

SOBRE PROTEÍNAS SÉRICAS DE CAMUNDONGOS
INFECTADOS COM Trypanosoma cruzi (CHA-
GAS, 1909).

AMOSTRAS "Y" E "NICARAGUA"

E.SALATA

EDNIR SALATA

SOBRE PROTEÍNAS SÉRICAS DE CAMUNDONGOS
INFECTADOS COM Trypanosoma cruzi (CHAGAS, 1909).
AMOSTRAS "Y" E "NICARAGUA".

Tese de Mestrado apresentada
ao Instituto de Biologia da
UNICAMP.

Orientador. Prof. H.A.RANGEL

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Campinas - São Paulo
(1977)

UNICAMP
BIBLIOTECA

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia, da UNICAMP e no Departamento de Parasitologia, do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, da UNESP.

A minha esposa, a meus filhos,
a meus pais e irmão..

Aos

Professores Fernando de Azevedo Correa e Humberto de Araujo Rangel, amigos e mes tres, que constantemente nos apoiaram e nos estimularam para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Prof.^a Daria Repka, pelas críticas, sugestões e acima de tudo pela amizade.

Ao Prof. Luiz Augusto Magalhães, pelas críticas e sugestões apresentadas.

Ao Prof. Francisco Gomes de Alcantara, pelas sugestões apresentadas.

A Srta. Vera Lucia de Campos Octaviano, bibliotecária do Campus de Botucatu, UNESP, pela eficiente ajuda na elaboração das citações bibliográficas.

Ao corpo docente do curso de Pós-Graduação em Imunologia, pelos seus ensinamentos.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, em particular, - José Valfrido de Santana e Elizabeth Malagueño de Santana, pela calorosa acolhida e constantes incentivos.

Aos colegas do Departamento de Parasitologia do I.B.B.M.A. da UNESP, pelas facilidades concedidas para a realização do presente trabalho.

A Sra. Maria Aparecida Montanha Ramos e Sr. Roberto Gonzales, pela colaboração técnica.

Í N D I C E

	Página
I - INTRODUÇÃO	01
II - MATERIAL E MÉTODOS	
1. Animais utilizados.	03
2. Amostras de <u>Trypanosoma cruzi</u> .	03
3. Inoculação experimental dos camundongos.	04
4. Obtenção de globulina de camundongo.	05
5. Imunossoros.	05
6. Dosagem de proteína.	06
7. Eletroforese em membranas de acetato de <u>ce</u> lulose.	06
8. Imunoeletroforese cruzada.	07
9. Reação de imunofluorescência indireta.	07
III - RESULTADOS	
1. Evolução da infecção experimental.	08
2. Proteínas séricas no decurso da infecção.	09
3. Produção de anticorpos no decurso da in- fecção.	12
IV - DISCUSSÃO	13
V - CONCLUSÕES	20
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

I - INTRODUÇÃO

A partir dos trabalhos iniciais de CHAGAS (1909), vários pesquisadores têm procurado isolar o agente etiológico da tripa nossomiase americana de casos humanos ou de animais naturalmente infectados (ANDRADE, 1974). As várias amostras do agente assim isoladas e mantidas por passagens seriadas, em animais susceptíveis ou em meios de cultura, são conhecidas na literatura sob a denominação de cêpas ou amostras de Trypanosoma cruzi (LUMSDEN, 1966).

Alguns laboratórios vêm mantendo diferentes amostras para estudos comparativos, visto que diferentes graus de histotropismo, parasitemia, mortalidade e lesões têm sido verificados em relação as diferentes amostras (MAZZOTTI, 1940; VON BRAND et alii, 1948; BRENER, 1965; BICE et ZELEDON, 1970; ANDRADE, 1974).

As características antigênicas de diversas amostras de T. cruzi também têm sido estudadas por diferentes pesquisadores, que têm mostrado poderem elas ser classificadas em grupos sorologicamente distintos, independentemente de relação com fatores tais como patogenicidade, distribuição geográfica ou aspectos epidemiológicos (NUSSENZWEIG; DEANE et KLOETZEL, 1963; MEDINA et CHAVES, 1970; ALARCON SEGOVIA et alii, 1974).

Quadros clínicos os mais variados, aparentemente produzidos por diferentes amostras do protozoário, têm sido encontrados em diferentes áreas endêmicas (ALARCON SEGOVIA et alii, 1974). Contudo, estudos dos aspectos metabólicos e de cultivo de 4 amostras que apresentavam patogenicidades diversas para ratos não mostraram diferenças que justificassem as diferenças patogênicas (VON BRAND et alii, 1948). Iguamente infrutíferas foram as tentativas de demonstrar toxinas em amostras com patogenicidades diferentes (OKUMURA, 1966).

As diferentes amostras estimulam o sistema imunitário do hospedeiro, como tem sido constatado em numerosos experimentos que demonstram, por diferentes técnicas sorológicas, seja a presença de anticorpos anti T. cruzi em soros de chagásicos, seja uma exacerbação da infecção pelo uso de imunossupressão (GUERREIRO et MACHADO, 1913; MUNIZ et FREITAS, 1944; MUNIZ, 1947; HAUSCKA

et alii, 1950; CAMARGO, 1966; ANDRADE, SILVA et ANDRADE, 1967; POTHIER et alii, 1969; CERISOLA et alii, 1971; ALARCON SEGOVIA et alii, 1974).

Contudo, em que pese a existência dessas evidências indicativas de que a infecção é atenuada por mecanismos imunes, a natureza precisa dos mecanismos ainda permanece obscura (ALARCON SEGOVIA et alii, 1974).

Sabe-se que alterações nas proteínas séricas ocorrem durante a infecção de diferentes hospedeiros por hemoflagelados do gênero Trypanosoma. Assim, trabalhando com soros humanos de pacientes chagásicos, seja em fase crônica, seja em fase aguda, alguns pesquisadores demonstraram alterações nos níveis de várias proteínas séricas (PINTO et FALCÃO, 1958; SALUM et alii, 1959). Por outro lado, SENECA, SANG et TROC (1958), trabalhando com a amostra Tulahuan de T.cruzi inoculada em camundongos Db_a, demonstraram no soro destes camundongos, no 15º dia de infecção, moderada redução de albumina e aumento das frações α , β e γ globulinas. Tais resultados foram parcialmente confirmados recentemente por CAPBERN, MATTERN et PAUTRIZEL (1974), estudando comparativamente os níveis das proteínas séricas durante a infecção de camundongos por T.cruzi ou por T.gambiense.

Na revisão bibliográfica realizada, pouco ou quase nada encontramos sobre as prováveis alterações séricas que podem ser encontradas em consequência do parasitismo pelo T.cruzi.

Da literatura consultada, conclui-se que não houve preocupação em estabelecer correlação entre as características biológicas das amostras e as alterações séricas encontradas. Deste modo, não temos informações se, durante a infecção por diferentes amostras, ocorre o mesmo padrão de alterações séricas.

Visando contribuir para a obtenção de tais informações, procuramos estudar comparativamente a resposta sérica de camundongos de mesma linhagem e experimentalmente infectados com a amostra Y, considerada de alta patogenicidade (BRENER, 1961), ou com a amostra Nicaragua, que segundo REPKA*, apresenta baixa patogenicidade.

* D.REPKA, comunicação pessoal.

1. Animais utilizados.

1.1. Camundongos.

Foram utilizados camundongos Swiss de ambos os sexos, com 24 a 26 dias de idade, criados no biotério central do Campus de Botucatu, da UNESP.

Os animais foram separados em dois lotes de 225 camundongos, constituídos de 165 machos e 60 fêmeas cada um. Os animais foram separados segundo o sexo, em caixas com capacidade para alojar 15 camundongos, e receberam água e alimentação ad libitum.

1.2. Coelhos.

Utilizamos coelhos albinos de cerca de três meses de idade, alojados em gaiolas individuais, em que recebiam água e eram alimentados com ração apropriada para a espécie.

2. Amostras de Trypanosoma cruzi.

2.1. Amostra Y.

Isolada em 1953 por SILVA e NUSSENZWEIG, foi fornecida pelo Dr. Zigman Brener, do INERU - Belo Horizonte, M.G.. Esta amostra vem sendo mantida desde 1973, no Departamento de Parasitologia do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola da UNESP, por passagens semanais em camundongos albinos de 18 a 20 g e em cultura em meio de LIT (FERNANDES et CASTELLANI, 1966).

2.2. Amostra Nicaragua (NIC).

Fornecida pelo Dr. F.A.Neva, do NIH - Bethesda, Ma. - U.S.A., vem sendo mantida em cultura em meio de LIT desde 1974. Formas de cultura da amostra NIC, obtidas após 15 dias de crescimento em meio de LIT, foram inoculadas em camundongos albinos machos de 18 a 20 g, para obtenção de tripomastigotas circulantes. Com os

tripomastigotas assim obtidos, iniciamos uma série de 4 passagens quinzenais em camundongos, para que a amostra se adaptasse aos animais de experimentação.

3. Inoculação experimental dos camundongos.

Animais foram inoculados intraperitonealmente com 0,2 ml de uma suspensão contendo número conhecido de tripomastigotas circulantes, obtidos a partir de sangue de camundongos em pico de parasitemia. O número de tripomastigotas circulantes foi estimado pelo método de PIZZI modificado por BRENER (1961) e as diluições feitas em salina 0,15 M estéril.

Baseando-nos em experimentos preliminares nos quais verificamos que, para obtenção de animais com infecções prolongadas, deveríamos utilizar inóculos de 200 e 3000 tripomastigotas das amostras Y e NIC de T. cruzi, respectivamente, dividimos nossos animais em dois lotes:

Lote Y - constituído de 225 camundongos inoculados com 200 tripomastigotas da amostra Y.

Lote NIC - constituído de 225 camundongos inoculados com 3000 tripomastigotas da amostra NIC.

3.1. Seguimento da infecção.

A mortalidade nos dois lotes de animais foi registrada diariamente.

Semanalmente, eram escolhidos ao acaso 15 animais de cada lote (11 machos e 4 fêmeas), para verificação de parasitemia e obtenção de soro.

A verificação de ocorrência de parasitemia foi realizada examinando-se ao microscópio ótico, entre lâmina e lamínula 22 x 22 mm, sob objetiva 40x, duas alíquotas de 5 mm³ de sangue, colhido da cauda de cada camundongo. Formam-se assim, 7.250 campos microscópicos, 50 dos quais escolhidos ao acaso, foram examinados. Os animais foram considerados com parasitemia negativa, quando não se encontrava pelo menos um tripanossoma em qualquer dos 50 campos examinados.

O sangue colhido por punção cardíaca desses animais serviu para obtenção das misturas de soros que eram centrifugadas a 3.500 r.p.m. durante 40 minutos, inativadas a 56°C por 30 minu

tos e armazenadas em freezer a -20°C , até o momento de serem analisadas.

4. Obtenção de globulina de camundongo.

A mistura de soros provenientes de cerca de 300 camundongos normais, de idade variada, foi utilizada para obtenção da fração globulínica, pela técnica preconizada por MELLORS (in OLIVEIRA LIMA et DIAS DA SILVA, 1970). A fração globulínica obtida foi armazenada em freezer a -20°C , até o momento de uso.

5. Imunossoros.

5.1. Soro de coelho antiglobulina de camundongo.

Para obtenção de antiglobulina de camundongo, coelhos de três meses de idade foram inoculados inicialmente nos coxins plantares posteriores com 0,5 ml de solução de globulina de camundongo (20 mg/ml), misturada em partes iguais com adjuvante completo de Freund. Após 30 dias, os animais receberam 1 ml da mistura por via subcutânea. Uma dose de 10 mg de globulina dissolvida em 1 ml de salina 0,15 M foi ministrada um mês após, por via intraperitoneal. Esta inoculação foi seguida, após 24 horas, por uma série de inoculações endovenosas com 1 ml de solução de globulina precipitada pelo alumen de potássio a 0,5%, de acordo com o seguinte esquema: 1 mg no 1º dia, 2 mg no 2º dia e, a partir do 4º dia, 5 mg a cada 2 dias durante duas semanas consecutivas. A 1ª sangria foi realizada 7 dias após a última inoculação. Um mês após a última dose, os animais receberam duas novas doses de 5 mg por via subcutânea, a intervalos de 15 dias, tendo sido sangrados 7 dias após cada inoculação (2ª e 3ª sangrias).

Os soros obtidos foram inativados a 56°C por 30 minutos, analisados por imunoeletroforese frente a soro normal de camundongo e armazenados a -20°C até o momento de uso.

5.2. Soro de camundongo anti-hemácias de carneiro.

Quarenta e cinco camundongos de 26 dias de idade foram inoculados, através do plexo orbital, com 0,2 ml de suspensão de hemácias de carneiro, em salina 0,15 M, contendo 5×10^8 células/ml.

Grupos de 15 camundongos foram sangrados por punção cardíaca, se manalmente, durante três semanas consecutivas. Os soros individuais obtidos em cada semana foram misturados, constituindo-se assim, três diferentes misturas, as quais foram inativadas a 56°C por 30 minutos, e armazenadas a -20°C, até o momento de uso.

5.3. Antiglobulina de camundongo marcada com isotiocianato de fluoresceína.

O soro antiglobulina de camundongo marcada com isotiocianato de fluoresceína foi gentilmente fornecido pelo Dr. Mário Camargo, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, e apresentava um título de 1/80 e relação F/P igual a $7,2 \times 10^3$.

6. Dosagem de proteína.

O teor proteico da fração globulínica e dos soros de camundongos foi determinado pela reação com o biureto, segundo a técnica de WEICHSELBAUN modificada por DITTEMBRANDT (in OLIVEIRA LIMA e DIAS DA SILVA, 1970), utilizando-se uma curva padrão de proteínas traçada a partir de uma solução de soro albumina bovina previamente dosada através do processo de microkjeldahl (KABAT et MAYER, 1968).

7. Eletroforese em membranas de acetato de celulose.

A eletroforese dos diferentes soros imunes e normais foi realizada a temperatura ambiente, com tampão veronal-acetato pH 8,8, aplicando-se 135 volts e cerca de 2 mA por membrana, durante 45 minutos, em cuba Mikrophor-Boshcamp, utilizando-se aplicador de 0,05 ul.

As membranas foram coradas por 3 minutos em solução de amido Schwartz 10 B em ácido acético e metanol (1:10:90) e diferenciadas por passagem em 3 banhos de solução descorante de metanol-ácido acético (9:1), durante um tempo mínimo de 10 minutos.

A diafanização foi realizada em solução de dioxana-metanol (7:3) durante 3 a 4 minutos, e a seguir as membranas foram aquecidas a 80°C por 15 minutos.

As membranas foram analisadas em registrados Zeiss EI-3, que permite simultaneamente registrar a extinção e a integração.

As áreas correspondentes a albumina e a α , β e γ globulinas foram delimitadas de acordo com as instruções de GRABAR (in GRABAR et BURTIN, 1968).

8. Imunoeletroforese cruzada.

Os imunossoros foram analisados com um mesmo soro polivalente de coelho anti-globulina de camundongo a 1/40, através da imunoeletroforese cruzada, como preconizado por CLARKE (1971).

Foram utilizadas placas de vidro de 9 x 12 cm, recobertas de uma camada de agarose a 1% em tampão veronal pH 8,6 e 0,025 M, com uma espessura de 1,5 mm.

A eletroforese na 1^a dimensão foi realizada com 5 μ l de soro de camundongo, aplicando-se 10 volts/cm (10 mA) por placa, durante 60 minutos, a temperatura ambiente. Para a eletroforese na 2^a dimensão, foram aplicados 2 volts/cm (5 mA) durante 18 horas, a mesma temperatura.

9. Reação de imunofluorescência indireta.

A técnica da reação de imunofluorescência indireta preconizada por CAMARGO (1971), foi utilizada para a constatação da presença de anticorpos anti-T.cruzi.

III - R E S U L T A D O S

1. Evolução da infecção experimental.

A evolução da infecção nos grupos de 15 camundongos examinados semanalmente, mostrou que praticamente a totalidade dos animais examinados apresentou parasitemia no final da 2^a e 3^a semanas após a inoculação (Tabela I).

Pode-se verificar ainda, pela Tabela I e Figura I, que 20% dos animais inoculados com a amostra Y apresentaram parasitemia já a partir do final da 1^a semana após a inoculação, para atingir níveis de 93% na 2^a e 3^a semanas. A porcentagem de animais com parasitemia decresceu significativamente a partir da 4^a semana, atingindo valores nulos depois da 6^a semana após a inoculação.

Os camundongos inoculados com a amostra NIC apresentaram uma evolução assaz diferente. Com esta amostra de T. cruzi, apesar dos camundongos apresentarem escassos tripanossomas circulantes, estes permaneceram por longos períodos na circulação. Pela Tabela I e Figura 1, pode-se notar que, desde a 1^a semana após a inoculação, a porcentagem de animais com parasitemia comprovada foi superior (40%) àquela apresentada pelo lote de animais inoculados com a amostra Y (20%). Observa-se ainda, que 53% dos animais inoculados com a amostra NIC apresentaram parasitemia mesmo 14 semanas após a inoculação, ao contrário do que ocorreu com o lote de camundongos inoculados com a amostra Y, que a partir da 6^a semana após a inoculação, não apresentou nenhum camundongo com parasitemia patente.

A mortalidade decorrente da infecção foi diferente nos dois lotes de animais inoculados.

No lote de animais inoculados com a amostra Y, observou-se uma alta mortalidade (78 animais) entre a 3^a e 4^a semanas após a inoculação, ocorrendo, então, uma estabilização da curva de mortalidade, com pequeno incremento no número de animais mortos (Tabela I e Figura 2).

A amostra NIC mostrou-se muito pouco letal para os animais inoculados, com uma frequência maior de mortes (9 animais) entre a 6^a e 7^a semanas de observação (Tabela I e Figura 2).

Durante o período de observação (9 semanas), a amostra Y

causou 56,2% de mortalidade, enquanto que a amostra NIC levou à morte apenas 9,6% dos animais inoculados (Figura 2).

2. Proteínas séricas no decurso da infecção.

2.1. Proteínas séricas totais.

Dosagens de proteínas nos soros obtidos semanalmente de grupos de 15 animais infectados com as diferentes amostras de T. cruzi revelaram elevação dos níveis das proteínas séricas totais em ambos os lotes de animais, elevação essa que perdurou durante quase todo o tempo de observação, como se pode notar na Tabela II e Figura 3.

A elevação dos níveis séricos das proteínas totais observadas nos soros de animais infectados não ocorreu nos soros de camundongos normais ou inoculados com hemácias de carneiro e com idades correspondentes às três primeiras semanas de observação (Tabela III).

Como se pode observar na Figura 3, os níveis das proteínas séricas, em ambos os lotes de animais, sofreram acentuada elevação por volta da 3^a semana após a inoculação.

No soro de animais inoculados com a amostra Y, o nível das proteínas séricas atingido na 3^a semana de observação permaneceu inalterado até a 9^a semana de infecção. Não foi possível continuar nossas observações devido à inexistência de sobreviventes (Tabela I).

No soro do lote inoculado com a amostra NIC, o padrão das proteínas séricas foi similar, até a 9^a semana, ao observado no lote inoculado com a amostra Y. A partir desta data, os níveis continuam elevados, com pequenas flutuações até a 13^a - 14^a semanas, quando se observa uma redução a níveis praticamente semelhantes aos apresentados por animais normais.

Esses mesmos soros foram submetidos a eletroforese em membrana de acetato de celulose, usando-se como padrão soros de camundongos normais. Os resultados obtidos na densitometria e na integração são apresentados a seguir.

2.2. Fração albumina.

Os níveis séricos da fração albumina, no grupo de camun

camundongos inoculados com a amostra NIC, praticamente dobraram a partir da 2^a semana de infecção. Reduziram-se, a seguir, a níveis mais baixos, não retornando, entretanto, ao nível normal mesmo em camundongos com 14 semanas de infecção, quando ocorre um novo aumento a nível semelhante ao observado na 2^a semana (Figura 3).

O lote de camundongos inoculados com a amostra Y revelou um padrão dos níveis séricos da fração albumina muito semelhante ao lote inoculado com a amostra NIC, apresentando, entretanto, uma elevação máxima ao redor da 6^a semana após a inoculação (Figura 3).

2.3. Fração α .

A fração α globulina apresentou variação cíclica com níveis ora mais altos ora mais baixos que os de camundongos normais (Figura 4).

No lote de animais inoculados com a amostra NIC, os maiores níveis ocorreram a cada 4 ou 5 semanas, ou seja, na 4^a, 9^a e 14^a semanas após a inoculação.

No lote de animais inoculados com a amostra Y, o intervalo entre os maiores níveis foi de 3 semanas, isto é, os maiores níveis foram observados na 3^a, 6^a e 9^a semanas de infecção.

2.4. Fração β .

Como se pode notar pela Figura 5, as variações dos níveis da fração β também ocorreram de modo cíclico, permanecendo, entretanto, sempre em níveis superiores aos normais.

No lote de camundongos inoculados com a amostra NIC, os maiores níveis ocorreram na 3^a, 6^a e 12^a semanas, enquanto nos inoculados com a amostra Y pudemos observar picos na 4^a e 6^a semanas, visto que, com esta amostra, só pudemos analisar soros de camundongos com 9 semanas, quando aparentemente teríamos nova elevação.

2.5. Fração γ .

Os níveis da fração γ sofreram uma redução no início da infecção (1^a e 2^a semanas) por qualquer das amostras de T.cruzi utilizadas. Entretanto, a partir da 3^a semana de observação, como

se pode notar na Figura 6, ocorre uma elevação dos níveis séricos com flutuações cíclicas permanecendo, porém, sempre em níveis mais altos que o normal. Os maiores níveis ocorreram na 3^a, 6^a e 12^a e na 4^a e 8^a semanas, nos grupos de camundongos inoculados, respectivamente, com a amostra NIC e Y.

Podemos observar, pelas Figuras 3, 4, 5 e 6, que, de modo geral, as flutuações cíclicas ocorreram a intervalos de 3 semanas, sendo que os níveis máximos ocorreram mais precocemente nos grupos de camundongos inoculados com a amostra NIC de T. cruzi. Observa-se ainda, em soros de animais inoculados com a amostra NIC, que, aparentemente, ocorre uma alternância na fração que se apresenta mais elevada; assim, na 3^a semana temos um maior nível da fração β , na 6^a de γ e na 9^a de α globulina.

No grupo de camundongos inoculados com a amostra Y, tal alternância foi observada entre as frações α e γ , sendo que, na 3^a e 6^a semanas, tivemos maiores níveis de α e, na 4^a e 8^a, os maiores níveis foram da fração γ globulina.

As relações albumina-globulina obtidas nos soros acham-se expressas na Tabela II. Pode-se observar que a relação A/G sofreu elevação entre a 2^a e 3^a semanas, voltando a níveis praticamente normais após a 3^a semana de infecção.

Com a finalidade de detectar possíveis alterações nas proteínas séricas, soro de animais infectados com as diferentes amostras de T. cruzi foi comparado com soro de camundongos normais, de idade correspondente e mantidos sob as mesmas condições, pela imunoeletroforese cruzada em agarose.

Os soros, que foram analisados utilizando-se um sorolivalente de coelho anti-camundongo, mostraram várias modificações do padrão das imunoglobulinas.

Pode-se notar que, no início, a infecção chagásica, provocada pela amostra NIC de T. cruzi, acarretou redução dos níveis séricos das frações que possuem mobilidade eletroforética correspondente as β globulinas (Figura 7). A referida redução, entretanto, mostrou-se transitória, voltando a se normalizar por volta da 6^a semana, para aumentar consideravelmente na 9^a e voltar a níveis praticamente idênticos aos apresentados por animais normais, na 12^a semana de observação (Figura 10).

Tal redução não é observada em animais normais ou inoculados com hemácias de carneiro e de idades correspondentes aos animais inoculados com as amostras de T. cruzi (Figuras 8 e 9).

Na região correspondente as β globulinas, pode-se ainda observar o aparecimento de pelo menos um novo componente, que se evidencia tanto em soro de animais inoculados experimentalmente quanto no de animais considerados normais, a partir da 2^a semana de observação (Figuras 7, 8 e 9).

Na região das α globulinas, temos redução de uma fração globulínica, que já se evidencia a partir da 1^a semana de infecção, atingindo um máximo de redução na 3^a semana (Figura 7). Na 9^a semana de infecção, este componente globulínico sofre acentuada elevação, para reduzir-se novamente na 12^a semana de observação (Figura 10).

Soros de camundongos normais ou imunizados com hemácias de carneiro não apresentaram tal redução (Figuras 8 e 9).

Um componente sérico da região das albuminas apresenta durante as três primeiras semanas de observação, em soro de animais inoculados com a amostra NIC, uma acentuada elevação. Tal componente tem seus níveis séricos reduzidos a partir da 6^a semana, para atingir níveis mínimos na 12^a semana de infecção (Figuras 7 e 10). Este componente não apresentou redução evidenciável em soros de camundongos utilizados como controles (Figuras 8 e 9).

Através do padrão imunoelctroforético apresentado pelos soros de camundongos inoculados com a amostra Y, na 3^a, 6^a e 9^a semanas de observação, pôde-se notar que, aparentemente, as variações nas frações eletroforéticas foram iguais em ambos os lotes de animais infectados, tanto do ponto de vista qualitativo quanto do semi-quantitativo, visto que as alterações nas áreas delimitadas pelas curvas de precipitação foram idêntidas (Figuras 10 e 11).

3. Produção de anticorpos no decurso da infecção.

Utilizando como antígeno formas de cultura de amostra homóloga, verificou-se que somente a partir da 2^a semana foi possível detectar anticorpos anti T.cruzi, a princípio em níveis baixos e que se elevaram gradativamente até atingir um máximo de 1/256 por volta da 6^a e 11^a semanas, respectivamente, em soro de camundongos infectados com amostra Y e NIC de T.cruzi.

O perfil sorológico apresentado pelos soros provenientes de ambos os lotes de animais infectados encontra-se na Figura 12. Como se pode notar, não encontramos diferenças significativas nos níveis de anticorpos apresentados pelos soros de animais constituintes de ambos os lotes.

IV - D I S C U S S Ã O

O comportamento biológico de um parasita avaliado em animais experimentalmente infectados através da evolução da infecção, dos níveis de parasitemia, dos diferentes tropismos, das alterações teciduais e da mortalidade, é influenciado por fatores inerentes aos animais hospedeiros (MARR et PIKE, 1967; PIZZI et PRAGER, 1952). Torna-se difícil, portanto, comparar resultados publicados por diferentes autores sobre o comportamento de várias amostras de T.cruzi, mesmo quando esses estudos são feitos com uma mesma raça de camundongos (Swiss, por exemplo) visto que vários estoques de uma mesma raça mantidos em diferentes laboratórios podem, na realidade, representar populações geneticamente diferentes.

Torna-se necessário, portanto, que a verificação da existência ou não de diferenças no comportamento biológico de diferentes amostras de T.cruzi seja realizada a partir de experiências de comparação de parâmetros levadas a termo em um mesmo estoque populacional de camundongos.

Os resultados obtidos no presente trabalho sobre o comportamento das amostras Y e NIC, avaliadas num mesmo estoque de Swiss, mostram que elas são significativamente diferentes.

De fato, para conseguirmos o estabelecimento de uma infecção suficientemente prolongada que permitisse o estudo das alterações séricas, necessitamos utilizar inóculos diferentes. Com a amostra Y, utilizamos inóculo 15 vezes inferior ao inóculo da amostra NIC.

A despeito da dose utilizada com a amostra Y ser bem menor que a da NIC, a mortalidade provocada pela amostra Y foi 7 vezes superior à provocada pela inoculação da NIC. Evidencia-se, assim, uma maior patogenicidade da amostra Y em relação a NIC, entendendo-se por patogenicidade a capacidade de determinar lesões tissulares que possam determinar a morte do hospedeiro (REY, 1973; ANDRADE, 1974).

O decurso da infecção provocada pelas amostras Y ou NIC foi igualmente diferente.

Duas verificações sucessivas na 2^a e 3^a semanas após a inoculação em diferentes amostras de 15 animais, tomadas ao aca

so de cada um dos dos lotes, mostraram que de 93 a 100% da população inoculada com as amostras Y ou NIC, respectivamente, estava efetivamente infectada.

Contudo, a partir da 4^a semana de observação, nota-se uma nítida diferença entre os lotes, no que se refere à porcentagem de animais com parasitemia. Enquanto nos animais inoculados com a amostra Y os tripanossomas desaparecem da circulação por volta da 6^a semana, nos inoculados com a amostra NIC escassos tripomastigotas circulantes permanecem por longos períodos na circulação (até 14^a semana) em cerca de 53% dos animais.

A ausência de parasitemia evidente, em animais inoculados com a amostra Y a partir da 6^a semana após a inoculação, pode ser interpretada seja como cura espontânea seja como parasitemia subpatente, a qual não pode ser detectada pela técnica empregada, visto que esta é ineficiente na evidenciação do hemoflagelado em infecções crônicas da Doença de Chagas. Em qualquer dos casos, a comparação dos dois lotes de animais inoculados sugere que os mecanismos de defesa no lote inoculado com a amostra Y possuem maior controle da infecção nos animais sobreviventes que no lote inoculado com a amostra NIC.

Comparando diferentes amostras de T. cruzi BRENER (1965) verificou que as mesmas apresentam, quanto a sua morfologia, formas diferentes de tripomastigotas. Assim, a amostra Y apresentou predominância de formas delgadas, enquanto que, por exemplo, nas amostras ABC e PNM ocorriam, predominantemente, formas largas.

Por outro lado, BRENER (1969), trabalhando com amostras FL e Berenice de T. cruzi nas quais ocorria predomínio de uma ou outra forma de tripomastigota, demonstrou uma maior susceptibilidade das formas delgadas aos mecanismos imunes do hospedeiro.

Uma vez que a amostra Y, também estudada por BRENER, apresenta predomínio de formas delgadas, as quais são mais susceptíveis aos mecanismos imunes do hospedeiro, poderia justificar a ausência de parasitemia patente a partir da 6^a semana após a inoculação, quando os níveis de anticorpos se encontram relativamente altos.

Alterações nos níveis das proteínas ocorreram no decurso da infecção com as amostras Y ou NIC. Esses níveis se elevaram a partir da 1^a semana após a inoculação, mantendo-se relativamente altos até quase o final do período de observação de cada lote.

As curvas obtidas relacionando-se tempo de inoculação com

os níveis de proteínas apresentaram resultados concordantes nos soros de camundongos com uma ou outra amostra, salvo uma pequena diferença observada entre as 2^a e 3^a semanas após a inoculação. Tal diferença ocorre por conta da fração albumina, uma vez que esta se apresenta diminuída no mesmo período de observação, acompanhando a diminuição observada na curva de proteínas totais do lote de animais inoculados com a amostra Y.

Essa diferença entre o comportamento dos animais inoculados com as amostras Y ou NIC, no início da infecção, não foi investigada, podendo-se, entretanto, supor que neste período haja um maior catabolismo de albumina em animais inoculados com a amostra Y.

A elevação geral das proteínas séricas pode ser atribuída a uma hemoconcentração e/ou a um aumento absoluto de algumas proteínas do soro.

A hipótese da hemoconcentração, conseqüente de uma alteração nos mecanismos de reabsorção de água, encontra apoio nas observações de OLSEN et alii (1964) e de BICE et ZELEDON (1970) que demonstraram a presença de pseudocistos de amastigotas em tecido renal seja de animais naturalmente infectados, seja de animais experimentalmente infectados com algumas amostras de T.cruzi.

A análise das frações eletroforéticas, obtidas através da eletroforese em acetato de celulose, revelou, de modo geral, um aumento de todas as frações.

De modo geral os níveis de albumina dos soros de ambos os lotes estão acima do normal, ao contrário do que tem sido assinado por vários autores (PINTO et FALCÃO, 1958; SALUM et alii, 1959) no que se refere a seres humanos naturalmente infectados ou por SENECA et alii (1958) e CAPBERN et alii (1974) no que respeita a camundongos experimentalmente infectados pelo T.cruzi.

No que tange aos seres humanos, os baixos níveis de albuminas e de proteínas totais poderia ser conseqüência de uma dieta com deficiência crônica de proteínas. Esta dieta, segundo GOOD et alii (1976), determina em camundongos experimentais uma redução de 21% das proteínas totais e 15% de albumina. No entanto, no que se refere aos dados obtidos em camundongos, não encontramos justificativa para a discordância entre nossos resultados e os dos autores acima citados.

Apesar de termos encontrado elevação dos níveis de albumina, aparentemente a maior contribuição para o aumento dos ní

veis das proteínas totais provêm das alterações observadas nas globulinas. A partir da 3ª semana de observação, encontramos um discreto, porém significativo aumento nos níveis das frações α e β e acentuado aumento das frações de γ globulinas, em soros de ambos os lotes de animais inoculados com T.cruzi.

Tal elevação seguramente é conseqüente da resposta humoral do hospedeiro frente ao agente agressor, provavelmente como resultado do aumento do estímulo imunogênico resultante da liberação de produtos originários do metabolismo ou da lise do protozoário, visto que há um aumento do título de anticorpos detectados pela reação de imunofluorescência indireta.

É possível também que algumas das alterações dos níveis das globulinas sejam conseqüência da esplenomegalia ou das lesões provocadas pelo parasita, a exemplo do que ocorre na infestação pelo Schistosoma mansoni (BELFRAGE, 1963) ou na tripanossomíase africana (LUMSDEN, 1966).

De modo geral, as curvas dos níveis de proteínas totais e das frações eletroforéticas de ambos os lotes de animais foram superponíveis e sofreram variações cíclicas que, entretanto, não foram concordantes.

As flutuações cíclicas podem ser conseqüência dos sucessivos ciclos de desenvolvimento intra e extracelular, pelos quais passa o T.cruzi no mamífero hospedeiro. Esses sucessivos ciclos devem corresponder, no parasita, à formação de novas estruturas e, portanto, de novos antígenos, o que pode alterar a expressão imunogênica e antigênica do protozoário, levando o hospedeiro novamente a uma estimulação com produção de anticorpos de diferentes classes e subclasses e de afinidades e especificidades mais variadas.

Por outro lado, a mudança da fase intracelular para extracelular, acarretando lesões de novas células, pode acarretar um aumento de α globulinas, como ocorre na infestação pelo S. mansoni (BELFRAGE, 1963).

As reduções dos níveis das globulinas podem ocorrer em conseqüência:

1. Da fase intracelular, quando, então, o material imunogênico torna-se inacessível aos linfócitos sensibilizados, cessando o estímulo da produção de novas moléculas de imunoglobulinas.

2. Da neutralização, pelas imunoglobulinas específicas,

dos antígenos liberados na circulação.

3. De uma alteração no catabolismo das proteínas plasmáticas.

Segundo JENNINGS et alii (1973), há um aumento do catabolismo das proteínas plasmáticas de camundongos infectados com T. brucei. Considerando-se que aparentemente tal fato também ocorre em camundongos infectados com T. cruzi, pois tem sido demonstrada in vitro atividade proteolítica em extrato bruto de formas epimastigotas de T. cruzi com ação sobre globulina e albumina de soro humano (RANGEL et alii, 1976), teríamos possibilidade de incriminar também a 3ª alternativa acima como responsável pelas reduções temporárias dos níveis das proteínas séricas.

Os resultados por nós obtidos na análise das frações α , β e γ globulinas estão em pleno acordo com dados apresentados por diferentes pesquisadores (PINTO et FALCÃO, 1958; SENECA et alii, 1958; SALUM et alii, 1959, CAPBERN et alii, 1974).

A análise pela imunoeletroforese cruzada revelou alterações nos padrões eletroforéticos dos soros de camundongos em ambos os lotes, não mostrando, entretanto, diferenças significativas entre os dois lotes.

Os padrões eletroforéticos dos soros do lote inoculado com a amostra Y e do inoculado com a amostra NIC foram semelhantes, tendo confirmado aumento das regiões de albumina, α e β globulinas.

Nos níveis séricos das frações que possuem mobilidade eletroforética correspondente as β globulinas, observamos, no início da infecção chagásica, uma redução que ocorreu imediatamente após a conclusão do primeiro ciclo intracelular do parasita, isto é, após o aparecimento na circulação dos primeiros tripomastigotas originários do ciclo intracelular que se completa, segundo DVORAK et HYDE (1973) por volta de 6,5 dias após a infecção da célula hospedeira, in vitro.

Como não foi detectada na ocasião, a presença de anticorpos, podemos praticamente excluir a possibilidade de que esta redução seja devida à absorção de imunoglobulinas específicas pelos antígenos liberados na circulação, a menos que existam anticorpos naturais específicos para determinantes internos do hemoflagelado.

A hipótese mais provável é que a redução observada seja reflexo do consumo dessas proteínas ou pelo próprio T. cruzi ou

pelo aumento do catabolismo dessas proteínas.

A normalização dos níveis das β globulinas inicia-se entre a 2^a e 3^a semanas de observação, ocasião em que podem ser evidenciados anticorpos específicos para T.cruzi. Este fato, sugere fortemente que as flutuações nos níveis das imunoglobulinas estão em correlação com a produção de anticorpos para diferentes determinantes antigênicos do parasita ou o envolvimento de diferentes classes de imunoglobulinas.

O aparecimento de um novo componente na região das β globulinas, tanto em soro de animais experimentalmente inoculados, seja com amostras de T.cruzi, seja com hemácias de carneiro, quanto em soro de animais normais, a partir da 2^a semana de observação, poderia ser decorrente do aparecimento de imunoglobulinas da classe Ig M que, tornam-se evidenciáveis pela imunodifusão radial em soro de camundongos entre 2 e 3 semanas de idade, dependendo da amostra de animal considerada, e atingem níveis semelhantes aos apresentados por soro de camundongos adultos por volta da 8^a semana de idade (FAHEY et BARTH, 1965).

Quanto à redução dos componentes que possuem mobilidade eletroforética correspondente às regiões de α globulina e de albumina, que também ocorreram apenas em camundongos infectados com T.cruzi, acreditamos seja resultante de seu consumo pelo hemoprotozoário.

Esta hipótese está de acordo com as observações de O'DALY (1975) e BRETANA et al (1976), que demonstraram in vitro a presença de cinco proteínas em soro fetal de bovino, essenciais para a multiplicação e crescimento de T.cruzi em meio de cultura. Das cinco proteínas caracterizadas por estes autores, três apresentaram identidade com a fração V do soro de Cohn e migraram de modo idêntico na imunoeletroforese. Das duas proteínas restantes, uma migrou na região das α e a outra na região das β globulinas.

A comparação dos padrões obtidos pela imunoeletroforese cruzada, com soros dos lotes de animais inoculados com as amostras Y ou NIC de T.cruzi, não mostrou diferenças significativas entre as duas amostras.

Por outro lado, os níveis de anticorpos verificados pela imunofluorescência indireta também não mostraram diferenças significativas entre os soros de ambos os lotes.

O conjunto de nossas observações nos mostra que, embora as amostras de T.cruzi utilizadas na presente investigação tenham

comportamentos biológicos diferentes, a resposta imunitária avaliada pela dosagem de proteínas, pela eletroforese em acetato de celulose, pela imunoeletroforese cruzada e pela imunofluorescência indireta, não mostrou diferenças significativas.

Este fato não invalida a hipótese da existência de diferenças na resposta imunitária durante a infecção com ambas as amostras.

Se por um lado o teor das diferentes globulinas e de anticorpos foi idêntico, por outro não temos informações sobre a especificidade desses anticorpos, nem sobre as diferentes classes e subclasses envolvidas.

A identificação das várias classes e subclasses de imunoglobulinas produzidas sob o estímulo de diferentes amostras de T.cruzi é de suma importância para se investigar o mecanismo de controle da infecção, visto que é sabido que as mesmas possuem características biológicas diferentes.

V - CONCLUSÕES

1. Camundongos de uma mesma linhagem, inoculados com as amostras Y ou NIC de T.cruzi, apresentaram diferentes índices de parasitemia e de mortalidade, indicando que essas amostras apresentam diferentes graus de patogenicidade.

2. Os perfis sorológicos, avaliados pela imunofluorescência indireta, dos camundongos infectados com uma ou outra amostra de T.cruzi não apresentaram diferenças significativas.

3. Alterações cíclicas dos níveis das frações albumina, α , β e γ globulinas foram observadas nos soros de camundongos infectados com qualquer das amostras de T.cruzi utilizadas.

4. Experiências de imunoeletroforese cruzada revelaram que durante a infecção de camundongos pelo T.cruzi ocorre uma redução do nível de três componentes séricos presentes nas regiões das albuminas, α e β globulinas.

Tabela I - Número de animais com parasitemia em grupos de 15 camundongos, e de mortos em diferentes períodos após a inoculação com as amostras Y ou NIC de T. cruzi.

Amostras	NIC				Y			
	Nº de ani- mais com parasitemia	Nº acumulado de mortos	Nº de sobre vivos	% acumulada de mortes	Nº de ani- mais com parasitemia	Nº acumulado de mortos	Nº de sobre vivos	% acumulada de mortes
1	6	2	223	0,9	3	0	225	0
2	15	2	208	0,9	14	0	210	0
3	15	6	189	3,0	14	53	142	27,1
4	15	6	174	3,0	9	78	102	44,7
5	15	6	159	3,0	3	81	84	47,6
6	15	14	136	8,8	0	84	66	51,2
7	15	15	120	9,6	0	86	49	54,2
8	14	15	105	9,6	0	87	33	56,2
9	14	15	90	9,6	0	87	18	56,2
10	10	15	75	9,6	-	-	3	56,2
11	11	15	60	9,6	-	-	-	-
12	9	15	45	9,6	-	-	-	-
13	8	15	30	9,6	-	-	-	-
14	8	15	15	9,6	-	-	-	-
TOTAIS	170	-	-	-	43	-	-	-

Tabela II - Teor das proteínas séricas totais e frações, em camundongos inoculados com amostras Y ou NIC de T.cruzi em diferentes períodos, em mg/ml de soro, após a inoculação.

Amostra Frações Semanas	NIC						Y					
	A	α	β	γ	A/G	P.T.	A	α	β	γ	A/G	P.T.
0	17	17	12	8	0,46	54	16	15	12	11	0,42	54
1	23	16	12	7	0,66	58	22	16	12	11	0,56	62
2	31	18	14	7	0,80	70	16	14	14	10	0,42	54
3	26	16	21	18	0,47	81	21	22	16	15	0,40	74
4	26	21	19	15	0,47	81	20	20	17	27	0,31	85
5	21	14	17	18	0,43	70	22	13	15	24	0,42	74
6	26	17	19	24	0,43	85	26	22	17	20	0,44	85
7	24	19	16	21	0,43	81	26	21	16	18	0,47	81
8	23	23	16	16	0,42	78	24	16	13	21	0,48	74
9	23	27	12	16	0,42	78	25	19	15	15	0,51	74
10	22	21	12	19	0,42	70	-	-	-	-	-	-
11	22	18	14	15	0,47	85	-	-	-	-	-	-
12	24	17	17	27	0,39	70	-	-	-	-	-	-
13	25	15	13	17	0,56	81	-	-	-	-	-	-
14	28	18	15	21	0,52	54	-	-	-	-	-	-

Tabela III - Teor em mg/ml de soro das proteínas séricas totais em camundongos normais ou inoculados com hemácias de carneiro, em diferentes períodos após a inoculação.

Camundongos Semanas	Normais	Inoculados
1	64	60
2	64	64
3	64	60

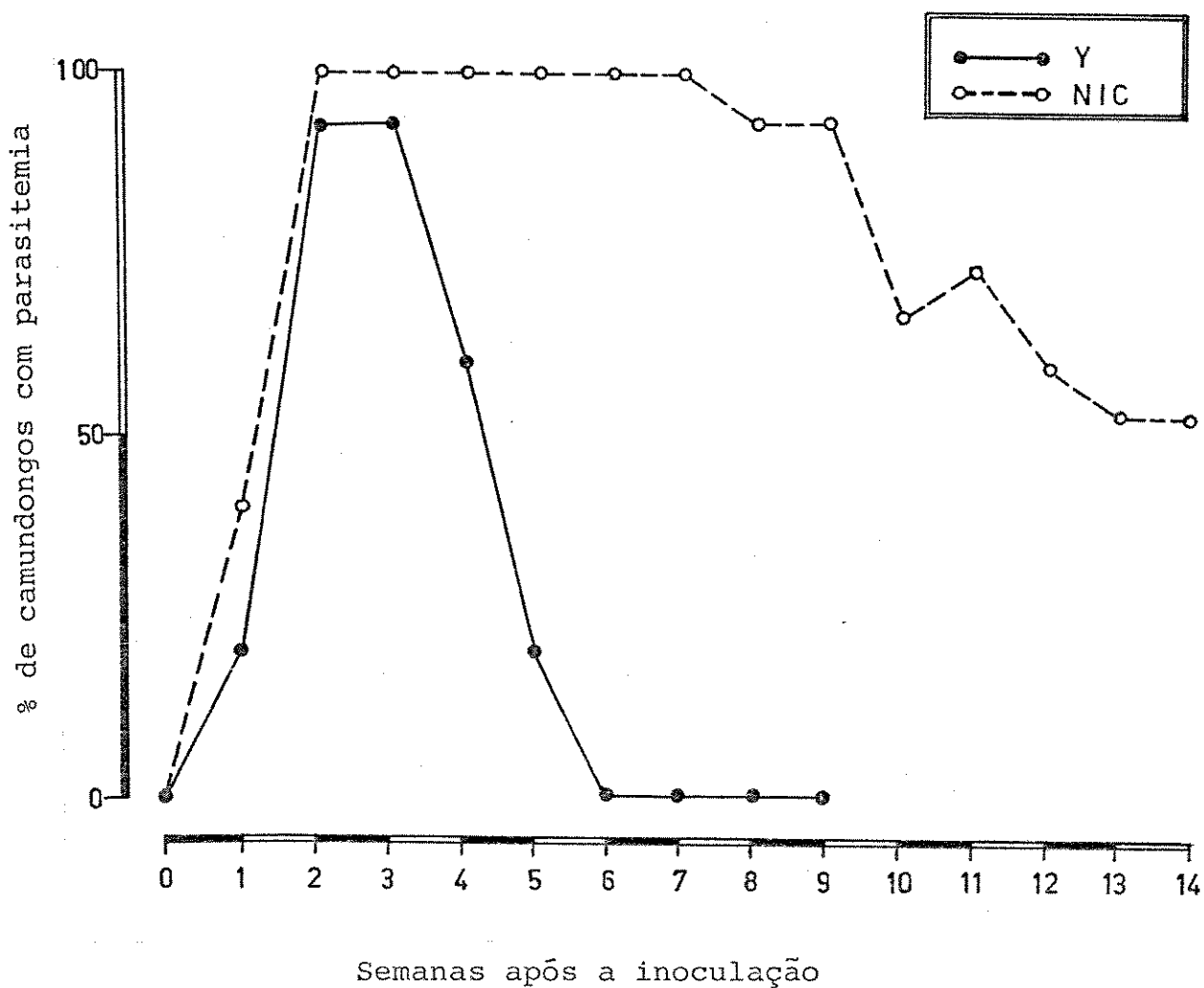


Figura 1 - Porcentagem de animais com parasitemia, em amostras de 15 camundongos, em relação ao tempo de inoculação com as amostras Y ou NIC de T.cruzi.

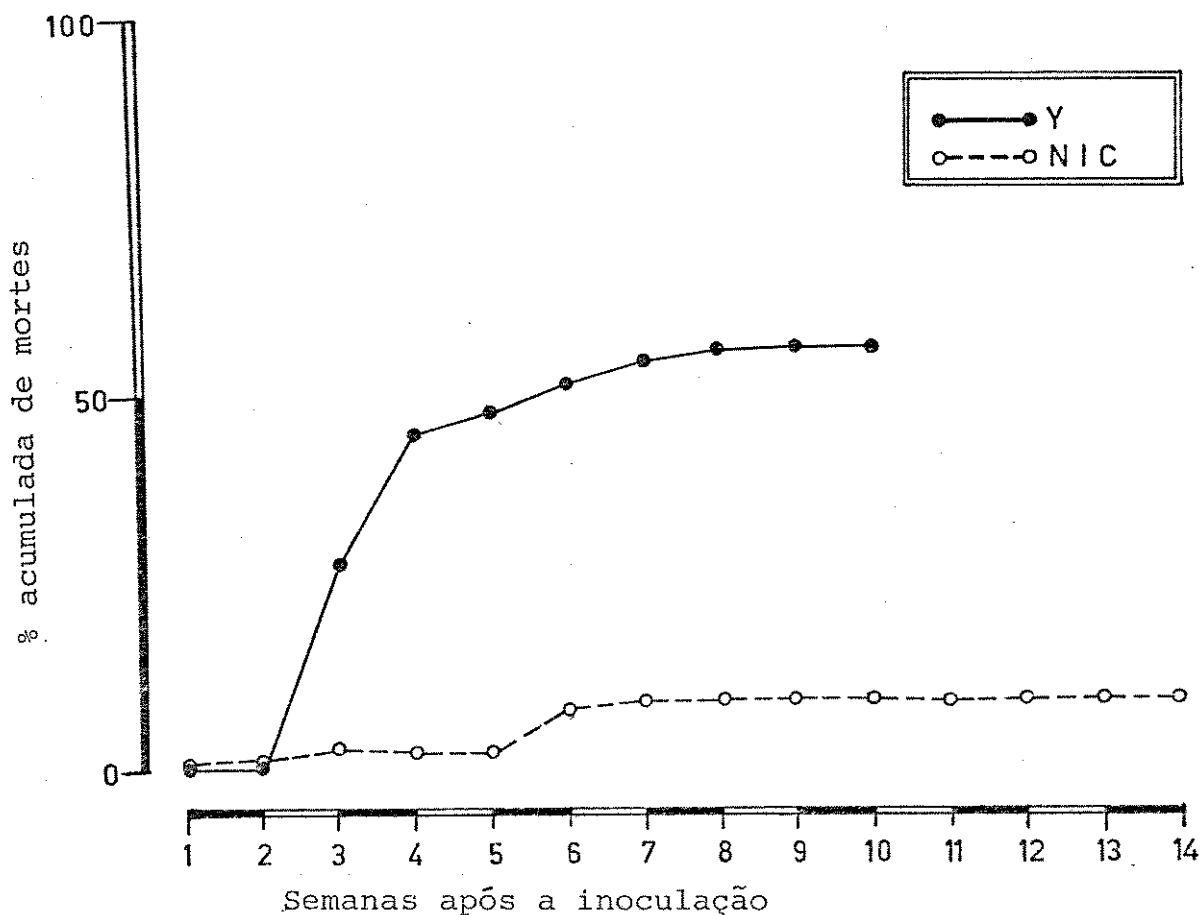


Figura 2 - Proporção acumulada de mortes de camundongos inoculados com as amostras Y ou NIC de T.cruzi, em relação ao tempo de inoculação.

A proporção de animais mortos foi calculada segundo a expressão $p = \frac{m_j}{p_i}$, sendo $p_i = p_0 - \left\{ \left(m_j^1 + \dots + m_j^n \right) + 15(n-1) \right\}$, n o número da semana em que foi feita a observação, p_0 a população inicial e m_j o número de mortos.

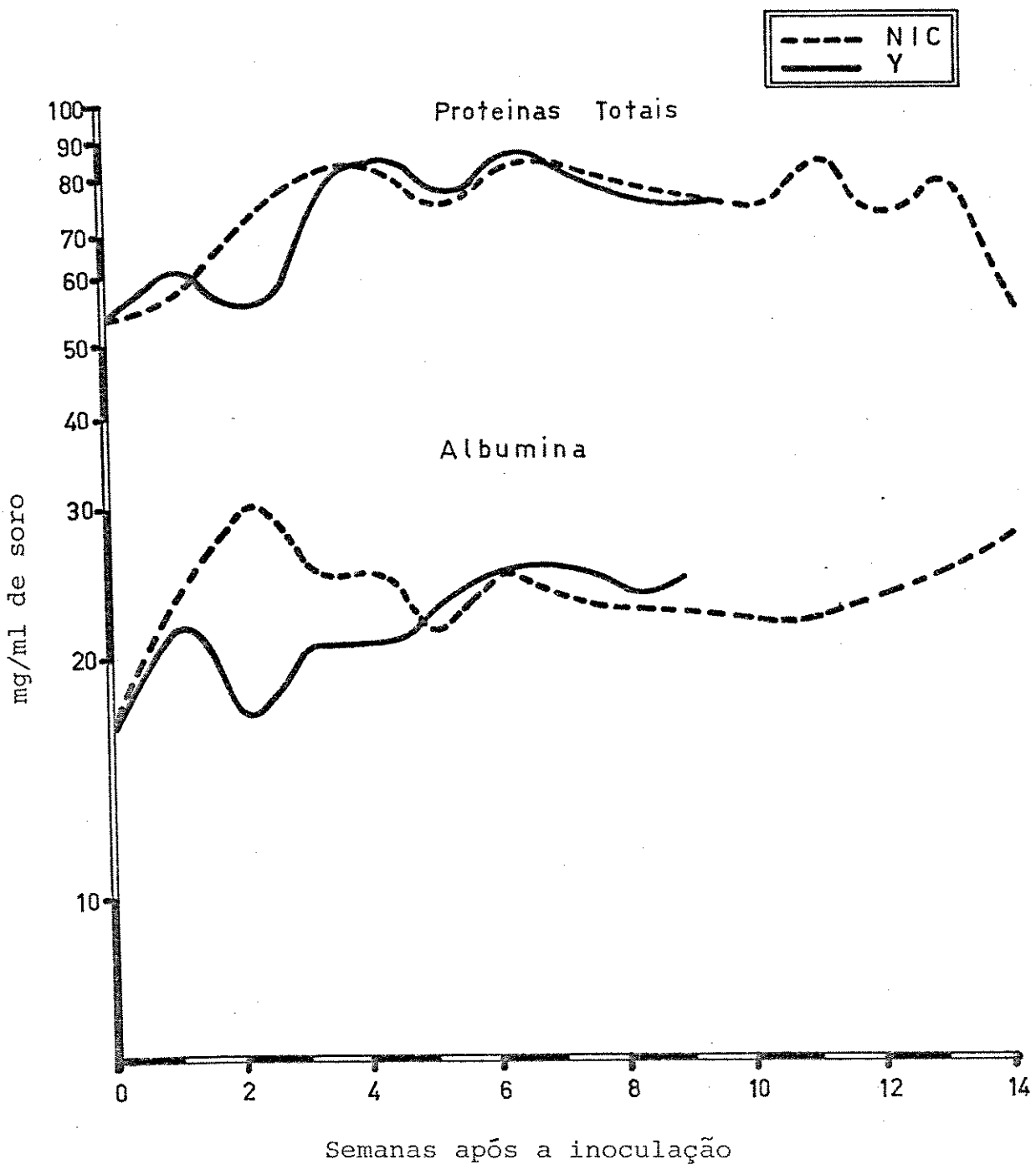


Figura 3 - Níveis de proteínas séricas totais e de albumina, em mg/ml de soro, em grupos de 15 animais inoculados com as amostras Y ou NIC de T.cruzi, em relação ao tempo de inoculação.

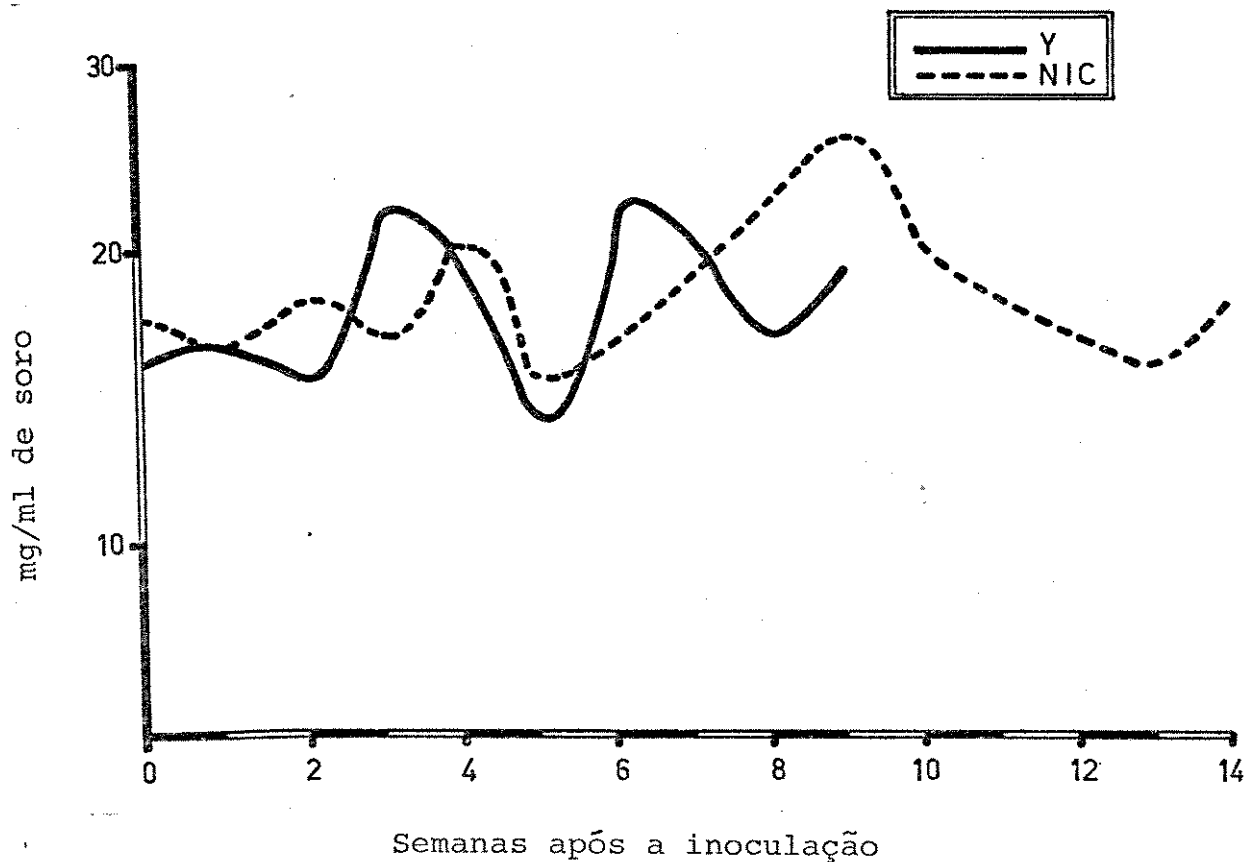


Figura 4 - Níveis da fração α globulina, em mg/ml de soro, em grupos de 15 animais inoculados com as amostras Y ou NIC de T.cruzi, em relação ao tempo de inoculação.

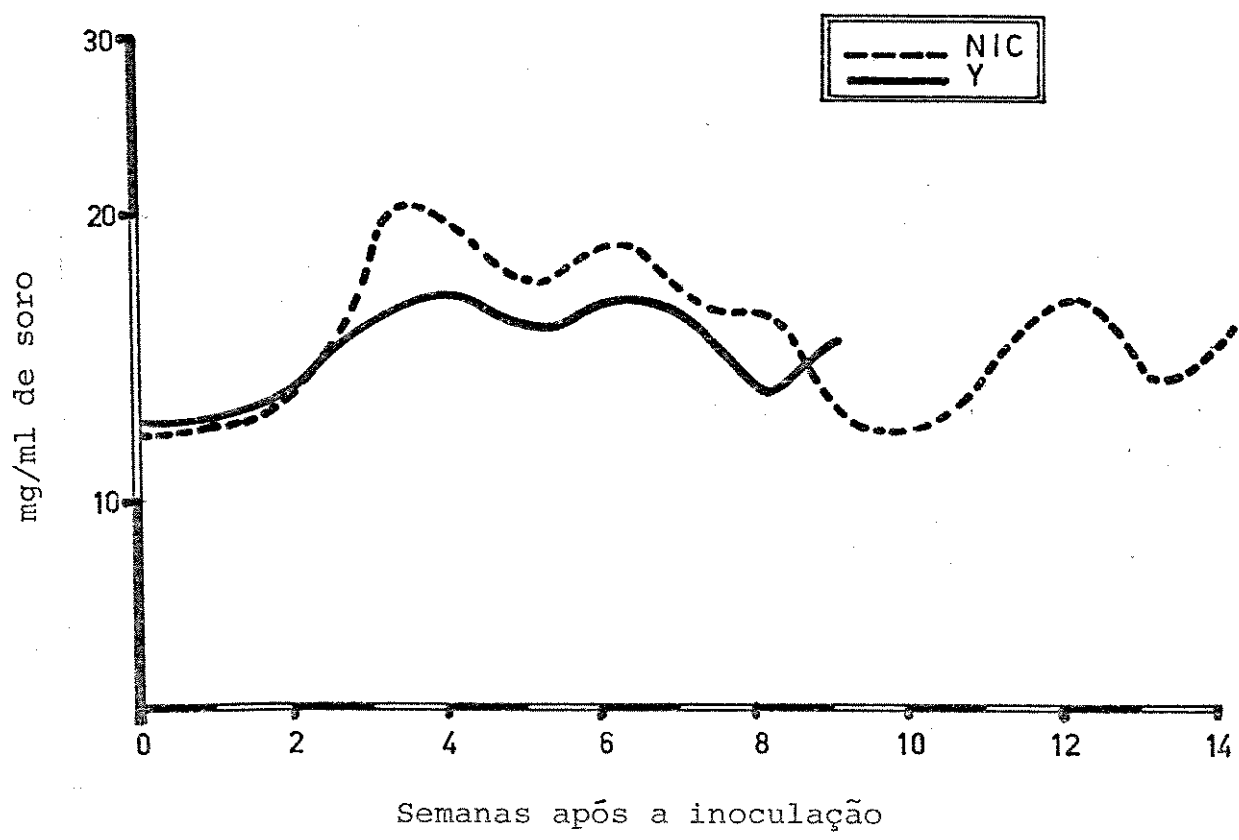


Figura 5 - Níveis da fração β globulina, em mg/ml de soro, em grupos de 15 animais inoculados com as amostras Y ou NIC de T.cruzi, em relação ao tempo de inoculação.

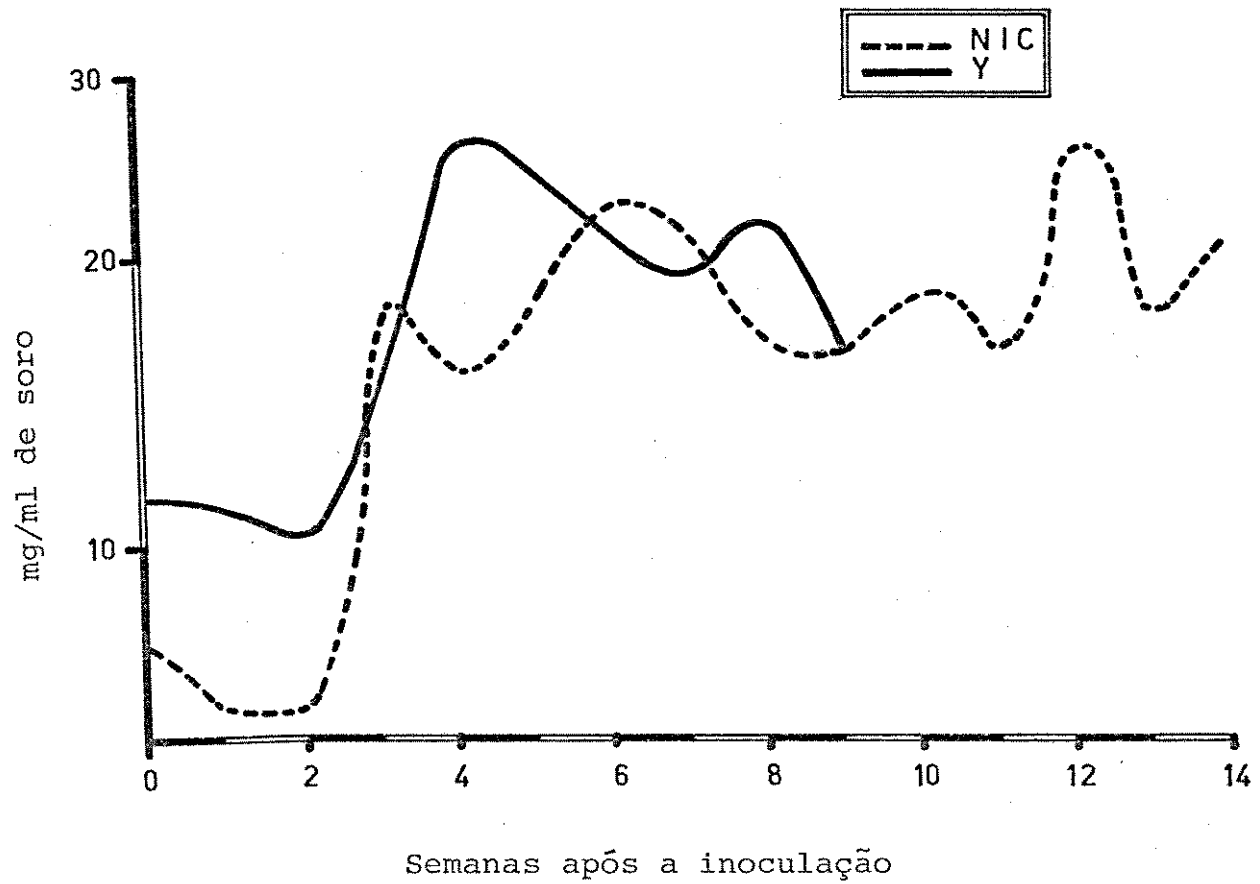
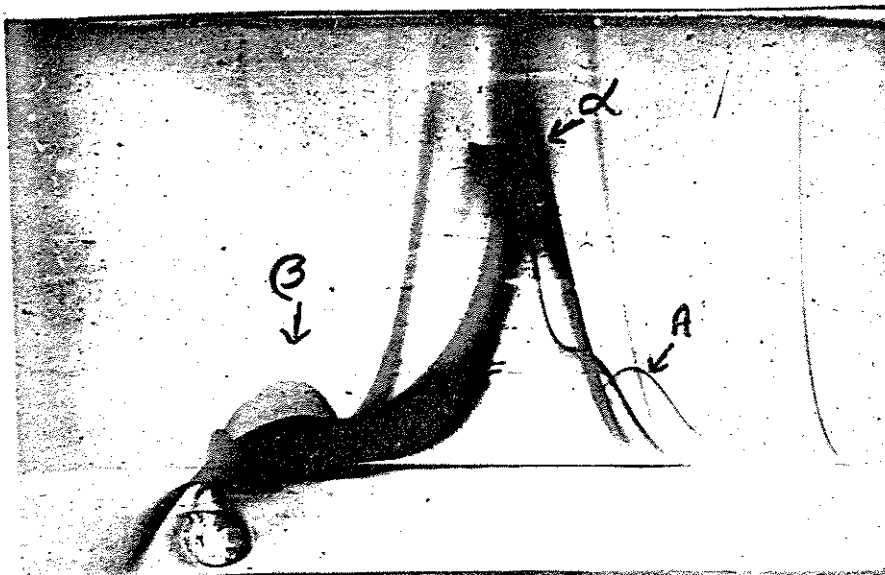
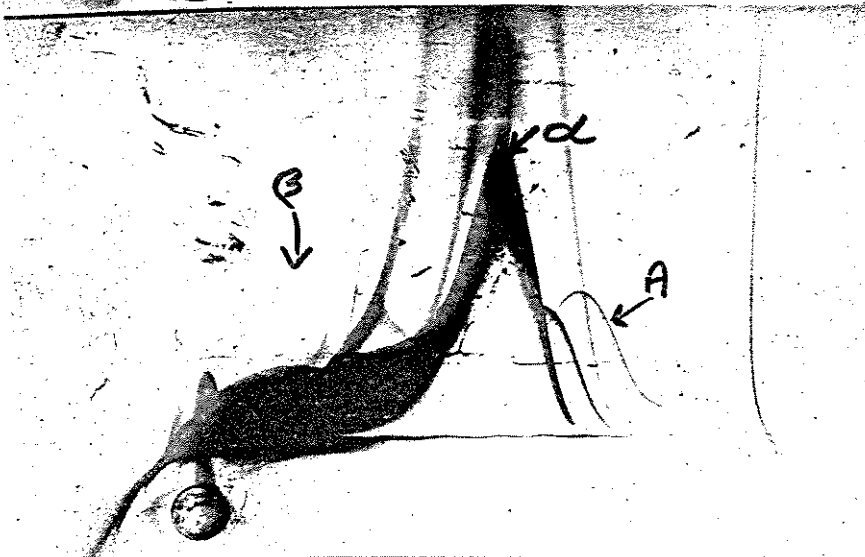


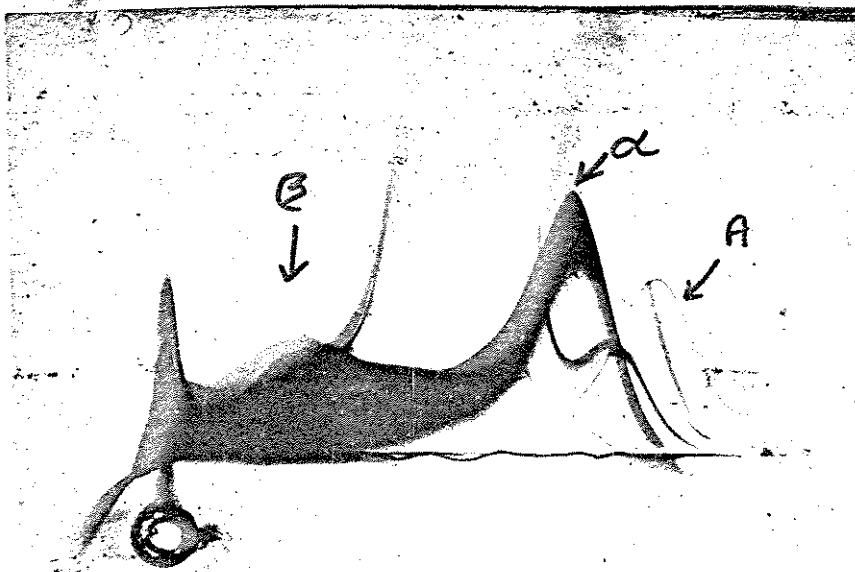
Figura 6 - Níveis da fração γ globulina, em mg/ml de soro, em grupo de 15 animais inoculados com as amostras Y ou NIC de T.cruzi, em relação ao tempo de inoculação.



1^a semana



2^a semana



3^a semana

Figura 7 - Padrão imunoeletroforético de soros de camundongos após 1^a, 2^a e 3^a semanas de inoculação com a amostra NIC de T.cruzi.

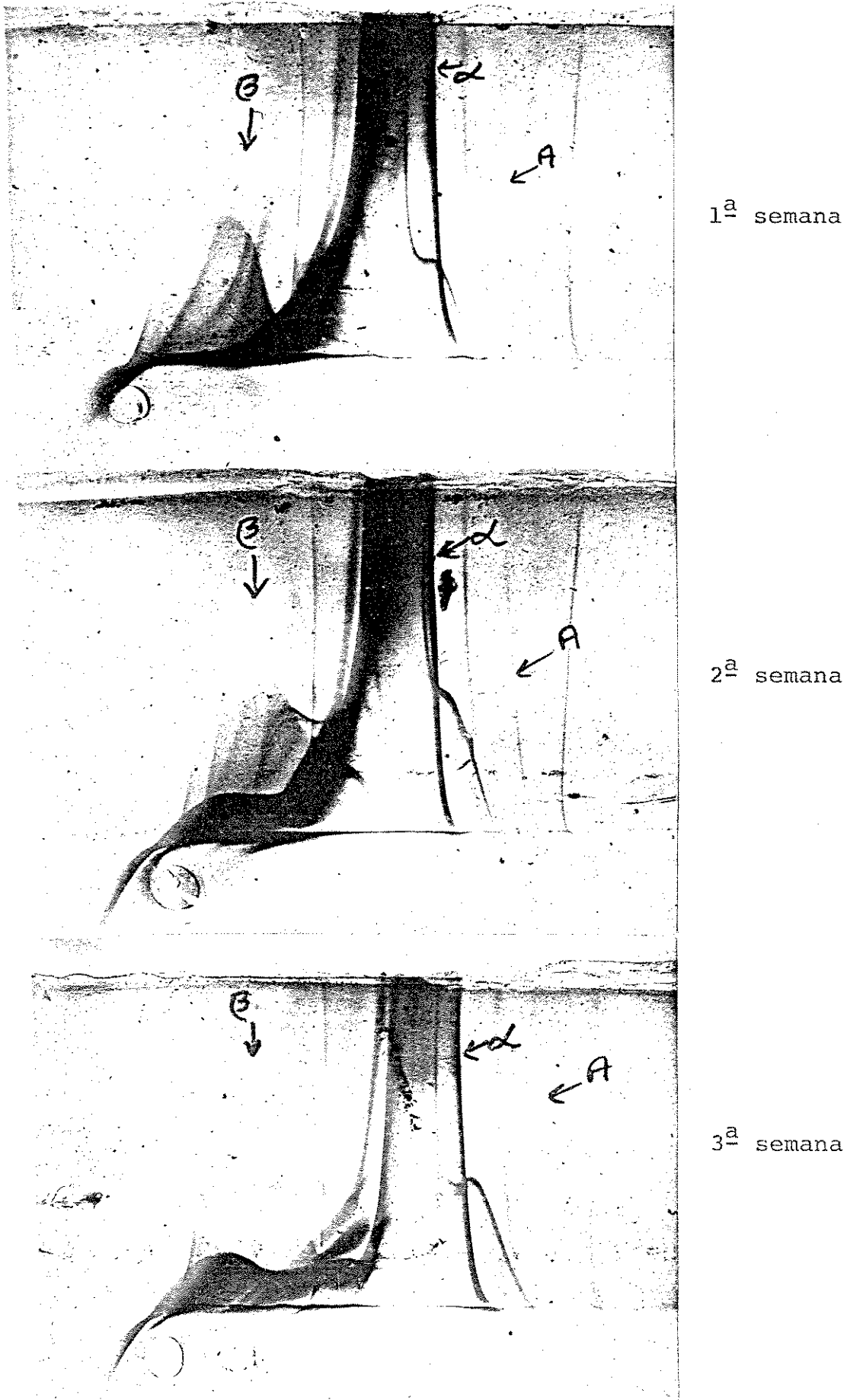
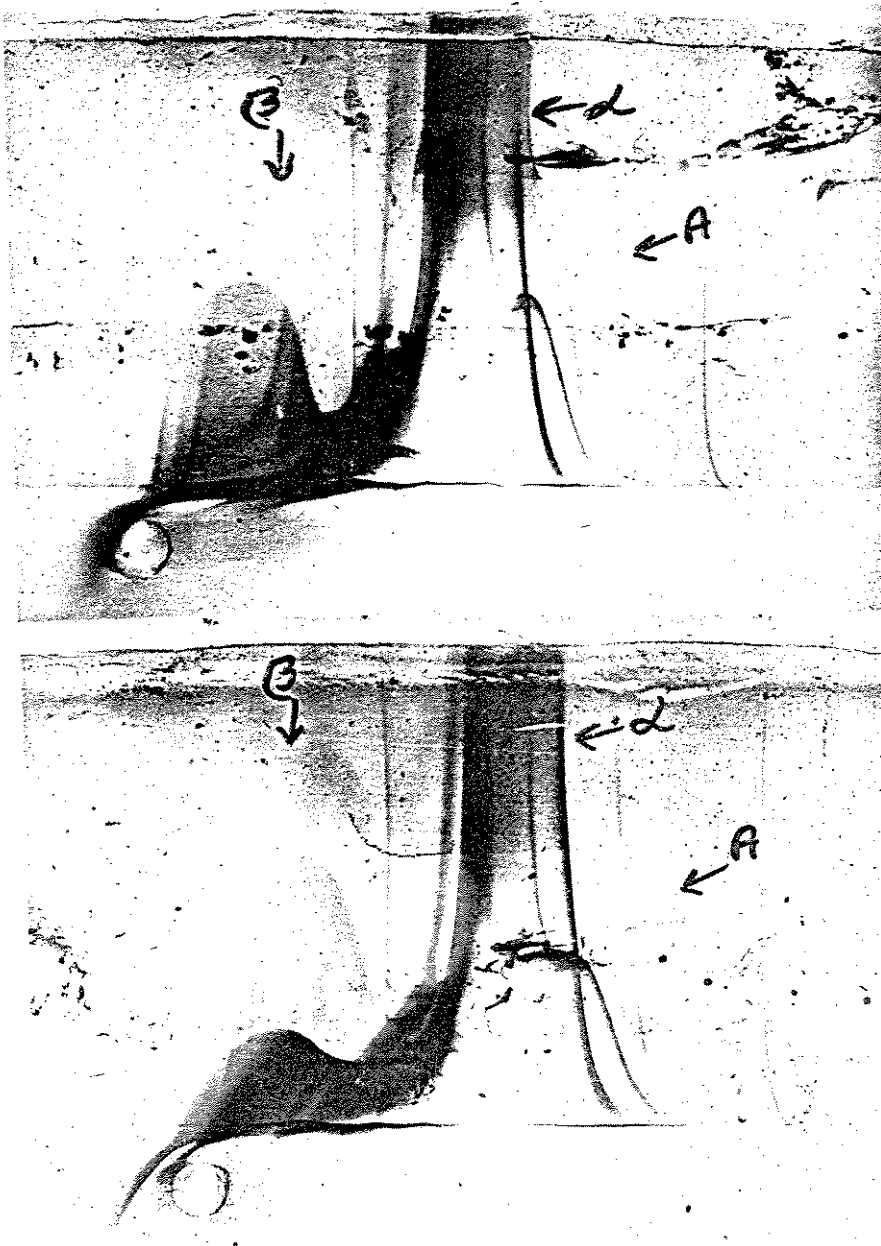


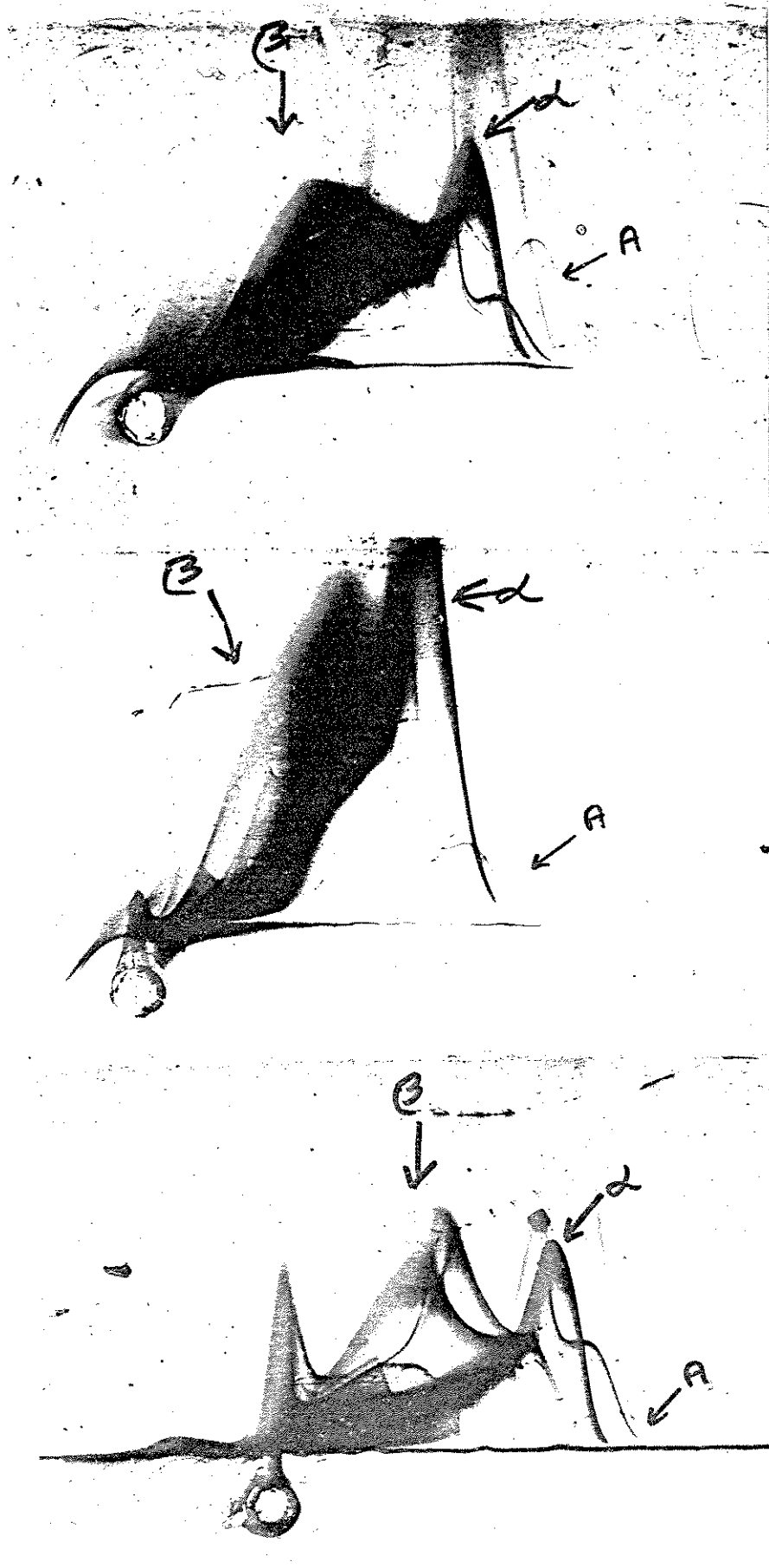
Figura 8 - Padrão imunoeletroforético de soros de camundongos normais de idades correspondentes a 1ª, 2ª e 3ª semanas após a inoculação.



1ª semana

3ª semana

Figura 9 - Padrão imunoelctroforético de soros de camundongos inoculados com hemácias de carneiro e de idades correspondentes a 1ª e 3ª semanas após a inoculação.

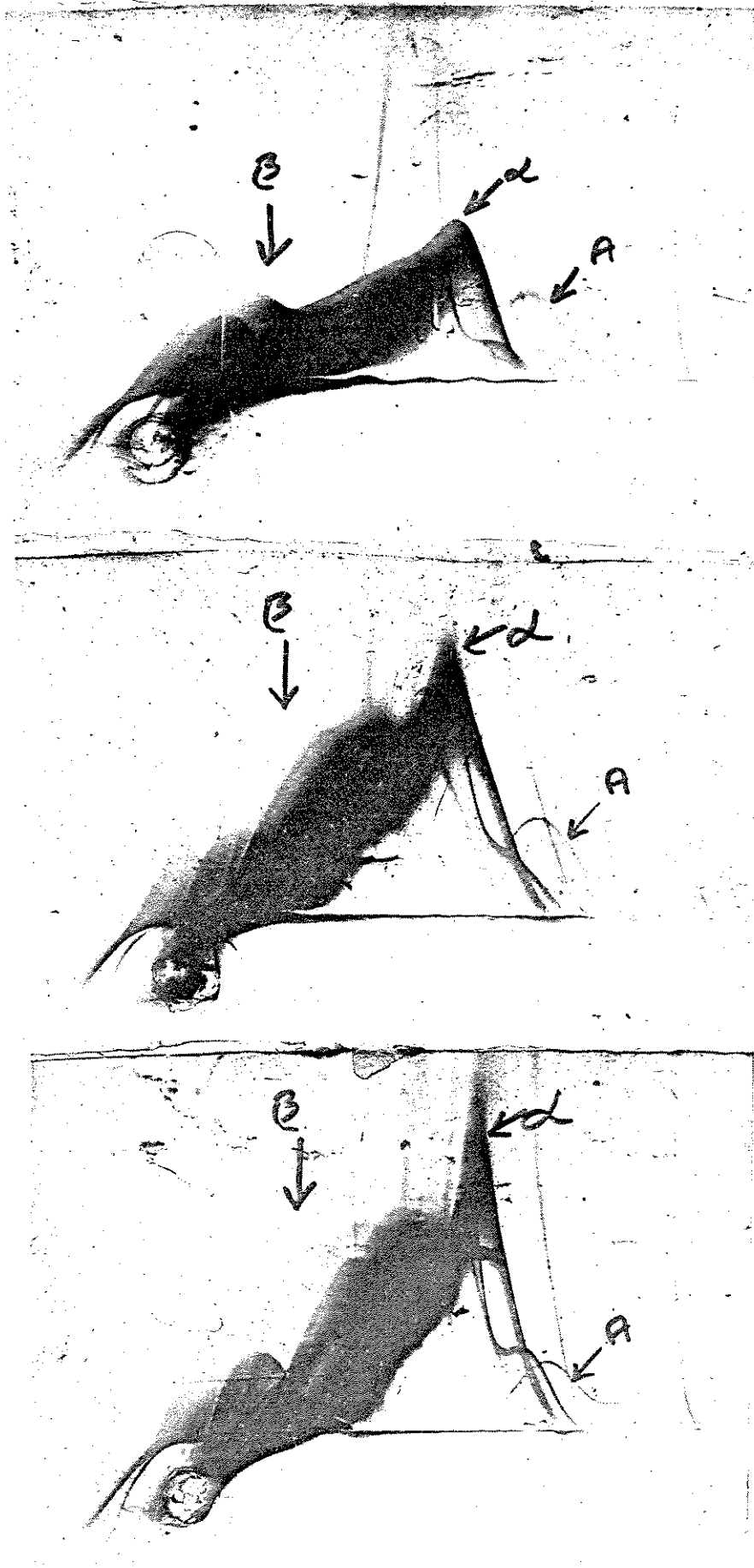


6^a semana

9^a semana

12^a semana

Figura 10 - Padrão imunoelctroforético de soros de camundongos após a 6^a, 9^a e 12^a semanas após a inoculação com a amostra NIC de T.cruzi.



3^a semana

6^a semana

9^a semana

Figura 11 - Padrão imunoelctroforético de soros de camundongos após a 3^a, 6^a e 9^a semanas após a inoculação com a amostra Y de T. cruzi.

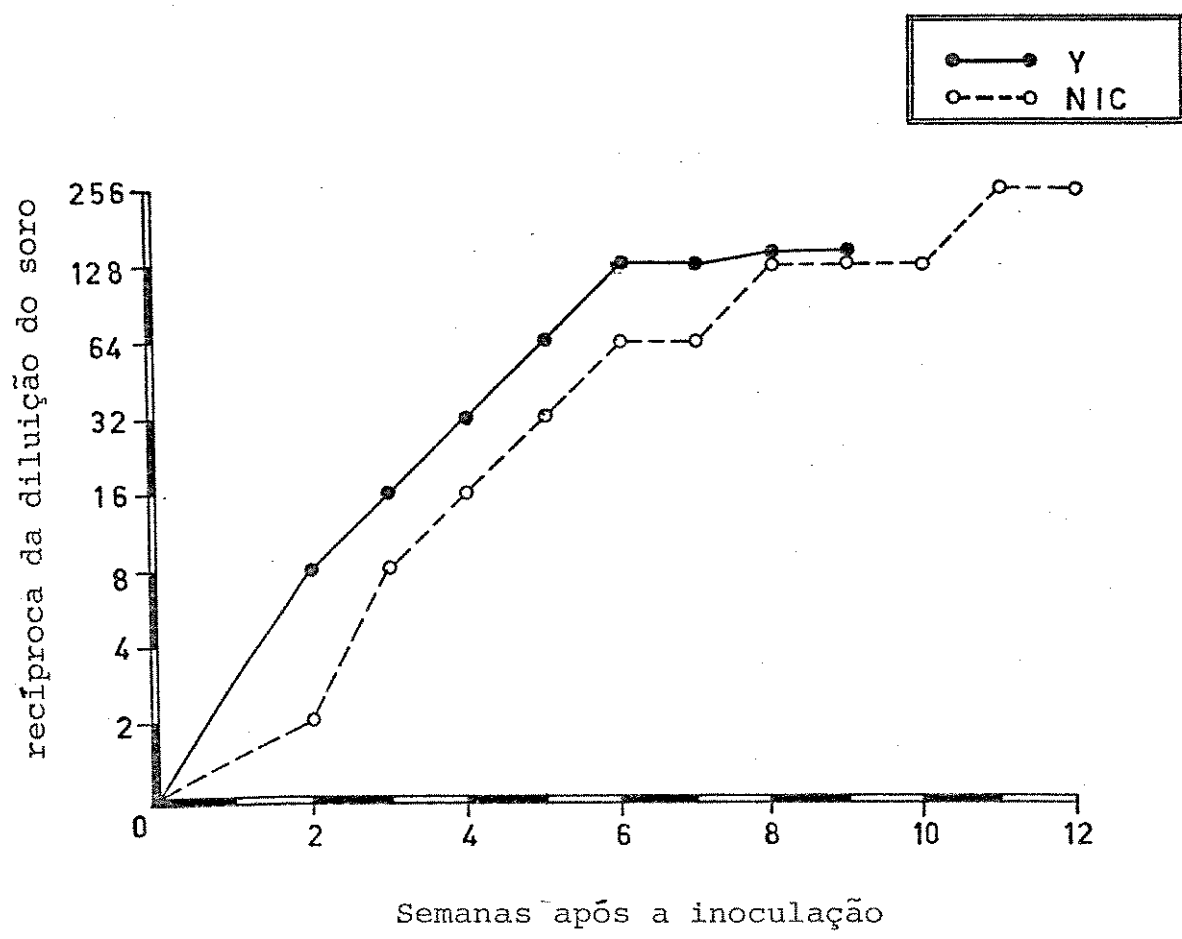


Figura 12 - Evolução dos níveis de anticorpos anti T.cruzi, de tectados pela reação de imunofluorescência indireta, em grupos de 15 camundongos inoculados com as amostras Y ou NIC de T.cruzi.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCON SEGOVIA, S. et alii - Immunology of Chagas' disease. Bull. Wld Hlth Org., 50(5):459-72, 1974.
- ANDRADE, S. G. - Caracterização de cêpas do Trypanosoma cruzi isoladas no reconcavo baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). Revta Pat. trop., 3(1):65-121, 1974.
- ANDRADE, S. G.; SILVA, A. A. da; ANDRADE, Z. A. - Bloqueio e estimulação do S.R.E. na doença de Chagas (Estudo experimental em camundongos). Gazeta med.Bahia, 67(1):19-30, 1967.
- BELFRAGE, S. - Plasma protein in the course of acute infections disease. Acta med.scand.Suppl., 395:169, 1963.
- BICE, D. E. & ZELEDON, R. - Comparison of infectivity of strains of T.cruzi (Chagas, 1909). J.Parasit., 56(4):663-70, 1970.
- BRENER, Z. - The behaviour of slender and stout forms of T.cruzi in the blood-stream of normal and immune mice. Ann.trop.Med. Parasit., 63:215-20, 1969.
- BRENER, Z. - Comparative studies of different strains of Trypanosoma cruzi. Ann.trop.Med.Parasit., 59:19-25, 1965.
- BRENER, Z. - Contribuição ao estudo da terapeutica experimental da doença de Chagas. Belo Horizonte, 1961. (Tese - F.O.F.U. M.G.).
- BRETAÑA, A. & O'DALY, J. A. - Uptake of fetal proteins by Trypanosoma cruzi immunofluorescence and ultrastructural studies. Int.J. Parasit., 6(5):379-86, 1976.
- CAMARGO, M. E. - Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi, in a slide test. Revta. Inst.Med.trop.S Paulo, 8(5):227-34, 1966.
- CAMARGO, M. E. - Introdução às técnicas de imunofluorescência. São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, 1971. (mimeogr.).

CAPBERN, A.; MATTERN, P.; PAUTRIZEL, R. - Étude comparative du taux de protéines sériques au cours de Trypanosomoses à Trypanosoma gambiense et à Trypanosoma cruzi chez la souris. Exp.Parasit., 35(1):86-91, 1974.

CERISOLA, J. A.; ALVAREZ, M.; BOCK, M.; WEGNER, D. - A comparison of a new antigen from amastigotes of T.cruzi and a antigen from epimastigotes for the diagnosis of Chagas'disease by the indirect immunofluorescence test. Revta Inst.Med.trop.SPaulo, 13(3):162-6, 1971.

CLARKE, H. G. M. - Two-dimensional (LAURELL) immunoelectrophoresis for stimulation of antigen in relative units. IN: WILLIAMS, C. A. T. A. & CHASE, M. W., ed. - Methods in immunology and immunochemistry. London, Academic Press, 1971. v.3.

DVORAK, J. A. & HYDE, T. P. - Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. I. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. Exp.Parasit., 34(2):268-83, 1973.

FAHEY, J. L. & BARTH, W. F. - The immunoglobulins of mice. 4. Serum immunoglobulin changes following birth. Proc.Soc.exp. Biol.Med., 118(3):596-600, 1965.

FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. - Growth and characteristics and chemical composition of T.cruzi. Exp.Parasit., 18(1/3):195-202, 1966.

GOOD, R. A.; FERNANDES, G.; YUNIS, E. J.; COOPER, W. C.; JOSE, D. C.; KRAMER, T. R.; HANSEN, M. A. - Nutritional deficiency, immunologic function, and disease. Am.J.Path., 84(3):599-614, 1976.

GRABAR, P. - El método de analisis inmunolectroforético. IN: GRABAR, P. & BURTIM, P. - Inmunolectroforesis. Barcelona, Toray-Masson, 1968. Cap.10, p.3-26.

GUERREIRO, C. & MACHADO, A. - Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. Bras.-méd., 27:225-6, 1913.

HAUSCHKA, T. S.; GOODWING, M. B.; PALMQUIST, J.; BROWN, E. - Immunological relationship between seven strains of Trypanosoma

- cruzi and its applications in the diagnosis of Chagas disease. Am.J.trop.Med., 30:1-16, 1950.
- JENNINGS, F. W.; MURRAY, P. K.; MURRAY, M.; URQUHART, G. M. - Protein catabolism in trypanosomiasis. Trans.R.Soc.trop.Med.Hyg., 67(2):277, 1973.
- KABAT, E. A. & MAYER, M. M. - Immunoquimica experimental. 2.ed. Mexico, Prensa Medica Mexicana, 1968 Cap.13, p.449-55.
- LUMSDEN, W. H. R. - Estimation of serum Ig M in the diagnosis of human trypanosomiasis. Trans.R.Soc.trop.Med.Hyg., 60:125, 1966.
- MARR, J. S. & PIKE, E. H. - The protection of mice by "Corpus Christi" strain of T.cruzi when challenged with "Brasil strain". J.Parasit., 53(3):657-9, 1967.
- MAZZOTTI, L. - Variations in virulence for mice and guinea pigs in strains of T.cruzi Chagas from different species of bugs (Triatomidae) from different localities in Mexico. Am.J.Hyg., 31:67-85, 1940.
- MEDINA, M. & CHAVES, J. - Gel diffusion and immunoelectrophoretic analysis of some Venezuelan T.cruzi strains. Acta cient.venez., 21:65-7, 1970.
- MUNIZ, J. - Do valor da reação de precipitina no diagnóstico das formas agudas e sub-agudas da "doença de Chagas" (Trypanosomiasis americana). Mems Inst.Oswaldo Cruz, 45(3):537-49, 1947.
- MUNIZ, J. & FREITAS, G. - Contribuição para o diagnóstico da "doença de Chagas" pelas reações de imunidade. I. Estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação do complemento. Mems Inst.Oswaldo Cruz, 41(2):303-33, 1944.
- NUSSENZWEIG, V.; DEANE, L. M.; KLOETZEL, J. - Differences in antigenic constitution of strain of T.cruzi. Exp.Parasit., 14:221-32, 1963.
- O'DALY, J. A. - Serum proteins promoting (³H) Thymidine uptake by Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi (Chagas) in vitro. J.Protozool., 22(4):550-5, 1975.

- OKUMURA, M. - Contribuição para o estudo das lesões dos neurônios do plexo misentérico do colo na molestia de Chagas experimental no camundongo branco (*Mus musculus*, L.). São Paulo, 1966. (Tese - Doutoramento - FMUSP).
- OLIVEIRA LIMA, A. & DIAS DA SILVA, W. - Imunologia, imunopatologia e alergia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1970. p.23, 573.
- OLSEN, P. F.; SHOEMAKER, J. P.; TURNER, H. F.; HAYR, H. L. - Incidence of Trypanosoma cruzi (Chagas) in wild vectors and reservoirs in east-central Alabama. J.Parasit., 50(5):599-603, 1964.
- PINTO, C. & FALCÃO, P. - Eletroforese na doença de Chagas. Revta bras.Med., 15(8):536-9, 1958.
- PIZZI, T. & PRAGER, R. - Estabilizacion de la virulência de una cepa de T.cruzi por pasage seriado en ratones de constitucion genetica uniforme: analisis cuantitativo del curso de la infeccion. Biologica, 16/17:3-12, 1952.
- POTHIER, M. A.; SCHMUNIS, G. A.; VATTUONE, N. H.; TRAVERSA, O. C.; YANOVSKY, J. F. - Valeur diagnostique des differentes formes parasitaires dans la Trypanosomose americaine experimentale en immunofluorescence chez la souris. Ann.Parasit., 44:225-30, 1969.
- RANGEL, H. A.; REPKA, D.; COSTA, M. G. - Proteolytic activity of T.cruzi crude extracts. Mems Inst.Oswaldo Cruz, 75, 1977 (no prelo).
- REY, L. - Parasitologia. Rio de Janeiro, Guabanara Koogan, 1973. Cap.8, p.107.
- SALUM, J.; LACAZ, P. S.; VORGES, C.; RASSI, A.; REZENDE, J.M. - Eletroforese das proteínas séricas na fase aguda da doença Chagas: comportamento evolutivo observado em 15 casos. Revta goiana Med., 5(1):13-21, 1959.
- SENECA, H.; SANG, J. B.; TROC, O. K. - The electrophoretic pattern of the serum proteins in experimental haemoflagellate infections. Trans.R.Soc.trop.Med.Hyg., 52(3):230-4, 1958.

SILVA, L. H. P. da & NUSSENZWEIG, V. - Sobre uma cêpa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco. Folia clin.biol., 20(3):191-208, 1953.

VON BRANDT, T.; TOBIE, E. J.; KISSLING, R. E.; ADAMS, C. - Physiological and pathological observations on four strains of T.cruzi. J.infect.Dis., 85(1):5-16, 1949.

Para a citação das referências bibliográficas, obedecemos as normas da: PNB - 66, de 1970 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro.

A abreviatura dos títulos de periódicos foi de acordo com: World List of Scientific Periodicals. 4.ed. 1963.