELISA. *J. Immunol. Methods.*, v.77, p.87-93, 1985.
98. OLDSTONE, M. B. A. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell*, v.50, p.819-20, 1987.
99. OUAISSI, A. et al. Identification of anti-acetylcholinesterase and anti-idiotypic antibodies in human and experimental Chagas' disease: pathological implications. *Eur. J. Immunol.*, v.18, p.1889-94, 1988.
100. PATARCA, R. et al. Dysregulated expression of the T cell cytokine ETA-1 in CD4-CD8- lymphocytes during the development of murine autoimmune disease. *J. Exp. Med.*, v172, p.1177-83, 1990.
101. PEREIRA, P. et al. Autonomous activation of B and T cells in antigen-free mice. *Eur. J. Immunol.*, v.16, p.685-8, 1986.

102. PETRY, K., EISEN, H. Chagas'disease:a model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol. Today*, v.5, p.111-6, 1989.
103. PUCCIA,R., TRAVASSOS,L. R. 43 kilodalton glycoprotein from *P.brasiliensis* immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis or Jorge Lobo's disease. *J. Clin. Microbiol.*, v. 29, p.1610-5, 1991
104. PUCCIA et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect.Immun.*, v.53, p.199-206, 1986.
105. RAVINDRAN, B., SATAPATHY, A. K., DAS, M. K. Naturally-occurring anti- α -galactosyl antibodies in human *Plasmodium falciparum* infections-a possible role for autoantibodies in malaria. *Immunol. Lett.*, v.19, p.137-42, 1988.
106. RAZ, E. et al. Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney. *J. Immunol.*, v.142, p.3076-82, 1989.

107. RESTREPO, M. A. Paracoccidioidomycosis. *Act. Med. Colombiana*, v.3, p.33-66, 1978.
108. RIFAI, A., WONG, S. S. Preparation of phosphorylcholine-conjugated antigens. *J. Immunol. Methods.*, v. 94, p.25-30, 1986.
109. ROMAGNANI, S. Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunology Today*, v.11, p.316-21, 1990.
110. ROSE, L. M., GOLDMAN, M., LAMBERT, P-H. Simultaneous induction of an idiotypic, corresponding anti-idiotypic antibodies, and immune complexes during African trypanosomiasis in mice. *J. Immunol.*, v.128, p.79-85, 1982.
111. ROSSI, F., DIETRICH, G., KAZATCHKINE, M. D. Anti-idiotypic against autoantibodies in normal immunoglobulins: evidence for network regulation of human autoimmune responses. *Immunol. Rev.*, v.110, p.135-49, 1989.
112. ROSSI, F., KAZATCHKINE, M. D. Antiidiotypes against autoantibodies in pooled normal human polyspecific Ig. *J. Immunol.*, v.143, p.4104-9, 1989.

113. SAN BLAS, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity and dimorphism. In: *Currents Topics in Medical Mycology*. New York:Springer-Verlag, 1985, p.93-120.
114. SASSINE,W. et al. Paracoccidioidomycose. Estudo imunologico de duas formas clinicas. *An. Bras. Dermatol.*, v.60, p.3-8, 1985.
115. SASSO, E. H., SILVERMAN, G. J., MANNIK,M. Human IgA and IgG F(ab')₂ that bind to staphylococcal protein A belong to the VH_{III} subgroup.*J. Immunol.*,v.147, p.1877-83, 1991.
116. SCHAFFNER, W., WEISSMANN, C. A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution.*Analyst. Biochem.*, v.56, p.502- 14, 1973.
117. SEIGNEURIN, J. M. et al. Polyspecific natural antibodies and autoantibodies secreted by human lymphocytes immortalized with Epstein-Baar virus. *Blood*, v.71, p.581-5, 1988.
118. SHELANSKY, M.L., GASKIN, F., CANTOR, C. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.70, p.765-70, 1973.

119. SHOENFELD, Y. & ISENBERG, D. *The mosaic of autoimmunity*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 1989, p.167-90.
120. SILVA, L. H. P., NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.*, v.20, p.191-203, 1953.
121. SIQUEIRA, A.M. Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da Paracoccidioidomíe. Caracterização do antígeno E2 do *Paracoccidioides brasiliensis*. São Paulo, 1982. Doutorado (Microbiologia e Imunologia) Universidade de São Paulo.
122. SPUDISH, J. A., WATT, S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *J. Biol. Chem.*, v.246, p.4866-92, 1971.
123. STERIN-BORDA, L. et al. Antibodies to $\beta 1$ and $\beta 2$ adrenoreceptors in Chagas' disease. *Clin. Exp. Immunol.*, v.74, p.349-54, 1988.
124. SZARFMAN, A. et al. Antibodies to laminin in Chagas' disease. *J. Exp. Med.*, v. 155, p.1161-71, 1982.

125. TEIXEIRA, A.R.L. et al. *Trypanosoma cruzi* - sensitized T lymphocyte-mediated ^{51}Cr release from human heart cells in Chagas'disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.27, p.1097-107, 1978.
126. TERNYNCK, T. et al. Comparison between autoantibodies arising during *Trypanosoma cruzi* infection in mice and natural autoantibodies. *J. Immunol.*, v. 144, p.1504-11, 1990.
127. TERNYNCK, T. et al. Induction of high levels of IgG autoantibodies in mice infected with *Plasmodium chabaudi*. *Intern. Immunol.*, v. 3, p.29-37, 1991.
128. TIMPL, R. et al. Laminin- A glycoprotein from basement membranes. *J. Biol.Chem.*, v. 254, p. 9933-37, 1979.
129. TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.76, p.4350-4, 1979.

130. TOWBIN, H. et al. Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas'disease, American cutaneous Leishmaniasis and normal individuals recognize terminal galactosyl α 1-3 galactose epitopes. *J. Exp. Med.*, v.166, p.419-32, 1987.
131. TRAVASSOS, L. R. et al. Immunological responses to short carbohydrate epitopes in *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Oswaldo Cruz* , v.83, Suppl.1, p.427-30, 1988.
132. TRON, F., BACH, J-F. Molecular and genetic characteristics of pathogenic autoantibodies. *J. Autoimm.*, v. 2, p.311-20, 1989.
133. UNDERWOOD, J. R. et al. Hybrids from normal germ-free nude and neonatal mice produced monoclonal autoantibodies to eight different intracellular structures. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 60, p.417-26, 1985.
134. UNTERKIRCHER, S. C., AVRAMEAS, S., TERNYNCK, T.
Autoantibodies in sera of *Trypanosoma cruzi*-infected individuals with or without clinical Chagas disease. *J. Clin. Lab. Anal.*, v.7, p.60-9, 1993.
135. VAN DER ZEE, J. S., VAN SWIETEN, P., AALBERSE, R. C.
Inhibition of complement activation by IgG4 antibodies. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 64, p.415-22, 1986.

136. VAN VOORHISS, W. C., EISEN, H. FL-160: a surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J. Exp. Med.*, v.169, p.641-52, 1989.
137. VAN VOORHISS, W. C. et al. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi* the F1-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p.5993-7, 1991.
137. VAZ, C. A. C. et al. Specific recognition pattern of IgM and IgG antibodies produced in the course of experimental paracoccidioidomycosis. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 88, p.119-23, 1992.
139. WHALEN, R.G., BUTLER-BROWNE, G.S., GROS, F. Identification of a novel form of myosin light chain present in embryonic muscle tissue and cultured muscle cells. *J. Mol. Biol.*, v.126, p.415-20, 1978.
140. WINOGRAD, H., GREENAN, J. R. T., SHERMAN, I. W. Expression of senescent antigen on erythrocytes infected with a knobby variant of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p.1931-5, 1987.

141. WODD, J. N. et al. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature*, v.296, p.34-8, 1982.
142. YAMASHITA, J. T. Sorologia e imunocomplexos circulantes na hanseníase. São Paulo, 1992. 138p. Dissertação (Mestrado em Dermatologia) Escola Paulista de Medicina.

RESUMO

UNTERKIRCHER, C.S. Anticorpos naturais e infecção. Anticorpos naturais na doença de Chagas e na Paracoccidioomicose. São José dos Campos, 1993. 127 p. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual "Julio de Mesquita Filho."

Anticorpos naturais para antígenos próprios e exógenos foram analisados pela técnica de ELISA, em 80 soros de pacientes cronicamente infectados pelo *T. cruzi* e, em 40 soros de indivíduos sofrendo de uma micose profunda, frequentemente encontrada na América Latina (Paracoccidioomicose). Cerca de 80% dos indivíduos do primeiro grupo tinham níveis significativamente elevados de anticorpos antilaminina ($M=4,75$, $DP\pm 1,88$) quando comparados com os controles saudáveis e, diferentes especificidades de anticorpos estavam associadas com antilaminina nos soros chagásicos. Foram observados anticorpos reativos com as proteínas do citoesqueleto, especialmente com a banda 3 e seus peptídeos, como o de 62 kDa. Por meio de cromatografia, em Proteína-A-Sepharose, mostramos que uma parte significativa do antiGal natural pode estar ligada por sua região Fab a outra molécula de imunoglobulina e/ou a sítios alternativos de ligação na Proteína A. O achado de IgG antiGal nos imunocomplexos reforçam a primeira hipótese. Todavia, é possível que algumas IgG antiGal pertençam ao subgrupo VH_{III} de imunoglobulinas.

Entre os 40 soros de PCM examinados, a maioria tinha níveis normais de anticorpos naturais. Todavia, 30% dos pacientes crônicos apresentavam aumentos de pelo menos uma especificidade de anticorpo natural, tal como antiactina, antimiosina e antiGal. Na forma juvenil os anticorpos antiactina estavam aumentados de 2,4 vezes (1,9 a 5,3 vezes), sugerindo uma associação com a doença disseminada. Imunocomplexos foram pesquisados nos soros de PCM utilizando a técnica de precipitação com polietileno glicol 6000. Nos imunocomplexos isolados foram encontrados principalmente anticorpos específicos para antígenos solúveis de *P. brasiliensis*.

Palavras-chave: anticorpo antiGal, laminina, doença de Chagas, Paracoccidioidomicose, imunocomplexos

ABSTRACT

Unterkircher,C.S. Natural antibodies and Infection. Natural antibodies in Chagas'disease and in Paracoccidioidomycosis. São José dos Campos, 1993.127 p. Thesis (Livre-Docência) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual "Julio de Mesquita Filho."

Using ELISA technique, natural antibodies against self and non self antigens were determined in 80 patients chronically infected by *T. cruzi* and 40 individuals suffering from a deep mycosis frequently found in Latin America (Paracoccidioidomycosis - PCM). Two forms of PCM were investigated: adult forms and juvenil type of disease. Eighty percent (80%) of the former group had significantly elevated anti-laminin antibody levels ($M=4.7, SD\pm 1.8$) compared with healthy controls and different specificities of antibody were associated with anti-laminin in pathological sera. A notable binding to cytoskeletal proteins was observed, specially with band 3 and their peptides derivates, such as 62 kDa peptide. By means of Protein A chromatography we were able to show that natural anti-Gal antibodies may be bound by their Fab region to other immunoglobulins and/or to Protein A by alternative sites of binding. The finding of IgG anti-Gal antibodies in circulating immune complexes isolated from chagasic sera supported the first alternative. However, it is possible that some of IgG

anti-Gal antibodies, belong to VH_{III} subgroup of immunoglobulins, that bind directly to Protein A. Among the 40 sera from PCM examined, the majority was considered as not exhibiting a significantly higher binding than normal sera to antigens tested. However thirty percent (30%) of the chronic patients had an increased levels of natural antibodies at least for one specificity such as actyn, myosin and Gal α 1,3Gal epitopes. In juvenil type of PCM the mean value found for actyn was also increased 2,42 (range 1,0 to 5,3). Utilizing the polyethylene glycol precipitation the presence of circulating immune complexes was investigated in PCM sera. Specific antibodies for soluble antigens from *P. brasiliensis* and natural antibodies against myoglobin, myosin and Gal α 1,3Gal epitopes were characterized.

Key Words: Anti-Gal antibodies, laminin, Chagas'disease, Paracoccidioidomycosis, Immune complexes

Autorizo a reprodução deste trabalho.
São José dos Campos 12 de novembro de
1993.

Carmelinda Schmidt Unterkircher