

Este trabalho foi aprovado em 20/08/85 pelo Conselho de Tese de Pós-graduação, sob a presidência de Denise Balduino Ciampi, e aprovado pela Comissão Organizadora da 1ª Jornada de Pós-graduação em 10/08/85

Denise Ciampi

DENISE BALDUINO CIAMPI

**"Correlação entre Anticorpos Líticos e Anticorpos Mediadores
da Reação de Imunofluorescência durante a infecção pelo
Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909) em camundongos isogênicos"**

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para a
obtenção do grau de Mestre.

ORIENTADORES

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS CORSINI

Prof. Dr. MARCOS GARCIA COSTA

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Universidade Estadual de Campinas

São Paulo - Brasil

- 1985 -

BRASIL
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Minha homenagem ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS CORSINI, amigo e orientador, com quem iniciei este trabalho tendo a oportunidade de aprender gradualmente uma conduta de laboratório e adquirir uma curiosidade científica que muito me auxiliaram. Este trabalho não teria sido realizado sem o incentivo constante desse professor, no qual encontrei um exemplo de conduta e honestidade científica e ainda amizade e confiança.

Aos meus pais, pelo amor e apoio,
nem sempre devidamente retribuídos.

Ao meu marido GERSON, com carinho e compreensão,
que não só aceitou mas continuamente estimulou a
minha dedicação à pesquisa.

Agradecimentos

- Ao Prof. Dr. Marcos Garcia Costa, pela compreensão e auxílio demonstrados ao aceitar a co-orientação deste trabalho;
- Aos professores Luis Candido de Souza Dias, Fawzi A. M. Dawood, Luiz Augusto Magalhães e Irineu J. B. Camargo pelas sugestões apresentadas, que muito auxiliaram na redação final da tese;
- À Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann, que esteve presente com sua amizade, apoio e colaboração, contribuindo assim de uma maneira essencial para a conclusão deste trabalho;
- Aos amigos, Profa. Dra. Marcela Haun e Jean-Luc Gesztesi pela valiosa revisão do manus crito;
- Aos colegas de laboratório, Maria Rita L. Zucato, Regina F. S. Braz e Doralice S. L. Balan pelo agradável convívio diário;
- Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial à Célia A. A. Chaves e Dirce Lima Gabriel pelo auxílio prestado no laboratório e a Ismália M. Doné e Ailton Honorato pelos cuidados com os animais do Biotério;
- Aos funcionários do Centro de Oncologia de Campinas pela disponibilidade no uso da bomba de Cobalto para fins de irradiação dos animais;
- A Jeverson Barbieri pela paciência e dedicação com que datilografou a tese.

- CNPq, da qual, a autora, durante o desenvolvimento deste trabalho, foi bolsista.
- CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
- FINEP, Financiadora de Estudos e Projetos.
- UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas.

Abreviaturas

- Fc - "crystallizable fragment" - fragmento cristalizável da imunoglobulina.
- Fab - "antigen-binding fragment" - fragmento de ligação da imunoglobulina ao antígeno.
- BH - Camundongos Biozzi "Bons" respondedores (Seleção III).
- BL - Camundongos Biozzi "Maus" respondedores (Seleção III).
- CoML - Lise imune mediada pelo complemento.
- CHu - Complemento Humano Normal.
- SHuN - Soro Humano Normal.
- PBS - Solução salina de tampão fosfato.
- M.M.E. - Meio mínimo essencial de Eagle.
- rpm - rotações por minuto.
- SBF - Soro bovino fetal.

ÍNDICE

Página

I -	Introdução	01
II -	Materiais e Métodos	12
	2.1 - Animais	12
	2.2 - Cepa de Tripanosoma	12
	2.3 - Infecção dos Camundongos	13
	2.4 - Meios para Lavagens e Suspensão dos Parasitas	13
	2.5 - Parasitemia	13
	2.6 - Soros dos Camundongos	14
	2.7 - Complemento Humano	15
	2.8 - Isolamento de Tripomastigotas Sanguíneos	15
	2.8.1 - Sensibilização dos Tripomastigotas com soro imune "in vitro"	16
	2.8.2 - Lise dos Tripomastigotas pelo CHu "in vitro"	16
	2.8.3 - Infectividade dos Tripomastigotas	16
	2.9 - Reações de Imunofluorescência	17
	2.9.1 - Tampão e Reagentes para os Testes	17
	2.9.2 - Preparo das Lâminas	18
	2.9.3 - Titulação dos soros	18
III -	Resultados	
	3.1 - Titulação dos soros durante a Resposta Humoral Primária	20
	3.1.1 - Análise dos Anticorpos pertencentes à classe IgM	20
	3.1.2 - Análise dos Anticorpos pertencentes à classe IgG	21
	3.2 - Titulação dos Soros durante a Resposta Humoral Secundária	21
	3.2.1 - Análise dos Anticorpos pertencentes às classes IgM e IgG para os animais reinfectados no 42º dia	22
	3.2.2 - Análise dos Anticorpos pertencentes às classes IgM e IgG para os animais reinfectados no 97º dia	22
	3.3.1 - Atividade Tripanolítica nos Soros de Camundongos durante a resposta primária	23
	3.3.2 - Atividade Tripanolítica nos Soros de Camundongos durante a resposta secundária	24
	3.4 - Infectividade dos Tripomastigotas após a CoML	25

	3.4.1 - Mortalidade dos Animais Inoculados	27
IV -	Discussão	37
V -	Resumo e Conclusões	50
VI -	Bibliografia	52

"Não devemos discutir no intuito de glorificar nomes e teorias, mas só de aprender"

Galileu

I - INTRODUÇÃO

A importância dos protozoários da família Trypanosomatídea, incluindo os tripanosomas africanos, tripanosomas americanos e Leishmania spp tem estimulado extensivos estudos, visto que são responsáveis por uma variedade de doenças que ocorrem principalmente em países em desenvolvimento (Acha et al, 1980).

Assim, considerando a ampla distribuição da Doença de Chagas pelas Américas do Sul e Central, e que essa tripanosomíase corresponde a uma entidade mórbida que ocasiona graves problemas de saúde, pode se considerar o Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, agente etiológico dessa doença, como um importante tripanosomatídeo do Novo Mundo.

Dados recentes indicam que 35 milhões de pessoas estão infectadas pelo T. cruzi nas Américas (Brumpt, 1980) das quais 10 - 12 milhões somente no Brasil (Colli, 1979; Brenner, 1981; Dias & Dias, 1982).

É importante ressaltar, que a tripanosomíase americana é uma endemia predominantemente rural, embora a migração de pacientes das áreas rurais, a transmissão pela transfusão de sangue bem como os casos congênitos, tenham contribuído para que o quadro epidemiológico sofra profundas modificações. Esse problema tem sido analisado por diversos autores, com ênfase para o movimento migratório campo-cidade (Goldbaum, 1979; Brumpt, 1980; Brenner, 1980).

Os indivíduos habitualmente adquirem a doença através da participação de triatomíneos, insetos pertencentes à Família Reduviidae, Sub-família Triatominae, que abrangem um grande número de gêneros e espécies, sendo que no Brasil, já foram assinalados 8 gêneros e 42 espécies (Castro-Filho & Silveira, 1979). Algumas espécies mais representativas dessa família na transmissão são Triatoma infestans, Panstrongylus megistus, Rhodnius prolixus, e são estritamente hematófagos e se infectam pela ingestão de tripomastigotas presentes em hospedeiros vertebrados infectados.

O T. cruzi é capaz de parasitar o homem e uma grande variedade de mamíferos

silvestres, sendo assim mantido nas regiões endêmicas. Pertence à Secção Estercorária (Hoare, 1972) isto é, aquele grupo de tripanosomas cuja transmissão se faz pelas fezes do transmissor. O ciclo de vida e os estágios de desenvolvimento desse protozoário tem sido estudados em mamíferos infectados experimentalmente, bem como em culturas de tecidos.

Este parasita permanece no tubo intestinal do inseto onde se diferenciando para a forma epimastigota se prolifera, e é reponsável por manter a infecção, sendo que na última porção do tubo digestivo, os epimastigotas passam para a forma de tripomastigotas metacíclicos. Quando esses insetos infectados se alimentam novamente, eliminam com as fezes essas formas metacíclicas, as quais podem eventualmente infectar o hospedeiro vertebrado, através de uma lesão na pele ou ainda através das mucosas. Essas formas podem invadir as células do Sistema Retículo Endotelial, os tecidos nervosos, ou permanecer no sangue periférico, disseminando assim a infecção (Goble, 1970).

Embora as manifestações clínicas dessa doença sejam extensivamente estudadas, a patogenia é ainda bastante controvertida, assim como os fatores que modulam a relação parasita-hospedeiro que são parcialmente entendidos.

Se considerarmos que um parasitismo eficaz requer a sobrevivência mútua do hospedeiro e do parasita, pode se dizer que a longevidade do hospedeiro é conseguida pela existência de mecanismos de resistência natural e adquirida. A sobrevivência do parasita, frequentemente persistindo em pequeno número e por longos períodos de tempo, por outro lado, depende de sua capacidade de evasão aos mecanismos de resistência do hospedeiro, os quais são frequentemente letais.

Assim sendo, diferentes mecanismos de "escape" são propostos para explicar a permanência do parasita por longos períodos de tempo no hospedeiro. Krettli et al (1980) discutem a possibilidade do mecanismo de "fabulação" representar uma forma de mecanismo de escape na infecção pelo I. cruzi, o qual permitiria a circulação de tripomastigotas

mastigotas no hospedeiro. Nesse mecanismo, fragmentos Fab remanescentes da clivagem de imunoglobulinas ligadas à membrana do parasita, protegeriam os parasitas circulantes da lise pelo complemento e mascarariam os sítios antigênicos.

Miranda-Santos & Campos Neto (1981) sugerem que a presença de receptores Fc ligados à membrana do parasita, funcionariam como um mecanismo de "escape". Esses autores observaram também que somente os protozoários patogênicos da família Trypanosomatidae examinados apresentavam esse fenômeno em maior ou menor grau, dependendo da forma estudada.

Anteriormente, Santos-Buch & Teixeira (1974) estudaram a possibilidade de frações de I. cruzi e de fibras cardíacas possuírem determinantes antigênicos comuns, que poderiam induzir linfócitos sensibilizados pelo I. cruzi a atacar e danificar células cardíacas.

O curso da infecção pelo I. cruzi varia com a linhagem do animal, idade, via de inoculação e sexo do hospedeiro (Goble, 1951). Assim, diferentes graus de resistência à infecção por este parasita foram obtidos com a utilização de diversas linhagens de camundongos (Trischman et al, 1978; Corsini et al, 1980). Anteriormente, Kolodny (1939) já havia observado que as infecções mais severas são vistas usualmente em hospedeiros mais jovens. Além disso já foi demonstrada uma diferença no curso da infecção entre camundongos machos e fêmeas (Hauschka, 1947). Nas infecções causadas pelo Trypanosoma congolense, Pinder (1984) verificou que camundongos machos apresentaram uma maior parasitemia quando comparados às fêmeas da mesma linhagem isogênica.

As variações no curso da infecção pelo I. cruzi, igualmente dependem do parasita, já que este apresenta diversos tipos de cepas que diferem entre si, com relação à virulência (Goble, 1951; Brener, 1965) como por exemplo, cepas Y e C1 diferem neste aspecto para camundongos Swiss 55 (Brener et al, 1979) e híbridos (CBA/J x C₅₇^{B1/10})F₁ (Ciampi et al, 1981).

Essas variações entre as diferentes cepas de T. cruzi foram também observadas por Alcântara e Brener (1978) que investigaram a interação das formas sanguíneas de T. cruzi pertencentes às cepas Y e Cl com macrófagos peritoniais normais. Esses autores observaram que os parasitas pertencentes à cepa Y mostraram ser 20 a 30 vezes mais infectivos, quando comparados aos da cepa Cl. Esses autores sugerem que essa diferença pode estar relacionada a uma característica do próprio parasita, pois esses resultados não se mostraram alterados quando aumentou-se a razão parasitas/células, como também não se alteraram com o aumento no tempo de exposição.

Já que durante o curso dessa infecção, os parasitas são expostos diretamente à elementos efetores da resposta imune, tais como anticorpos e células como macrófagos, e que as formas sanguíneas de T. cruzi persistem e se proliferam no interior de fagócitos mononucleares (Pizzi et al, 1954) contribuindo assim para a proliferação do parasita, a interação entre essas células e os parasitas é de especial interesse.

Sendo assim, vários autores já estudaram a participação dos macrófagos neste tipo de infecção. Andrade et al (1976) verificaram que os bloqueio do sistema fagocítico mononuclear com carbono coloidal em camundongos infectados com T. cruzi resultou em um aumento da parasitemia e da mortalidade nesses animais. Resultados similares foram obtidos com a utilização de sílica (Kierszenbaum et al, 1974).

Willians et al (1976) estudaram o papel dos macrófagos ativados na infecção pelo T. cruzi. Assim, camundongos cronicamente infectados com Toxoplasma gondii, que posteriormente receberam um inóculo de T. cruzi tiveram um decréscimo nas taxas de mortalidade e um significativo aumento na sobrevivência desses animais, o mesmo ocorrendo em animais que receberam anteriormente ao T. cruzi, um inóculo de Besnoitia jellisoni.

Anteriormente, Ortiz-Ortiz et al (1975) verificaram que camundongos inoculados com B.C.G. tiveram uma redução na parasitemia e um aumento na sobrevivência, após a inoculação com T. cruzi. Outros autores porém, foram incapazes de demonstrar uma proteção

por esse método (Hoff, 1975; Kuhn et al 1975).

Mais recentemente, Almeida et al (1982) observaram que após 15 minutos de interação com os macrófagos, os parasitas são interiorizados por um processo de fagocitose e que uma densa substância amorfa interposta entre o parasita e a superfície celular foi regularmente observada. Esses autores discutem a possibilidade dessa substância ser liberada extracelularmente pelos macrófagos, em resposta à uma estimulação provocada pelo parasita.

A participação celular tem sido bastante estudada nesta tripanosomíase.

Kierszenbaum & Pienkowski (1979) verificaram que camundongos "Null" eram mais susceptíveis à infecção quando comparados aos seus controles normais, e que ainda, o transplante de timo de animais isogênicos, conferia aos camundongos "Null" um certo nível de resistência. Esses resultados foram confirmados mais recentemente por Wrightsman et al (1982) que utilizando camundongos "Null" das raças C₅₇Bl/6J, Balb/C, e (Balb/C x C₅₇Bl/6)F₁ inoculados com 10³ tripomastigotas da cepa Peru, apresentaram parasitemias maiores que 10⁸ parasitas/ml, sugerindo então que as células T estão envolvidas no controle do nível de parasitemia em todas as linhagens de animais testadas.

Anteriormente, Corsini & Stelini Jr. (1981) observaram que camundongos (CBA/J x C₅₇Bl/10)F₁ timectomizados, irradiados e reconstituídos com células de fígado fetal (Camundongos B) foram extremamente mais sensíveis à infecção pelo T. cruzi. Com tudo, animais reconstituídos com células T imunes, não só sobreviveram à infecção como também desenvolveram uma baixa parasitemia.

Outros autores já haviam descrito a participação celular, mais precisamente de linfócitos do baço e de linfonodos de animais imunes, que quando transferidos para recipientes singênicos, conferia à esses, uma redução na parasitemia e nas taxas de mortalidade. Na tripanosomíase africana experimental foi demonstrada a participação celular, mais especificamente de linfócitos T, exibindo uma atividade supressora (Jaywardena

et al, 1977; Corsini et al, 1977).

Sendo o T. cruzi imunogênico, além da resposta imune mediada por células, a presença de anticorpos circulantes em hospedeiros infectados por este parasita foi demonstrada por Guerreiro & Machado (1913), que adaptaram a reação de Bordet-Gengou para a detecção de anticorpos fixadores de complemento, para o diagnóstico da Doença de Chagas.

Anticorpos contra o T. cruzi tem sido observados em animais infectados com diferentes cepas deste parasita (Peralta, 1980) bem como em indivíduos portadores dessa doença (Lelchuk et al, 1970; Magnani et al, 1973), e também em indivíduos sem manifestações clínicas (Fife, 1976). Os anticorpos pertencentes à classe IgM são os primeiros a serem detectados, e são seguidos por anticorpos do tipo IgG, os quais persistem durante a doença (Vattuone et al, 1973; Gonzales-Cappa, 1973; Hanson, 1976).

A participação desses anticorpos na resistência contra o parasita foi observada por Culbertson & Kolodny (1938) onde uma proteção foi conferida à ratos que receberam subcutaneamente soro correspondente à 6ª semana de infecção, antes de receberem o inóculo de parasitas. Essa proteção foi avaliada por uma diminuição na parasitemia e nas taxas de mortalidade desses animais.

Do mesmo modo, Kagan & Norman (1961, 1962) conseguiram proteger camundongos contra uma cepa altamente virulenta de T. cruzi administrando soro imune obtido à partir de animais que sobreviveram à uma infecção aguda provocada por uma cepa avirulenta.

Utilizando camundongos Biozzi "Bons" e "Maus" respondedores, Kierszenbaum & Howard (1976) conseguiram a proteção dos animais B1 pela transferência passiva, a partir do 2º dia de infecção de soros imunes obtidos de camundongos CD₁ que foram imunizados e que sobreviveram à um desafio com uma dose letal da cepa V de T. cruzi.

Hanson (1976) discute a necessidade de transferir soros com altos títulos de anticorpos. Assim sendo, demonstra que soros obtidos na 6ª semana de infecção mostraram

-se mais eficazes em conferir proteção quando comparados com os soros obtidos na 12ª semana de infecção. Alguns autores (Kagan & Norman, 1961; Krettli & Brenner, 1976; McHardy, 1977) conseguiram proteger camundongos com a utilização de soros de animais convalescentes.

Considerando a importância do papel desempenhado pelos anticorpos na resposta imune, Takehara et al (1980) utilizando frações de imunoglobulinas, observaram que são anticorpos protetores principalmente os da classe IgG, mais especificamente aqueles pertencentes às sub-classes IgG_{2a} e IgG_{2b}.

Corsini et al (1982) também demonstraram a importância da resposta imune humoral de anticorpos IgG se desenvolvida pelo hospedeiro no período pré-patente da infecção, onde camundongos Biozzi "Bons" respondedores e camundongos (CBA/J x C₅₇B1/10)F₁, respondem mais rapidamente à infecção, enquanto que camundongos Biozzi "Maus" respondedores o fazem mais tardiamente.

Na infecção humana causada por essa tripanosomíase, os resultados com relação às alterações nos níveis de imunoglobulinas são ainda controversos. Enquanto Lelchuk et al (1970) descrevem um discreto aumento nos níveis de IgG durante a fase crônica da infecção, Freitas et al (1976) e Corsini et al (1981) encontraram esses valores em níveis normais.

Na tripanosomíase africana, vários autores já estudaram a participação de anticorpos em conferir proteção à animais infectados. Desta forma, Seed (1977) verificou que quando anticorpos pertencentes às classes IgM e IgG foram testados com relação à esse aspecto, as moléculas de IgG mostraram-se mais eficazes quando comparadas às de IgM.

Também Murrel (1981), verificou que soros contra Strongyloides ratti transferidos de ratos hiperimunes forneciam um significativo grau de proteção, e que no fracionamento desse soro o componente responsável por essa proteção foi predominantemente a

fração IgG₁.

A ação de soros imunes em animais tem sido extensivamente estudada por diversos autores (Kagan & Norman, 1962; McHardy, 1977; Kierszenbaum, 1980). Por outro lado, efeitos do soro imune "in vitro" sobre as diferentes formas de T. cruzi foram também estudadas, sendo que estes experimentos podem ser feitos utilizando-se epimastigotas de cultura, tripomastigotas de cultura e ainda tripomastigotas circulantes isolados do hospedeiro infectado.

Assim, Krettli & Brenar: (1976) verificaram que anticorpos presentes no hospedeiro durante a fase crônica da doença, se ligam à formas vivas de tripomastigotas, os quais podem aglutinar sendo este fenômeno dependente da cepa utilizada. A adição de uma fonte ativa de complemento neste tipo de reação leva à uma intensa lise dos parasitas (Kierszenbaum, 1976).

Budzko et al (1975) observaram que as formas tripomastigotas eram lisadas na presença de: soro de pacientes na fase crônica, soro de camundongos imunizados, ou ainda, soluções contendo gamaglobulinas de camundongos adicionadas de complemento ativo. Esses autores verificaram ainda que durante a lise imune das formas sanguíneas de T. cruzi, o complemento foi ativado por ambas as vias, alternativa e clássica, para os casos humanos, enquanto que essa ativação foi feita pela via alternativa para os camundongos.

As formas epimastigotas de T. cruzi são lisadas por soro fresco de muitas espécies (Rubio, 1956), sendo que a ativação do sistema complemento para as formas epimastigotas foi efetuada pela via alternativa (Nogueira et al, 1977).

Krettli et al (1979) demonstraram que formas sanguíneas de T. cruzi pertencentes à cepas Y e Berenice são lisadas por soro humano normal, fenômeno que não ocorre para parasitas pertencentes à cepa Cl, a não ser que esses parasitas fossem previamente incubados com soros de animais obtidos durante a fase crônica da infecção. Kierszenbaum

et al (1976) verificaram que em aves, os sistema de lise das formas sanguíneas é media do pela via alternativa e sugerem ainda que essa lise ocorra na ausência de anticorpos, já que essa atividade lítica foi encontrada em soros obtidos de aves agamaglobulinêmicas em consequência de bursectomia ou de tratamento com ciclofosfamida.

Krettli (1978) utilizando parasitas pertencentes à cepa Y isolados de camundongos irradiados, os quais não são lisáveis pelo complemento humano, observou uma intensa lise desses parasitas após a incubação com o complemento de galinha, fenômeno similar ocorrendo para tripomastigotas da cepa Cl os quais são resistentes à lise pelo complemento humano. Esse autor mostrou ainda que a lise dos tripomastigotas sanguíneos pelo complemento de aves, diferentemente da lise pelo complemento humano, é independente da presença de anticorpos na membrana do parasita.

Krettli, Weis-Carrington e Nussenzweig (1979) igualmente observaram que a via alternativa do complemento é a mais importante na lise imune do T. cruzi, já que essa lise foi abolida pela depleção do fator B ou da Properdina em soros normais utilizados como fonte ativa de complemento, sendo porém essa atividade restabelecida por quantidades desses componentes adicionadas ao soro.

Esse mecanismo de lise imune parece não ser tão efetivo para a morte do parasita durante a fase aguda da infecção pelo T. cruzi. Tal fato foi verificado experimentalmente (Krettli et al, 1979; Dalmasso & Jarvinem, 1980) quando comparou-se animais normais e deficientes em C_4 e C_5 , sendo que os dois grupos de animais apresentaram na fase aguda da infecção, iguais níveis de parasitemia e de mortalidade, demonstrando dessa forma que esse mecanismo de lise imune parece pouco efetivo para a lise do parasita nesta fase.

Cunningham, Craig & Kuhn (1978) anteriormente observaram que os baixos níveis de complemento encontrados durante a fase aguda da infecção não poderiam favorecer a lise dos parasitas. Por outro lado, durante a fase crônica, a lise imune parece desem-

penhar um papel importante em manter baixas as parasitemias, já que os níveis de complemento apresentam-se com seus valores normais nessa fase (Riera et al, 1980).

As formas tripomastigotas sanguíneas da tripanosomíase americana são igualmente susceptíveis à lise imune mediada pelo complemento (Budzko et al, 1975; Kierszenbaum, 1976; Krettli, 1978), e pela citotoxicidade celular dependente de anticorpo (Abrahamsortin & Dias da Silva, 1977; Sanderson et al, 1977; Okabe et al, 1980; Kierszenbaum & Hayes, 1980).

Considerando esses fatos pode se verificar a clara participação da resposta imune mediada por células e da resposta imune humoral na infecção pelo I. cruzi. A participação da resposta imune humoral através da detecção de anticorpos por imunofluorescência em testes sorológicos e também o xenodiagnóstico contribuem para o diagnóstico da Doença de Chagas, principalmente durante a fase crônica da infecção. Por outro lado, Krettli & Brener (1982) verificaram que pacientes submetidos à tratamentos com drogas ativas apresentavam xenodiagnóstico negativo, mas continuavam com os testes sorológicos positivos. Esses autores discutem a possibilidade de haver uma dissociação entre os anticorpos detectados pela técnica de imunofluorescência, e aqueles detectados através da lise imune mediada pelo complemento. Assim verificaram que os anticorpos líticos não eram produzidos contra formas de culturas mortas, ou ainda, por tripomastigotas sanguíneas fixados pelo glutaraldeído, e sugerem que esses anticorpos sejam direcionados contra os parasitas vivos circulantes no hospedeiro, já que os pacientes tratados com as drogas não mais apresentaram anticorpos líticos em seus soros.

Assim, estudamos neste trabalho, alguns aspectos da resposta imune humoral primária e secundária na infecção causada pelo I. cruzi no hospedeiro vertebrado. Utilizando-se camundongos Biozzi "Bons" e "Maus" respondedores e ainda os híbridos (CBA/J x C₅₇B1/1D)F₁ avaliamos os níveis de anticorpos IgM e IgG presentes nos soros coletados desses animais.

Estudamos também a ação desses soros sobre as formas sanguíneas de T. cruzi, através de reações "in vitro" pela técnica de lise imune mediada pelo complemento humano, e tentamos obter uma correlação com os resultados obtidos através das duas técnicas utilizadas, a fim de se observar uma possível dissociação entre os anticorpos líticos e os detectados pela imunofluorescência durante a fase aguda da infecção nos camundongos Biozzi BH e BL e nos híbridos F_1 . Para os estudos efetuados durante a fase crônica utilizou-se somente os híbridos F_1 , já que esses animais se mostraram anteriormente resistentes ao inóculo com 10^2 parasitas e posterior reinfecção com 10^5 formas tripomastigotas de T. cruzi (Corsini et al, 1980).

II - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Animais

Camundongos albinos Swiss 55 foram letalmente irradiados, recebendo uma dose de 800 rads de uma Unidade de Telecobaltoterapia modelo "Eldorado 78" (fabricante AECL - Canadá), durante 12 minutos, à uma distância de 80 cm, sempre 12 à 24 horas antes da inoculação dos parasitas, recebdo ração ad libitum e água acidificada 0,001 N.

Foram utilizados ainda camundongos isôgênicos (CBA/J x C₅₇Bl/10)F₁, C₃He/J e Biozzi "Bons" (BH) e "Maus" (BL) respondedores (Seleção III).

A colônia inicial de camundongos Biozzi, nos foi cedida pelo Dr. Oswaldo Sant'Anna (Instituto Biológico - São Paulo) e foram selecionados geneticamente a partir de camundongos Swiss 55, através da formação máxima e mínima de anticorpos, para o antígeno flagelar de Salmonella typhimurium e Salmonella oranienburg (Siqueira et al, 1976).

Os animais da raça C₃He/J foram cedidos pela Dra. Thereza L. Kipnis, da Universidade de São Paulo.

Todos os animais de ambos os sexos foram utilizados com 8-10 semanas de idade, criados e mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas.

2.2 - Cepa de Tripanosoma

Foi utilizada a cepa V (Pereira da Silva e Nussenzweig, 1953) do Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, cedida pelo Dr. Zigman Brener (Belo Horizonte), mantida em camundongos Swiss 55, por passagens sucessivas no 7º dia da infecção. A inoculação era feita por via intra-peritoneal em 5 animais com 12×10^4 formas de tripomastigotas (Brener, 1962).

2.3 - Infeção e Reinfecção dos Camundongos

A infecção dos animais foi feita utilizando-se sangue de camundongos Swiss 55 no dia do pico parasitêmico, coletado pelo plexo braquial em citrato de sódio 3,8%. O sangue foi diluído 40 vezes em Meio Mínimo Essencial de Eagle pH 7,2 sem Soro Bovino Fetal, e os parasitas contados em hemocitômetro de Neubauer.

Grupos de 10 camundongos irradiados, receberam um inóculo de 10^5 parasitas/ml, enquanto que camundongos (CBA/J x C₅₇BL/10)F₁ receberam 100 parasitas, sendo as reinfecções feitas com inóculo de 100.000 parasitas.

2.4 - Meios para a Lavagem e Suspensão dos Parasitas

Foi utilizado o Meio Mínimo Essencial de Eagle (MME) pH 7,2, sendo que para os experimentos de lise imune adicionou-se Soro Bovino Fetal (SBF) em concentração final de 1%.

Para as reações de imunofluorescência utilizou-se Salina Tamponada com Fosfato (PBS) 0,1 M.

2.5 - Parasitemia

A parasitemia foi determinada diariamente, de acordo com o método descrito por Brener (1962). O sangue foi coletado por punção da cauda dos animais, tendo-se o cuidado de desprezar a primeira gota, colhido em uma pipeta de hemoglobina, previamente calibrada para 5 μ l, lavada com citrato de sódio 3,8% e colocado em lâmina para microscópio com lamínula 22 x 22 mm.

A contagem foi feita em microscópio Zeiss binocular, com objetiva de 40x e

ocular de 12,5x, contando-se 100 campos, sendo os resultados expressos em média geométrica considerando-se o desvio padrão.

Grupos de 10 camundongos de cada linhagem foram marcados nas patas, a fim de possibilitar o acompanhamento diário da parasitemia.

2.6 - Soros de Camundongos

Os soros dos camundongos (CBA/J x C₅₇B1/10)F₁ foram coletados através da punção da cauda. Desprezando-se sempre a primeira gota, deixou-se sangrar cada camundongo separadamente, e no final, foram feitos "pools" relativos à cada dia de infecção. Três grupos de 10 camundongos cada foram utilizados, segundo o esquema que segue:

2.6.1 - Um grupo infectado com 10² parasitas, e soros coletados entre o 5º e 95º dias de infecção, a fim de se estudar a resposta primária.

2.6.2 - Um grupo infectado com 10² parasitas re infectados no 42º dia após a infecção, com 10⁵ parasitas, e os soros coletados entre o 5º e o 90º dias de infecção.

2.6.3 - Um grupo também infectado com 10² parasitas, re infectados no 97º dia após a infecção, com 10⁵ parasitas, e os soros coletados entre o 5º e 120º dias de infecção.

Esses 2 últimos grupos foram programados para se estudar a resposta secundária. Os soros de 20 camundongos Biozzi "Bons" e "Maus" respondedores foram coletados entre o 5º e 20º dias de infecção.

Todos os soros foram inativados à 56°C por 30 minutos e estocados à -70°C até o momento de serem utilizados.

2.7 - Complemento Humano

Com fonte de complemento humano, utilizou-se soro fresco humano obtido de indivíduos com imunofloreescência negativa para I. cruzi. O sangue coletado foi deixado à temperatura ambiente para retração do coágulo, e centrifugado por 20 minutos à 1800 rpm à 4°C e separados em volumes de 1 ml, guardados a seguir à -70°C. O complemento foi absorvido com 50 µl de uma suspensão de tripomastigotas, antes de ser utilizado para lise.

Como soro humano normal, utilizou-se as mesmas amostras, as quais foram inativadas à 56°C por 30 minutos antes de serem utilizadas.

2.8 - Isolamento de Tripomastigotas Sanguíneos

O isolamento, a sensibilização e a lise dos tripomastigotas sanguíneos foram feitos de acordo com o método descrito por Krettl et al (1979). Para o isolamento, o sangue foi coletado pelo plexo braquial de camundongos Swiss 55, letalmente irradiados e infectados como descrito anteriormente, em um frasco contendo pérolas de vidro. Após a desfibrinação, o sangue foi centrifugado à 1500 rpm por 10 minutos à 4°C. O soro contendo os parasitas foi coletado e o sedimento ressuspense em 3 ml de MME contendo 1% de SBF, e centrifugado novamente à 1500 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Os parasitas foram coletados nos dois sobrenadantes e em seguida foram concentrados por centrifugação à 2.000 rpm por 15 minutos, a uma temperatura de 4°C e lavados três vezes em MME contendo 1% de SBF.

Os tripomastigotas foram contados em hemocitômetro de Neubauer, e ajustados para um concentração de 4×10^6 parasitas/ml e diluídos em MME.

2.8.1 - Sensibilização dos Tripomastigotas com Soro Imune "in vitro"

Os tripomastigotas que foram obtidos como descritos no ítem anterior, e ajustados para uma concentração de 4×10^6 parasitas/ml, foram incubados com 200 μ l de soro imune de camundongos nos diferentes dias após a infecção. Após a incubação por 1 hora em banho-maria à 37°C, foram feitas 2 lavagens para a remoção do excesso de antisoro.

2.8.2 - Lise de Tripomastigotas pelo Complemento Humano Normal "in vitro"

Os parasitas já sensibilizados pelos soros foram incubados com 50 μ l de complemento humano (CHU) previamente absorvido com os parasitas, sendo que para os controles foram utilizadas as mesmas preparações, porém incubadas com o soro humano normal (SHUn).

Após a incubação em banho-maria à 37°C por 1 hora, cada preparação foi contada em hemocitômetro de Neubauer. Todos os testes foram feitos em duplicata, sendo a porcentagem de lise determinada do seguinte modo:

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

Todos os soros foram titulados, partindo-se de uma diluição de 1:16, até uma diluição final de 1:2048.

2.8.3 - Infectividade dos Tripomastigotas Pré-Sensibilizados pelo Soro Imune

Com o objetivo de se verificar a infectividade dos parasitas pré-sensibilizados com o soro imune e na presença de complemento humano, inoculou-se 10 animais

(CBA/J x C₅₇Bl/10)F₁, C₃He/J e CBA/J com 0,1 ml da preparação tripomastigotas - soro imune - complemento, sendo a parasitemia acompanhada diariamente. Como o grupo controle, utilizou-se igualmente 10 híbridos F₁ inoculados com 0,1 ml de tripomastigotas - soro imune - soro humano normal inativado.

O soro imune utilizado neste experimento foi um soro pertencente ao 30^o dia de infecção e a parasitemia foi acompanhada diariamente como descrito no item 2.5.

2.9 - Reações de Imunofluorescência

Para as reações de imunofluorescência, utilizou-se a técnica descrita por Camargo (1966).

2.9.1 - Tampão e Reagentes para os Testes.

Para as lavagens dos epimastigotas, utilizou-se salina 0,15 M, e para as lavagens das lâminas e diluições dos soros utilizou-se salina tamponada (PBS) 0,1 M.

As diluições dos conjugados foram feitas em tampão contendo 9,8 ml de PBS e 0,2 ml de Tween 80, com 0,1 ml de Azul de Evans diluído 1:500.

Utilizou-se um conjugado IgG de coelho anti-IgG de camundongo marcado com fluoresceína (Cappel Laboratories - Cochranville - USA) com um título de 1:200. Utilizou-se também um soro conjugado IgM de coelho anti-IgM de camundongo (Bionetics Laboratories - USA) com um título de 1:40. O título dos conjugados foi determinado por titulações prévias em bloco, com soros de camundongo F₁ coletado no 30^o dia de infecção.

Para montagem das lâminas, utilizou-se glicerina tamponada, sendo 9 partes de glicerina e 1 parte de PBS. A limpeza dessas lâminas foi feita com detergente, lavadas várias vezes em água destilada e então guardadas em uma solução contendo partes iguais

de etanol-acetona.

2.9.2 - Preparo das Lâminas

As formas epimastigotas de T. cruzi foram obtidas no 7º dia de cultura em meio Lit (Fernandes & Castellani, 1968) e lavadas 3 vezes em salina 0,15 M por centrifugação, à 1500 rpm por 15 minutos. Uma pequena parte do sedimento foi coletada em PBS e filtrada em algodão, fazendo-se então uma diluição de 1:10 em salina formulada à 1%, para contagem em hemocitômetro, para ajustar-se uma concentração final de 3×10^6 epimastigotas/mL.

Dessa suspensão, 10 µl foram colocados nos espaços das lâminas para imunofluorescência, sendo o excesso retirado com uma seringa hipodérmica. Deixou-se secar as lâminas à temperatura ambiente, e novamente contou-se os epimastigotas, obtendo-se desse modo, uma média de 20 epimastigotas por campo.

2.9.3 - Titulação dos Soros

Os soros a serem titulados foram diluídos em tampão PBS e 10 µl foram colocados nos espaços das lâminas, as quais foram incubadas em câmara úmida à 37°C por 30 minutos. Após esse período, foram lavadas 2 vezes em água destilada e 1 vez em PBS, por um tempo de 5 minutos para cada lavagem. A secagem foi feita com auxílio de um secador de ar quente.

Essas lâminas foram incubadas com 10 µl dos conjugados e novamente incubadas em câmara úmida por 30 minutos à 37°C e então lavadas como descrito acima. Após estarem secas, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada e observadas em microscópio para fluorescência Zeiss, modelo Standard RA equipado com lâmpada HBO W/4 e filtro exci-

tador PG 12, com objetiva de 40x e ocular de 12,5x.

Em cada teste utilizou-se como controle positivo, soro de camundongos F_1 no 30º dia de infecção por T. cruzi com um título de 1:32, e soro de camundongos F_1 normais foram utilizados como controle negativo.

Atribuiu-se resultado positivo quando os parasitas mostravam evidente coloração fluorescente, geralmente mais intensa nas paredes celulares e nos flagelos. Referiu-se como negativo os testes com parasitas não corados pelo fluorocromo, ou apresentando apenas coloração esverdeada, pouco intensa e sem brilho, difusa pelo citoplasma.

Eventuais resultados duvidosos, como ausência de resultado por material insuficiente ou inadequado foram repetidos, e persistindo a dúvida, para fins de computação de dados, foram considerados negativos.

O título dos soros foi considerado como o inverso da maior diluição capaz de produzir reação positiva, expresso em \log_{10} .

3.1 - Titulação dos Soros de Camundongos (CBA/J x C₅₇Bl/10)F₁ e de Biozzi "Bons" e "Maus" respondedores durante a Resposta Humoral Primária.

A resposta humoral primária de camundongos (CBA/J x C₅₇Bl/10)F₁ infectados com 10² tripomastigotas, foi medida através da reação de imnufluorescência até o 95º dia após a infecção. Camundongos Biozzi "Bons" e "Maus" respondedores, tiveram a sua resposta primária analisada até o 20º dia após a infecção, já que depois desse período, a taxa de mortalidade desses animais se mostrou elevada.

3.1.1 - Análise dos Anticorpos pertencentes à Classe IgM.

Para os animais das linhagens F₁, BH e BL pode-se observar que os anticorpos da classe IgM já são detectáveis no 5º dia de infecção, sendo que os camundongos BH apresentam um título mais elevado (log 2,10) quando comparados aos F₁ e BL, log 1,80 e log 0,30, respectivamente (Tabela I).

Os camundongos F₁ mostraram títulos constantes até o 35º dia para atingirem um valor máximo na produção dos anticorpos no 40º dia (log 2,10). Esses valores permaneceram em torno de log 2,10 até o 60º dia, para então começar a decrescer a partir desse período (Figura 1 - Tabela I).

Os camundongos BH, que mostraram um título bastante elevado já no 5º dia (log 2,10) tiveram uma diminuição gradual nos títulos desses anticorpos ao redor da 2ª semana após a infecção (Figura 2B).

Os camundongos BL mostraram um título consideravelmente baixo no início da infecção (log 0,30), com um discreto aumento ao redor da 3ª semana (log 1,50 - Figura 2A).

3.1.2 - Análise dos Anticorpos pertencentes à Classe IgG.

A resposta humoral primária para os anticorpos pertencentes à classe IgG para os camundongos F_1 (Figura 1) foi relativamente mais baixa na 1ª semana após a infecção quando comparada aos camundongos BH (Figura 2B). Enquanto que os camundongos F_1 apresentaram uma resposta negativa, ou não detectável no 5º dia após a infecção, os camundongos BH já apresentaram um título de log 1,20 (Tabela II).

Observou-se um aumento gradativo nos títulos para ambas as linhagens, F_1 e BH, sendo o título máximo alcançado na 5ª semana para os F_1 e 3ª semana para os BH. Os camundongos F_1 permaneceram com títulos consideravelmente altos, em torno de log 2,70, mesmo após 13 semanas de infecção.

Com relação aos camundongos BL (Tabela II - Figura 2A), igualmente aos F_1 , não apresentaram uma resposta detectável no 5º dia, sendo que após o 10º dia esses títulos aumentaram, porém discretamente, quando comparados aos camundongos das linhagens F_1 e BH.

3.2 - Titulação dos Soros durante a Resposta Humoral Secundária.

Com a finalidade de se estudar a resposta humoral secundária, escolheu-se animais (CBA/J x $C_{57}BL/10$) F_1 , já que esses se mostraram anteriormente bastantes resistentes aos inóculos com 10^2 parasitas, fornecendo um padrão de infecção regular e reprodutivo em vários experimentos. O curso de infecção nesses animais segue com uma fase aguda, apresentando um pico parasitêmico geralmente ao redor do 11º dia, com um controle da parasitemia após esse período, sendo possível detectar-se parasitas no sangue circulante até o 30º dia. Após esse período não se observam parasitas pelos métodos convencionais, passando então para uma fase crônica, com uma taxa de mortalidade bastante

baixa (Corsini et al, 1980).

A reinfecção foi feita em dois grupos de animais, com doses letais de 10^5 parasitas em diferentes períodos, após uma infecção prévia com 100 formas.

3.2.1 - Análise dos Anticorpos pertencentes às Classes IgM e IgG para os animais reinfectedados no 42º dia.

Não observamos alterações nos níveis de produção de anticorpos no soro dos animais F_1 que foram reinfectedados no 42º dia. No 40º dia, durante a resposta primária, esses títulos estavam em log 2,10 (Tabela I), permanecendo assim até o 44º dia logo após a reinfecção. Esses títulos continuaram em log 2,10 até o 90º dia (Tabela III - Figura 3).

A resposta secundária ficou melhor caracterizada quando estudamos os anticorpos pertencentes à classe IgG. Assim sendo, esses animais que vinham apresentando um título de log 2,70 até o 40º dia (Tabela II), após a reinfecção esses títulos aumentaram para log 3,30 (Tabela III) permanecendo com esses valores até a 6ª semana após a reinfecção.

3.2.2 - Análise dos Anticorpos pertencentes às Classes IgM e IgG para os animais reinfectedados no 97º dia.

Para esse grupo de animais, também obteve-se uma resposta secundária típica, pois os anticorpos pertencentes à classe IgM, que no 95º dia durante a resposta primária mostraram um título ao redor de log 1,50 (Tabela I), não sofreram um aumento significativo após a reinfecção, já que permaneceram em log 1,50 (Tabela IV - Figura 4).

Já os anticorpos pertencentes à classe IgG, esse aumento foi considerável, pois no 95º dia os títulos ficaram em log 2,70 na resposta primária (Tabela II) e somente 3 dias após a reinfecção observou-se títulos significativamente mais altos (log 3,30) persistindo assim até 3 semanas após a reinfecção (Tabela IV - Figura 4).

3.3 - Atividade tripanolítica nos Soros de Camundongos

3.3.1 - Análise da atividade tripanolítica nos soros de camundongos

(CBA/J x C₅₇Bl/10)F₁ e Biozzi "Bons" e "Maus" respondedoras durante a resposta primária.

Tripomastigotas sanguíneos obtidos de camundongos Swiss 55 letalmente irradiados, quando incubados com soros de camundongos F₁ e Biozzi "Bons" e "Maus" respondedores, seguida da adição de soro fresco humano utilizado como fonte ativa de complemento, foram lisados. Essa atividade porém variou com relação à intensidade de lise nos diferentes dias testados durante a resposta humoral primária, como também para as diferentes diluições testadas.

Os camundongos F₁ apresentaram já no 5º dia de infecção anticorpos líticos em uma diluição de até 1:256 (Figura 1), sendo que no 15º dia esse título aumenta para 1:2048 com 30% de lise. No 33º dia de infecção, encontramos a porcentagem máxima de lise de 50% nessa diluição (Tabela V) e a partir desse dia, sendo que até o 95º dia é possível encontrar-se esses anticorpos em uma porcentagem de 46% para uma diluição de 1:256.

Durante toda resposta primária, a atividade tripanolítica variou entre os diferentes dias testados e nas diferentes diluições testadas, ficando claro pelos resultados apresentados na Tabela V, que as porcentagens mais altas de lise ocorreram no 33º dia após a infecção.

Para os camundongos BL, observamos que a atividade desses anticorpos líticos segue de um certo modo, um mesmo padrão apresentado pelos híbridos F_1 . No 5º dia de infecção esses animais apresentaram uma atividade tripanolítica mais alta (Tabela VI), enquanto que nos F_1 nesse mesmo dia, não se detectou atividade lítica na diluição de 1:1024 (Tabela V). Os camundongos BH apresentaram títulos de até 1:1024 no 20º dia após a infecção (Figura 2B).

Já para os camundongos BL, no 5º e 10º dias obtivemos títulos de 1:128 e 1:512 respectivamente (Tabela VII), com as porcentagens de lise consideravelmente mais altas, quando comparadas àquelas obtidas com os híbridos F_1 e os BH. Esses títulos aumentaram no 15º e 20º dias (Figura 2A - Tabela VII), chegando a alcançar uma atividade tripanolítica de 100% no 20º dia após a infecção, em uma diluição de 1:16 (Tabela VII).

É importante ressaltar que essa porcentagem de lise de 100% não foi observada em nenhum dia, tanto para os animais F_1 como para os BH.

3.3.2 - Análise da Atividade Tripanolítica nos Soros de Camundongos (CBA/J x C₅₇-BL/10) F_1 durante a Resposta Humoral Secundária.

Considerando que os camundongos F_1 apresentaram uma típica resposta humoral secundária, determinada pela técnica de imunofluorescência, para aqueles que foram reinfectedados no 42º dia, bem como para os reinfectedados no 97º dia com 10^5 tripanosomas após uma primo-infecção com 10^2 parasitas, e que apresentaram uma atividade tripanolítica nos soros coletados durante a resposta primária, estudou-se a evolução dessa atividade durante a resposta humoral secundária.

Com relação aos animais reinfectedados no 42º dia, não se constatou a presença de uma resposta do tipo secundária para esse tipo de atividade tripanolítica (Figura 3), pois no 60º dia temos uma porcentagem de lise de 30% em uma diluição de 1:256

(Tabela VIII) sendo que encontramos uma porcentagem de 55% de lise nessa mesma diluição nos soros coletados no 60º dia, durante a resposta primária (Tabela V).

Da mesma maneira, os animais reinfectedados no 97º dia não apresentaram uma resposta secundária para essa atividade tripanolítica, pois não se observa um aumento significativo nas porcentagens de lise (Tabela IX). No 95º dia após a infecção durante a resposta primária, esses animais apresentaram 46% de lise em uma diluição de 1:256 (Tabela V), e quando reinfectedados no 97º dia, esses títulos ficam em uma diluição ao redor de 1:256, com 55% de lise para 110º e 120º dias de infecção.

3.4. - Infectividade dos Tripomastigotas após a Reação de Lise Imune Mediada pelo Complemento (CoML).

Os camundongos (CBA/J x C₅₇B1/10)F₁ inoculados com a suspensão de tripomastigotas pré-sensibilizados com o soro imune do 30º dia, seguida da adição de uma fonte ativa de complemento, apresentaram parasitemia detectável no 10º dia de infecção, em um pequeno número de animais e em níveis bastante baixos. Após o 10º dia, houve um pequeno acréscimo com um número máximo de 30 parasitas/mm³ no 12º dias após a infecção.

Depois desse dia, a parasitemia foi controlada, ficando com uma média de 15 parasitas/mm³ até o 32º dia, sendo que após esse período não mais se observou parasitas pelo método visual (Figura 5).

Esses animais quando inoculados com tripomastigotas tratados com soro imune, mais soro humano normal descomplementado, correspondendo ao grupo controle, mostraram parasitas também no 10º dia, porém em níveis mais altos. No 12º dia após a infecção, observou-se um acréscimo na parasitemia, com uma média de 180 parasitas/mm³. Do mesmo modo, esses animais controlaram a parasitemia após o pico parasitêmico, permanecendo assim até o 32º dia de infecção (Figura 5).

Os camundongos CBA/J que receberam o mesmo inóculo dos híbridos F_1 , sendo que para o grupo de animais inoculados com a reação mediada pelo complemento, detectou-se parasitas no 10º dia de infecção, em níveis baixos, aumentando no 12º dia onde encontramos cerca de 70 parasitas/mm³ (Figura 6). A parasitemia foi acompanhada até o 32º dia, ficando ao redor de 20 a 30 parasitas/mm³.

No grupo de animais controles, os parasitas começaram a ser detectados no 10º dia de infecção, com um pico parasitêmico de 320 parasitas/mm³ ocorrendo no 12º dia (Figura 6). Esses animais permaneceram com seus níveis parasitêmicos relativamente elevados durante o curso da infecção, quando comparados àqueles do grupo experimental (Figura 6), ou ainda quando comparados aos híbridos F_1 (Figura 5).

A infectividade dos tripomastigotas foi testada também para os camundongos pertencentes à linhagem C_3H_6/J . Nesses animais, os parasitas foram detectados na circulação sanguínea no 5º dia de infecção atingindo um máximo de 550 parasitas/mm³ no 9º dia para os animais inoculados com parasitas tratados pelo soro imune e complemento (Figura 7). O decréscimo dos parasitas foi gradual, onde após o 13º dia observou-se uma média de 50 parasitas/mm³, sendo a parasitemia detectável até o 20º dia.

No grupo de animais controles, a parasitemia teve início no 7º dia após a infecção, aumentando rapidamente no 8º dia onde obtivemos um valor máximo de 370 parasitas/mm³ (Figura 7). Esses valores continuaram aumentando para alcançarem uma média de 1400 parasitas/mm³ no 10º dia, correspondendo ao pico parasitêmico após o qual os animais controlaram a parasitemia, que foi igualmente acompanhada até o 20º dia após a infecção.

3.4.1 - Mortalidade dos Animais Inoculados.

A mortalidade dos animais inoculados com os tripomastigotas sensibilizados "in vitro" com soro imune, seguida da adição de uma fonte ativa de complemento variou com relação às diferentes linhagens de animais utilizadas para esse experimento.

Para os camundongos (CBA/J x C₅₇Bl/10)F₁, não se observou índices de mortalidade durante os 32 dias em que se acompanhou a parasitemia, sendo que esses animais viveram durante os 6 meses que se seguiram de observação (Tabelas X e XI).

Os animais CBA/J e C₃He/J, considerados mais sensíveis para infecções com T. cruzi, mostraram uma taxa de mortalidade no 20º dia de 25% e 50% respectivamente. Essa taxa elevou-se no 30º dia onde temos 100% de mortalidade para os camundongos C₃He/J e de 62,5% para os camundongos CBA/J (Tabela XI).

Nos animais inoculados com a suspensão de tripomastigotas tratados com soro imune mais soro humano normal descomplementado, a mortalidade foi mais alta, com excessão feita aos camundongos F₁ que forneceram dados idênticos ao do experimento no qual utilizou-se complemento na reação.

Contudo, os camundongos CBA/J e C₃He/J foram extremamente sensíveis à esse tipo de inóculo, onde no 15º dia de infecção, a taxa de mortalidade foi de 12,5% para os CBA/J e de 50% para os C₃He/J. No 20º dia após a inoculação, essa taxa subiu para 62,5% nos camundongos CBA/J e 75% no C₃He/J, sendo que esses últimos não sobreviveram além do 23º de infecção.

Do mesmo modo, os animais CBA/J não sobreviveram após o 30º dia, ficando esses 2 grupos de animais com uma taxa de mortalidade de 100% no 30º dia após a infecção, diferentemente dos híbridos F₁ que apresentaram uma sobrevivência de 100% nos 2 experimentos realizados (Tabelas X e XI).

Tabela I - Níveis Séricos de Imunoglobulinas IgM detectados durante a resposta primária ao T. cruzi

Linhagem de Camundongos ^a	Título de Anticorpos (\log_{10})										
	5° ^b	10°	15°	20°	30°	33°	35°	40°	60°	90°	95°
F ₁	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	2,10	2,10	1,50	1,50
BL	0,30	0,30	0,90	1,50	ND ^c	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BH	2,10	2,10	1,80	1,50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

a) Animais infectados com 10^2 tripomastigotas.

b) Dias de infecção.

c) Não determinado.

Tabela II- Níveis Séricos de Imunoglobulinas IgG detectadas durante a resposta primária ao T. cruzi

Linhagem de Camundongos ^a	Título de Anticorpos (\log_{10})										
	5 ^º b	10 ^º	15 ^º	20 ^º	30 ^º	33 ^º	35 ^º	40 ^º	60 ^º	90 ^º	95 ^º
F ₁	-	0,90	1,80	1,80	2,10	2,40	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
BL	-	0,60	0,90	1,50	ND ^c	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BH	1,20	1,80	2,10	2,70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

a) Animais infectados com 10² tripomastigotas.

b) Dias de infecção.

c) Não determinado.

Tabela III - Níveis Séricos de Imunoglobulinas IgM e IgG detectados durante a resposta secundária ao T. cruzi em camundongos (CBA/J x C₅₇^{B1/10})F₁.

Classe de Anticorpos ^b	Título de Anticorpos (log ₁₀)				
	44 ^º ^a	46 ^º	50 ^º	60 ^º	90 ^º
IgM	2,10	2,10	2,10	2,10	2,10
IgG	3,30	3,30	3,30	3,30	3,30

Tabela IV - Níveis Séricos de Imunoglobulinas IgM e IgG detectados durante a resposta secundária ao T. cruzi em camundongos (CBA/J x C₅₇^{B1/10})F₁.

Classe de Anticorpos ^c	Título de Anticorpos (log ₁₀)		
	100 ^º ^a	110 ^º	120 ^º
IgM	1,50	1,50	1,50
IgG	3,30	3,30	3,30

a) Dias de infecção.

b) Anticorpos determinados nos soros dos animais F₁ infectados com 10² parasitas e reinfectedados no 42^º dia com 10⁵ parasitas.

c) Anticorpos determinados nos soros dos animais F₁ infectados com 10² parasitas e reinfectedados no 97^º dia com 10⁵ parasitas.

Tabela V - Atividade tripanolítica do soro de camundongos (CBA/J x C₅₇BL/10)F₁ durante a resposta primária

Dias após a inoculação	Diluições dos soros ^a							
	16	32	64	128	256	512	1024	2048
5º	61	39	38	33	36	0	0	0
10º	60	67	67	60	50	0	0	0
15º	25	30	33	30	30	30	35	30
30º	60	67	71	71	75	67	30	30
33º	86	91	87	60	60	75	87	50
35º	40	70	55	71	55	0	0	0
40º	50	40	40	45	45	0	0	0
60º	60	66	65	77	55	0	0	0
90º	87	56	62	67	56	0	0	0
95º	75	75	65	40	46	0	0	0

% de Lise dos Tripomastigotas^b

a) Soros de animais inoculados com 10² tripomastigotas.

b) Porcentagem de tripomastigotas sanguíneas lisáveis pelo complemento humano "in vitro".

Tabela VI - Atividade tripanolítica do soro de camundongos Biozzi "Bons" respondedores durante a resposta primária.

Dias após a inoculação	Diluições dos soros ^a							
	16	32	64	128	256	512	1024	2048
	% de Lise dos Tripomastigotas ^b							
5º	57	50	30	31	34	30	30	0
10º	63	67	46	33	33	37	40	31
15º	57	42	40	41	30	39	40	40
20º	80	63	70	80	40	40	40	0

a) Soros de animais inoculados com 10² tripomastigotas.

b) Porcentagem de tripomastigotas sanguíneos lisáveis pelo complemento humano "in vitro".

Tabela VII - Atividade tripanolítica do soro de camundongos Biozzi "Maus" respondedores durante a resposta

primária.

Dias após a inoculação	Diluições dos soros ^a							
	16	32	64	128	256	512	1024	2048
	% de Lise dos Tripomastigotas ^b							
5º	86	75	43	45	0	0	0	0
10º	75	80	86	67	60	50	0	0
15º	66	64	66	60	60	60	50	55
20º	100	75	80	88	80	70	72	60

a) Soros de animais inoculados com 10² tripomastigotas.

b) Porcentagem de tripomastigotas sanguíneos lisáveis pelo complemento humano "in vitro".

Tabela VIII - Atividade tripanolítica do soro de camundongos (CBA/J x C₅₇Bl/10)F₁ durante a resposta secundária.

Dias após a inoculação	Diluições dos soros ^a							
	16	32	64	128	256	512	1024	2048
	% de lise dos Tripomastigotas ^b							
44º	60	50	43	40	57	0	0	0
46º	64	71	73	55	53	0	0	0
50º	68	60	64	50	50	0	0	0
60º	50	40	47	30	30	0	0	0
90º	75	87	60	67	56	0	0	0

a) Soros de animais inoculados com 10² tripanosomas e reinfectedados com 10⁵ tripomastigotas no 42º dia.

b) Porcentagem de tripomastigotas sanguíneos lisáveis pelo complemento humano "in vitro".

Tabela IX - Atividade tripanolítica do soro de camundongos (CBA/J x C₅₇/Bl/10)_{F₁} durante a resposta secundária.

Dias após a inoculação	Diluições dos soros ^a							
	16	32	64	128	256	512	1024	2048
	% de lise dos Tripomastigotas ^b							
100 ^o	70	60	66	50	45	0	0	0
110 ^o	70	57	53	50	55	0	0	0
120 ^o	80	87	55	50	55	0	0	0

a) Soros de animais inoculados com 10² tripanosomas e reinfetados com 10⁵ tripomastigotas no 97^o dia.

b) Porcentagem de tripomastigotas sanguíneos lisados pelo complemento humano "in vitro".

Tabela X - Mortalidade dos camundongos inoculados com parasitas sensibilizados com soro imune adicionados de soro humano normal descomplementado.

Linhagem de Camundongos ^a	Dias de infecção			
	10 ^º	15 ^º	20 ^º	30 ^º
Taxas de Mortalidade (%)				
CBA/J	0	12,5	62,5	100
C ₃ He/J	0	50	75	100
F ₁	0	0	0	0

Tabela XI - Mortalidade dos camundongos inoculados com parasitas sensibilizados com soro imune adicionados de uma fonte ativa de complemento humano.

Linhagem de Camundongos ^b	Dias de infecção			
	10 ^º	15 ^º	20 ^º	30 ^º
Taxas de Mortalidade (%)				
CBA/J	0	0	25	62,5
C ₃ He/J	0	0	50	100
F ₁	0	0	0	0

a) Animais inoculados com 10² parasitas sensibilizados com soro imune do 30^º dia de camundongos F₁, adicionados de SHuN descomplementado (n = 10).

b) Animais inoculados com 10² parasitas sensibilizados com soro imune do 30^º dia de camundongos F₁, adicionados de CHU (n = 10).

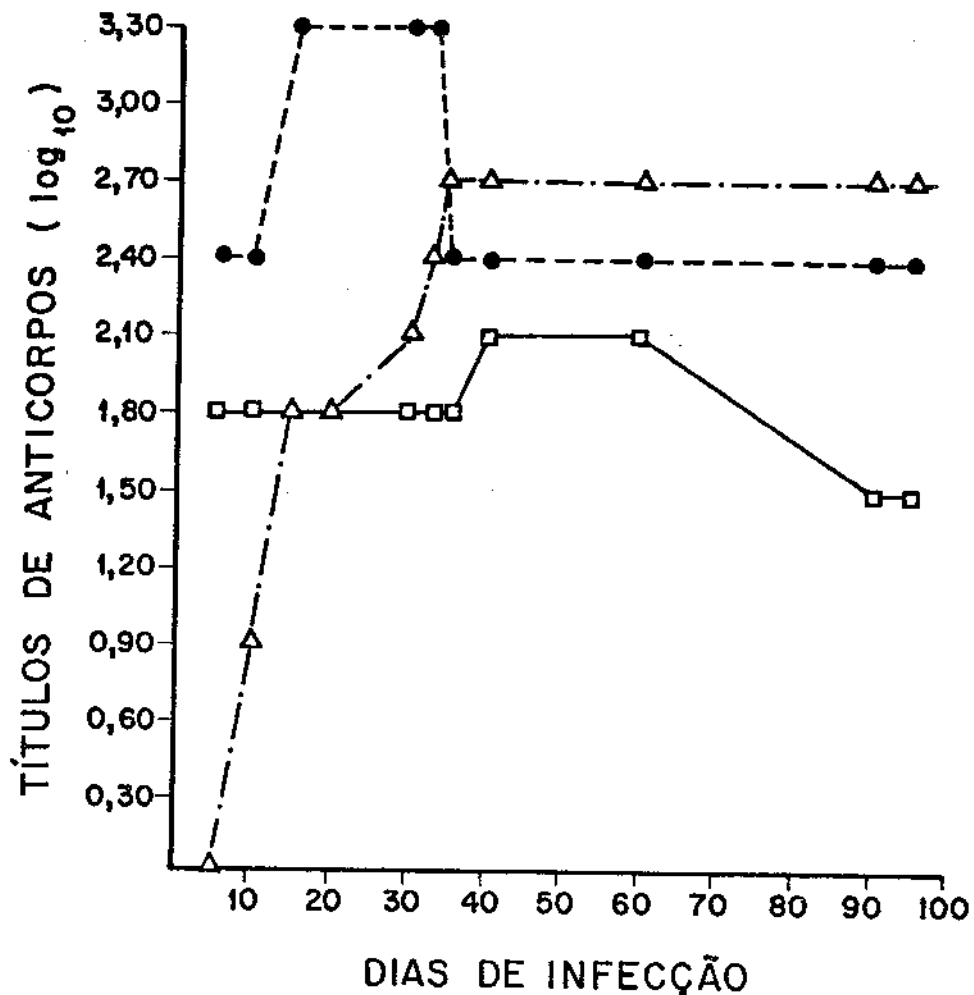


Figura 1: Cinética da resposta imune humoral primária para camundongos (CBA/J x C₅₇BL/10)F₁. Títulos dos soros detectados por imuno fluorescência para anticorpos da classe IgG (Δ—·—·Δ) para anticorpos da classe IgM (□—□) e títulos detectados através da lise imune mediada pelo complemento (●—·—·●).

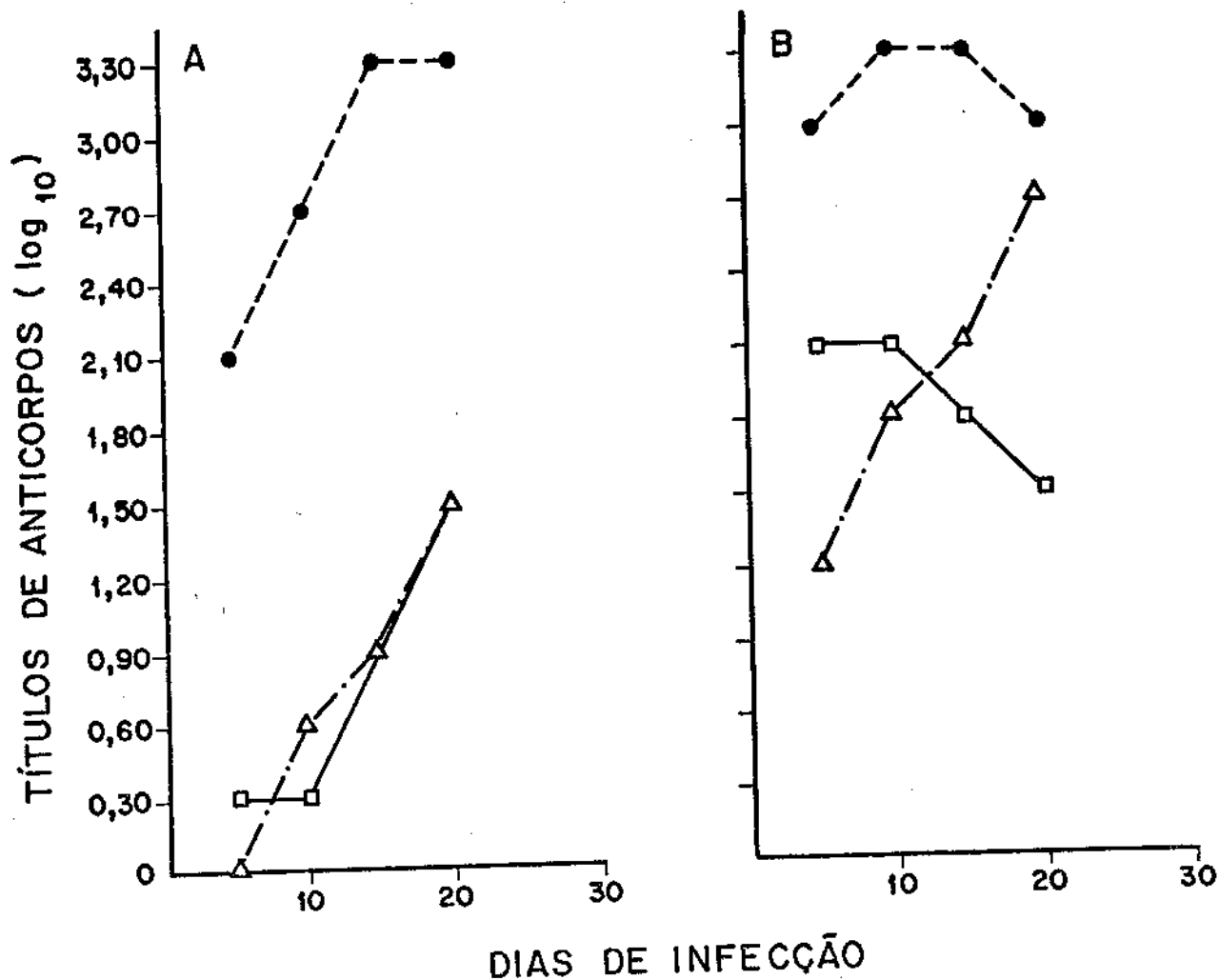


Figura 2: Cinética da resposta imune humoral primária para camundongos Biozzi "Maus" respondedores (2A) e Biozzi "Bons" respondedores (2B). Títulos dos soros detectados por imunofluorescência para anticorpos da classe IgG (Δ—Δ), para anticorpos da classe IgM (□—□) e títulos detectados através da lise imune mediada pelo complemento (●—●).

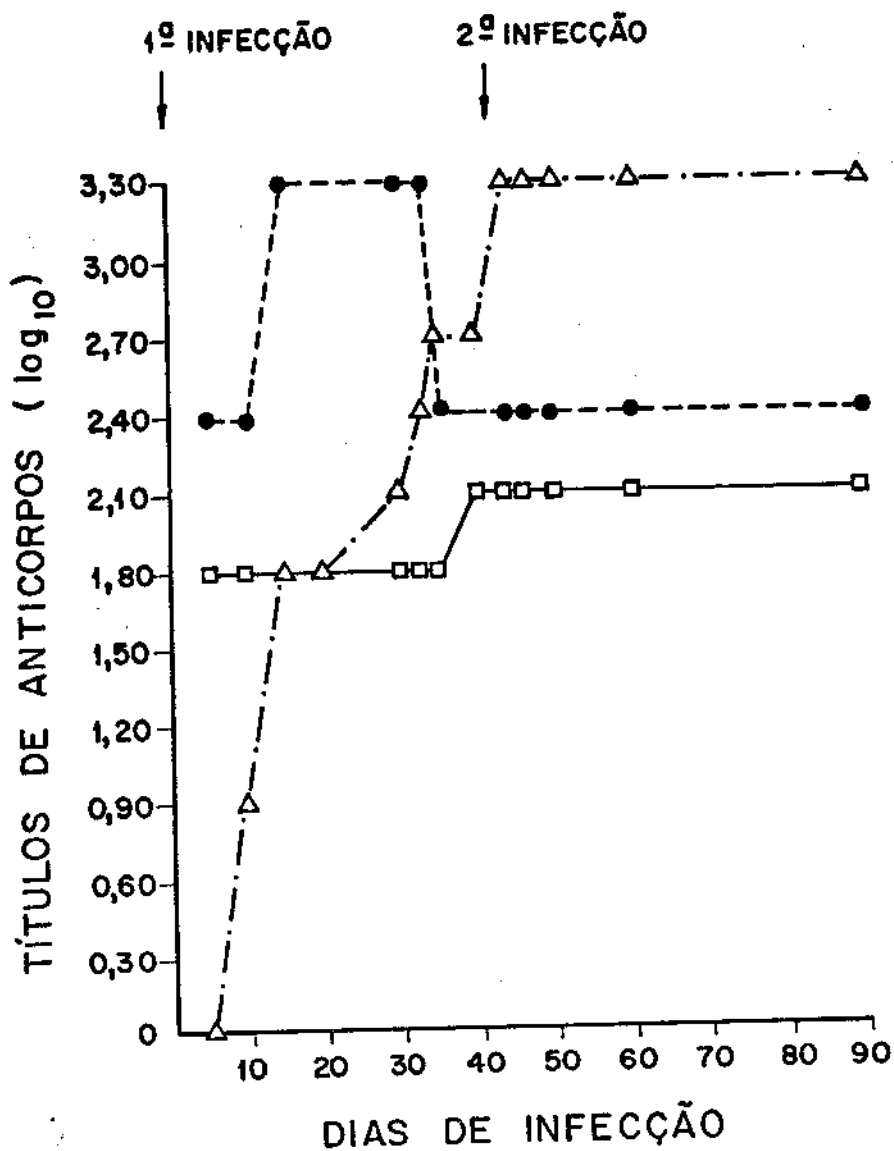


Figura 3: Cinética da resposta imune humoral secundária para camundongos (CBA/J x C₅₇Bl/10)F₁ infectados no dia 0 com 100 parasitas de *I. cruzi* e reinfectados no 42º dia com 10⁵ parasitas. Títulos dos soros detectados por imunofluorescência para anticorpos da classe IgG (Δ---Δ), para anticorpos da classe IgM (□——□) e títulos detectados através da lise imune mediada por complemento (●---●).

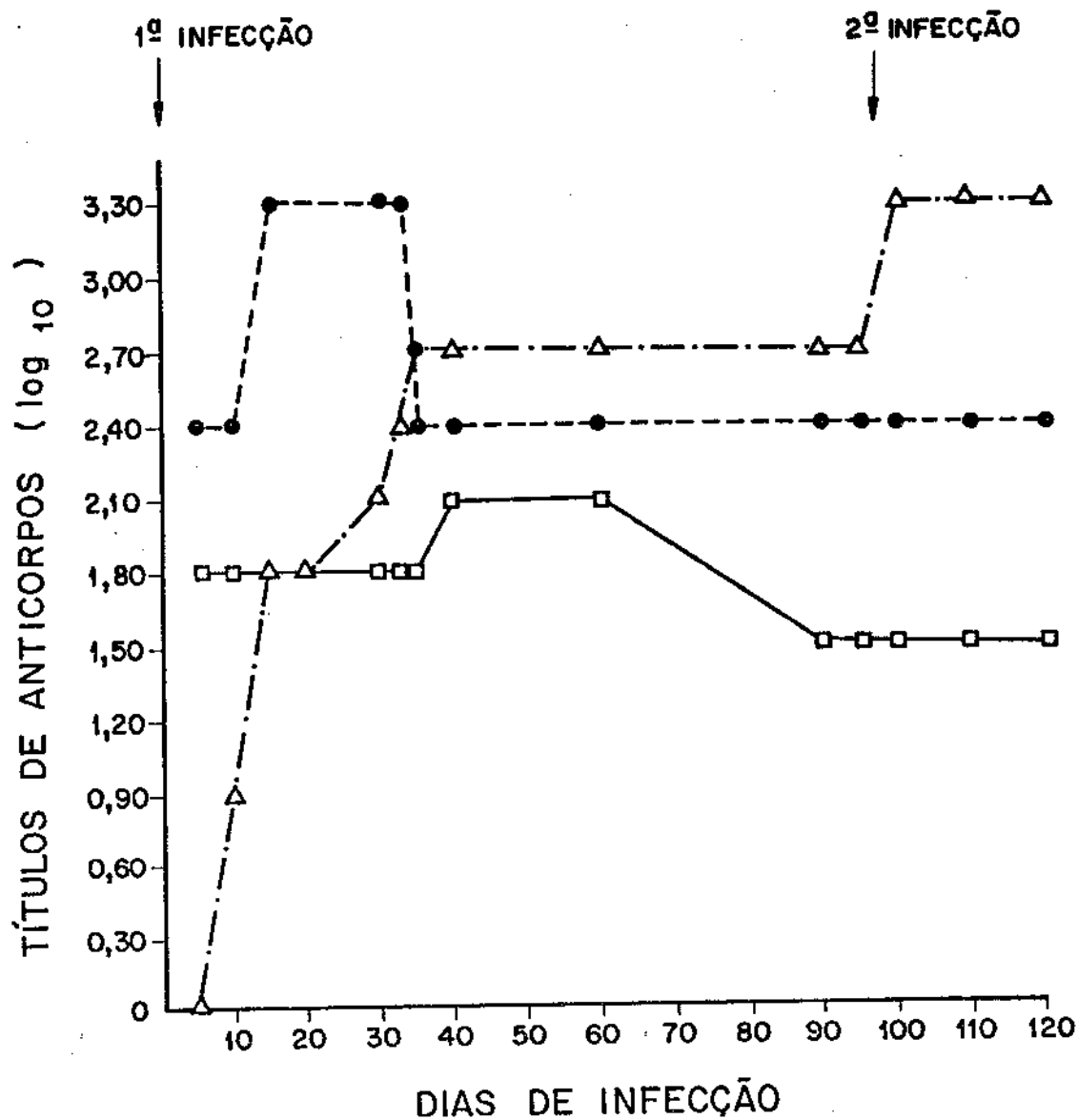


Figura 4: Cinética da resposta imune humoral secundária para camundongos (CBA/J x C₅₇Bl/10)F₁ infectados no dia 0 com 100 parasitas de *I. cruzi* e reinfectedados no 97º dia com 10⁵ parasitas. Títulos dos soros detectados por imunofluorescência para anticorpos da classe IgG (Δ---Δ), para anticorpos da classe IgM (□—□) e títulos detectados através da lise imune mediada pelo complemento (●---●).

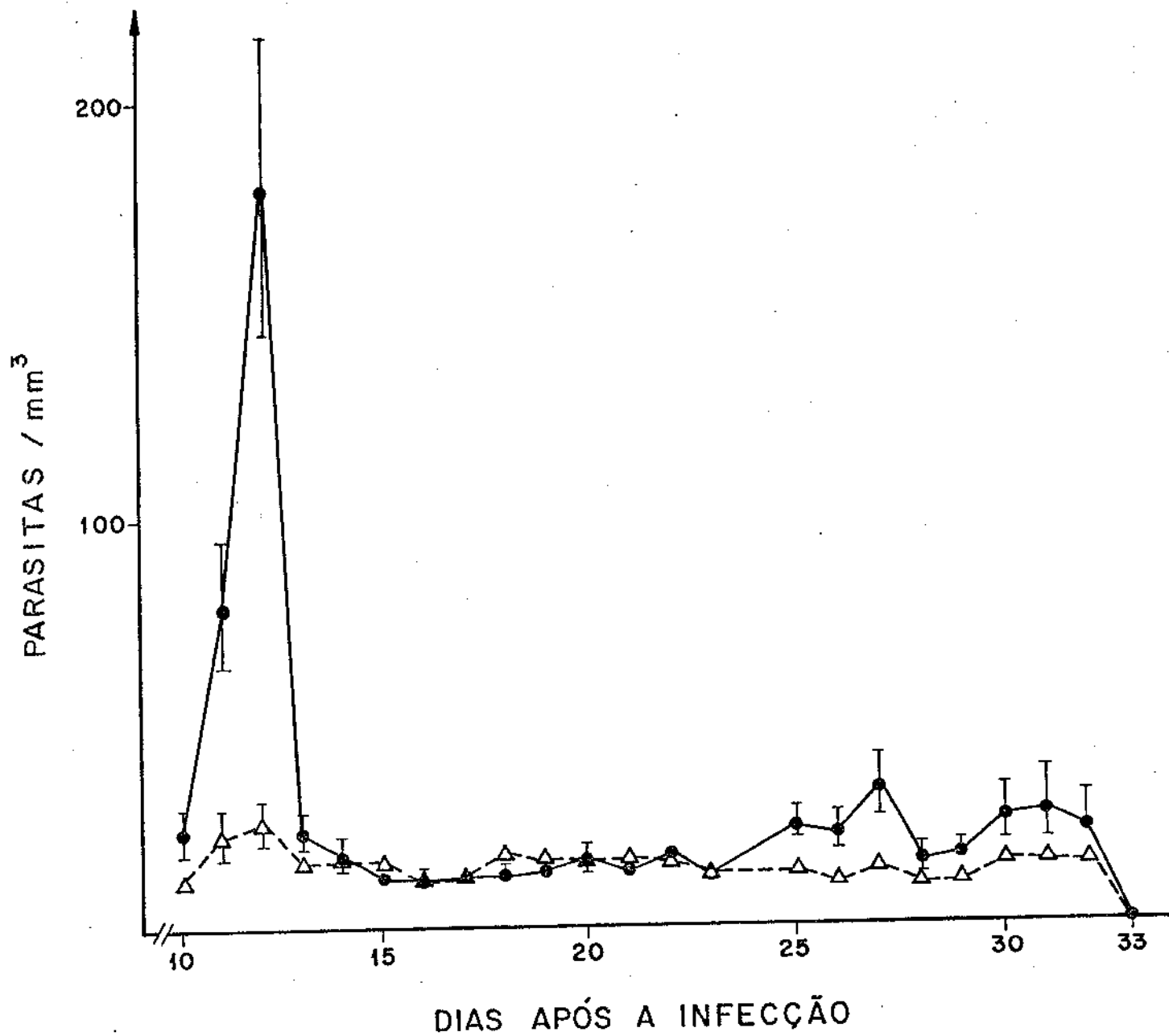


Figura 5: Parasitemia em camundongos (CBA/J x C₅₇B1/10)F₁ inoculados com tripomastigotas sensibilizados com soro imune seguido da adição de soro humano normal descomplementado (●—●) e inoculados com tripomastigotas sensibilizados com soro imune seguido da adição de uma fonte ativa de complemento (Δ---Δ).

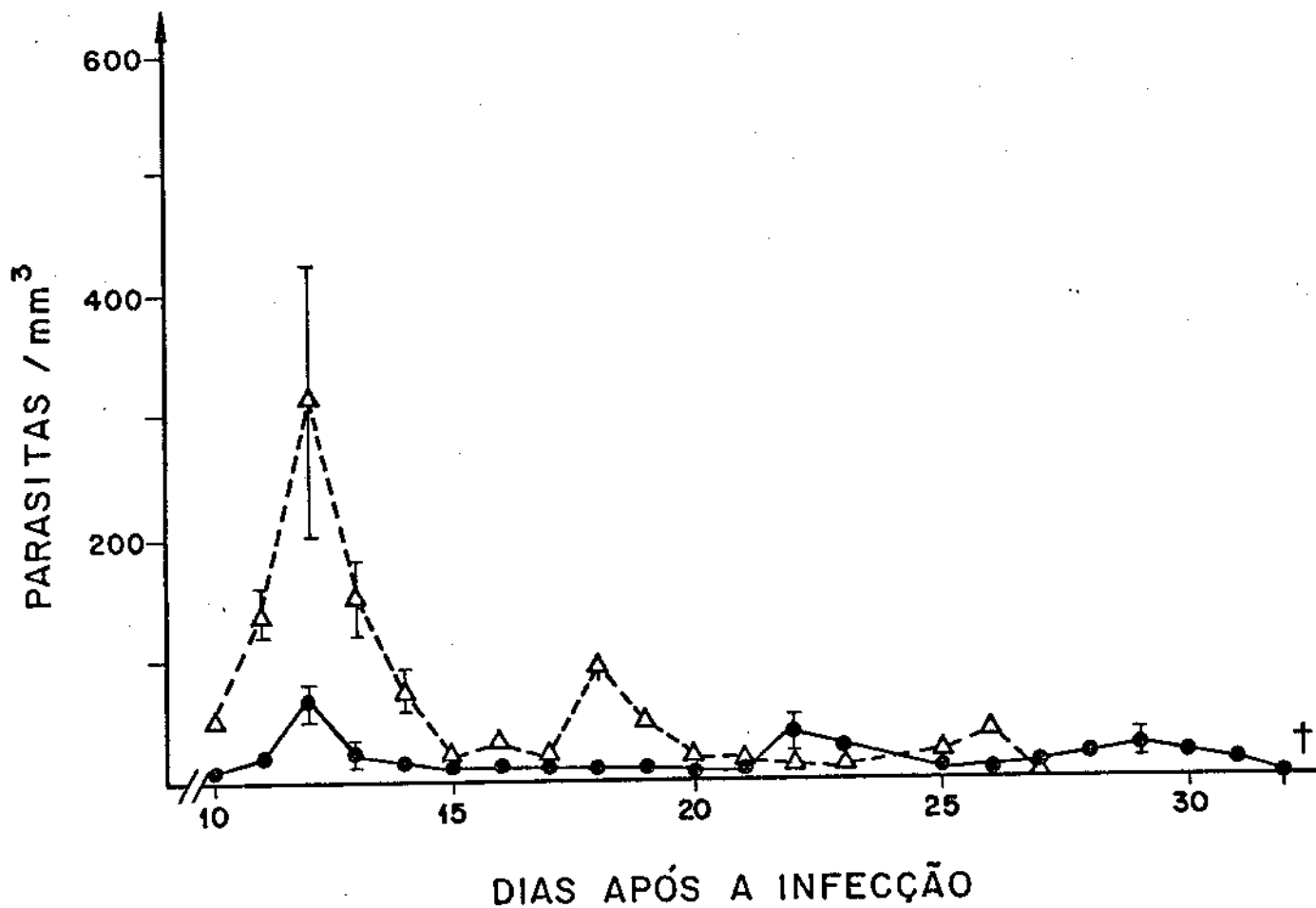


Figura 6: Parasitemia em camundongos CBA/J inoculados com tripomastigotas sensibilizados com soro imune seguido da adição de soro humano normal descomplementado (Δ - Δ) e inoculados com tripomastigotas sensibilizados com soro imune seguido da adição de uma fonte ativa de complemento (\bullet - \bullet).

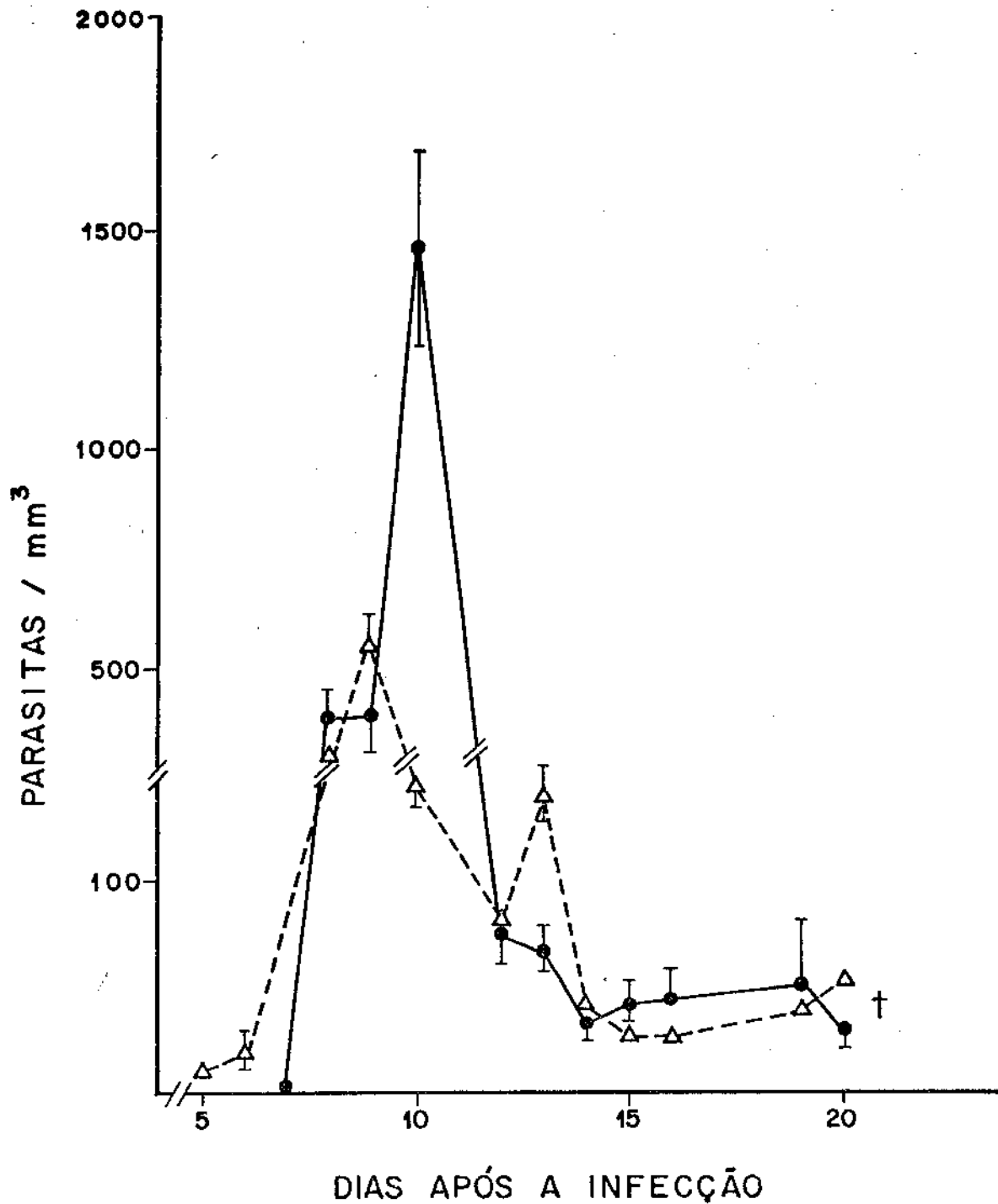


Figura 7: Parasitemia em camundongos C₃He/J inoculados com tripomastigotas sensibilizados com soro imune seguido da adiç~ao de soro humano normal descomplementado (●—●) e inoculados com tripomastigotas sensibilizados com soro imune seguido da adiç~ao de uma fonte ativa de complemento (Δ---Δ).

IV - DISCUSSÃO

Dados experimentais tem demonstrado que a resposta imunológica humoral, frente à infecções causadas por diferentes protozoários de importância clínica, é um parâmetro muito útil ao se fazer um diagnóstico. Esta resposta está associada tanto com a produção de imunoglobulinas específicas e imunoglobulinas não específicas (Cohen & Sadun, 1976).

Até agora vem sendo utilizado, para fins de diagnóstico, a pesquisa de anticorpos específicos, demonstrada através de técnicas sorológicas ou por meio de reações de hipersensibilidade imediata ou retardada (Fife, 1971; Cohen & Sadun, 1976).

Na tripanosomíase americana, a participação da imunidade humoral adquirida, tem sido bastante estudada por diversos autores sob o ponto de vista experimental (Goble, 1951; Hanson, 1976, 1977; Corsini, 1982).

Desta forma, Kierszenbaum & Howard (1976) demonstraram a participação dos anticorpos na resistência adquirida pelo hospedeiro, na fase aguda da infecção, onde camundongos "Maus" formadores de anticorpos (Biozzi et al, 1972) tornaram-se resistentes à um desafio com T. cruzi, após terem recebido soro ímune específico.

Além disso, sabe-se que anticorpo específico na presença de uma fonte ativa de complemento é letal para formas sanguíneas de T. cruzi (Budzko et al, 1975) onde algumas cepas causam uma ação combinada das vias clássica e alternativa (Krettli et al, 1979).

Analisando estes dados, estudamos a resposta de anticorpos nas fases primária e secundária durante a infecção pelo T. cruzi, pelos testes com soros obtidos de camundongos imunizados, utilizando reações de citotoxicidade complemento dependente contra formas tripomastigotas sanguíneas e reações de imunofluorescência com formas epimastigotas de cultura.

Os resultados por nós obtidos, mostram que o título de anticorpos detectados através de reações de imunofluorescência é mais elevado no início da infecção para os

camundongos Biozzi "Bons" respondedores (BH) do que para os híbridos F_1 e Biozzi "Maus" respondedores (BL). Este tipo de cinética observada para os anticorpos da classe IgM nesses animais, apresentam um comportamento semelhante ao observado anteriormente por Corsini et al (1982) para as imunoglobulinas pertencentes à classe IgG.

O aparecimento de anticorpos pertencentes à classe IgM no início da infecção já foi anteriormente demonstrado em pacientes que apresentavam infecção pelo I. cruzi (Cerizola, 1977; Teixeira, 1978).

Durante a resposta primária ao I. cruzi, observou-se uma acentuada diferença na produção de anticorpos da classe IgG entre os camundongos BH e BL, não sendo possível detectar-se nesses últimos animais anticorpos no 5º dia após a infecção. Os valores máximos de produção de anticorpos para essas duas linhagens de camundongos, ocorreram no 20º dia após a inoculação do I. cruzi (Tabela II). Apesar dos camundongos BH apresentarem uma resposta humoral consideravelmente mais rápida e mais elevada para todos os dias testados que os camundongos BL, o índice de mortalidade não foi alterado, isto é, títulos mais altos de anticorpos não contribuíram em prolongar a sobrevivência dos animais BH.

Estudos paralelos feitos com camundongos (CBA/J x $C_{57}BL/10$) F_1 mostraram que o valor máximo de anticorpos do tipo IgG ocorreu mais tardiamente, ao redor do 35º dia sendo possível detectar-se ainda no 95º dia níveis dessa imunoglobulina. Nos primeiros dias após a infecção, esses animais mostraram níveis baixos de IgG quando comparados aos camundongos BH (Tabela II). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Krettli (1982) onde anticorpos pertencentes à classe IgG são de fato detectados mais tardiamente após a infecção.

Esses fatos nos sugerem a importância da presença de anticorpos no início da infecção, onde alguns autores demonstraram uma relativa proteção à infecção pelo I. cruzi, através da administração passiva de soro imune em camundongos e em ratos (Kagan & Norman, 1962; Krettli & Brener, 1976; Kierszenbaum & Howard, 1976; Kolodny, 1938).

Mais recentemente, Kierszenbaun (1980) demonstrou que camundongos atímicos, altamente susceptíveis ao I. cruzi, controlam melhor a infecção quando imunizados passivamente 24 horas antes de receberem o inóculo com esse parasita.

A análise dos anticorpos pertencentes à classe IgG caracterizou melhor a resposta secundária, tanto para o grupo de animais reinfectados no 42º dia (Tabelas II e III) como para o grupo reinfectado no 97º dia (Tabelas II e IV) com 10^5 formas sanguíneas de I. cruzi. Observou-se títulos consideravelmente aumentados em relação à resposta primária obtida, sendo que os valores mais elevados foram obtidos no grupo de animais reinfectados no 42º dia. Tais resultados confirmam a importância de anticorpos IgG na resposta humoral durante a infecção por esse protozoário.

Takehara & Mota (1979) observaram resultados semelhantes mostrando o papel protetor para os anticorpos pertencentes às sub-classes IgG_{2a} e IgG_{2b}, mas não para os da classe IgM durante a infecção por I. cruzi. Em infecções causadas por Plasmodium falciparum esse aumento nos níveis de imunoglobulinas já foi demonstrado, onde adultos do oeste africano residentes em áreas hiperendêmicas, mostram níveis elevados de IgG e IgM especialmente (Rowe et al, 1968).

Recentemente, Grögl & Kuhn (1985) observaram que os níveis de anticorpos pertencentes à classe IgG foram mais elevados quando comparados aos da classe IgM para camundongos C₅₇Bl/6 (resistentes) e C₃H/He (sensíveis) quando infectados com a cepa Brasil de I. cruzi.

Fica clara a importância da pesquisa de imunoglobulinas no soro de indivíduos, principalmente nos que residem em áreas consideradas de alto risco, pois constitui uma maneira de se determinar a frequência de resultados sorológicos positivos de uma maneira segura visando inquéritos e/ou diagnósticos de várias infecções parasitárias.

Os anticorpos produzidos pelo hospedeiro infectado participam de outros eventos da resposta imune, na tentativa de combater a infecção pelo I. cruzi. Na presença

de uma fonte ativa de complemento, os anticorpos são letais para formas sanguíneas de I. cruzi (Budzko et al, 1975). Dessa maneira, vários autores (Krettli et al, 1979; Dalmaso & Jarvinem, 1980; Romeiro et al, 1984) tem estudado a importância do papel de sempenhado pela lise imune mediada pelo complemento no curso dessa infecção.

A abordagem experimental para se verificar tal característica, consistiu em determinar-se as porcentagens de lise de tripomastigotas sanguíneos obtidos de camundongos previamente irradiados, frente à soros de diferentes linhagens de camundongos isogênicos, previamente imunizados com I. cruzi, acrescidos de uma fonte ativa de complemento.

Os resultados obtidos demonstram que durante a resposta primária, soros de camundongos (CBA/J x C₅₇^{B1/10})F₁ exibem tal atividade tripanolítica já no 5º dia de infecção, apresentando uma taxa de lise de 61%, em uma diluição de 1:16, sendo que esta atividade decresce na diluição seguinte (1:32), atingindo o título máximo de 1:256 com uma taxa de 36% de lise (Tabela V).

No 10º dia após a infecção, as taxas de lise ficam em torno de 60% até a diluição de 1:128, sendo o título máximo para esse dia de 1:256 com 50% de lise. No 15º dia de infecção as porcentagens de lise aparecem mais baixas, em torno de 30% para todas as diluições testadas (Tabela V).

A determinação de tal índice no soro desses animais no 30º dia mostrou 67% de lise dos parasitas (título 1:512) e a diluição posterior indicou uma taxa de 30%. No 33º dia obteve-se lise ao redor de 90% mesmo em altas diluições (título 1:1024) e a partir do 35º dia observa-se uma diminuição nesses índices (55% de lise na diluição 1:256). No 90º e 95º dias, detectou-se índices de lise significativamente altos apenas em pequenas diluições (1:16), com 70% de lise, e o título máximo ficou em 1:256 (46% de lise) no 95º dia, acompanhando portanto os índices máximos do 35º dia após a infecção (Tabela V - Figura 1).

Comparando-se os resultados obtidos nas reações de lise e na titulação de anticorpos da classe IgG, pela técnica de imunofluorescência (Figura 1), podemos sugerir a existência de cinéticas diferenciadas para os 2 tipos de resposta. Enquanto que o anticorpo lítico exibe uma resposta elevada já a partir do 5º dia de infecção, apresentando um pico no 33º dia e depois decrescendo para níveis mais baixos, observa-se que os títulos de IgG detectados pela imunofluorescência aumentam gradativamente até o 35º dia permanecendo num patamar mais elevado até o último dia testado (95º dia).

Para os camundongos Biozzi "Bons" respondedores, o perfil da resposta foi similar àqueles obtidos com os híbridos F_1 no 5º dia de infecção. Observa-se um decréscimo nas taxas de lise no 15º dia, para logo em seguida no 20º dia possuírem uma atividade de tripanolítica de 80% (diluição 1:16 - Tabela VI). Estes dados se aproximam daqueles obtidos nas titulações feitas através da imunofluorescência, onde o valor máximo de produção de anticorpos pertencentes à classe IgG também ocorreu no 20º dia (Tabela II). Nesse caso, o título máximo de IgG foi obtido na diluição 1:512, sendo que na lise imune, esses títulos permanecem até uma diluição de 1:1024.

A correlação dos anticorpos líticos é feita especialmente com os anticorpos pertencentes à classe IgG, já que soros tratados com 2-mercaptoetanol-iodoacetamina não reduziu os títulos desses anticorpos (De-Gaspari & Abrahamsohn, 1983).

Curiosamente, os camundongos Biozzi "Maus" respondedores apresentaram as porcentagens mais altas de lise em todos os dias testados (5º, 10º, 15º, 20º dias após a infecção) quando comparados com os camundongos Biozzi "Bons" respondedores. Verificamos portanto, índices líticos mais elevados em todas as diluições testadas, sendo que no 20º dia, o soro desses animais apresentou uma atividade de lise de 100%. Esse índice não foi observado em nenhum dia de infecção nos soros das outras 2 linhagens testadas, os híbridos F_1 e os BH.

Não se obteve uma correlação, também para os camundongos BL, entre os resul-

tados obtidos através da imunofluorescência com àqueles obtidos na lise imune, já que os camundongos B1 foram os que exibiram os títulos mais baixos de IgG com um valor máximo de log 1,50 alcançado no 20º dia (Tabela II).

Os valores de porcentagens de lise obtidos durante a titulação dos soros na fase aguda indicam que tais soros são ricos em anticorpos líticos. Esses dados vem mais uma vez fortalecer a idéia de que a lise imune mediada pelo complemento pode não ser tão efetiva para a morte do parasita nessa fase da infecção. Embora os soros dos animais Biozzi "Maus" respondedores possuam um índice de lise bastante elevado, esse fato não se traduz em uma maior sobrevivência para esses animais, pois segundo Cunningham et al (1978), os baixos teores de complemento encontrados durante a fase aguda dificultam a lise do parasita "in vivo".

Contudo, é possível que a lise imunológica participe na resistência adquirida pelo hospedeiro durante a fase crônica da infecção. Assim, para camundongos F₁ tentamos determinar a presença de uma resposta secundária para os anticorpos líticos. Para o grupo de animais reinfectedos no 42º dia, as porcentagens de lise permaneceram estáveis com títulos de 1:256 até o 90º dia (Figura 3 - Tabela VIII) o mesmo ocorrendo com o grupo dos híbridos F₁ reinfectedos no 97º dia (Figura 4 - Tabela IX).

Novamente não foi possível correlacionar os resultados obtidos pelas 2 técnicas utilizadas, sorologia convencional com epimastigotas fixados e lise imune mediada pelo complemento com tripomastigotas sanguíneos. Parece-nos que apesar desses anticorpos líticos serem mais importantes para o hospedeiro durante a fase crônica da infecção (Krettli et al, 1979; Dalmaso & Jarvinem, 1980), e ainda, que sejam anticorpos pertencentes à classe IgG (De-Gaspari & Abrahamsohn, 1983) eles apresentam um comportamento distinto entre si.

Essa diferença já foi constatada anteriormente por Krettli & Brenner (1982), onde esses autores utilizando camundongos infectados com I. cruzi e tratados com

nitroimidazol mas considerados como "não curados", mostraram um comportamento diferente em relação aos anticorpos líticos e os detectados pela imunofluorescência, quando foram comparados aos camundongos que igualmente foram tratados com a droga e tiveram sua infecção eliminada. Os animais tratados mas "não curados" foram resistentes à reinfeção pelo T. cruzi e mostraram altos índices de anticorpos detectados pelas 2 técnicas. Por outro lado os animais considerados "curados" não mais apresentaram anticorpos líticos em níveis significativos, mesmo após 4 meses depois do tratamento, enquanto que os testes de imunofluorescência permaneceram positivos para esse mesmo período.

Esses dados podem explicar de um certo modo, o porque da redução nas taxas de lise no soro de animais (CBA/J x C₅₇Bl/10)F₁ em períodos longos de infecção. Os baixos números de tripomastigotas circulantes no hospedeiro encontrados durante essa fase, causariam uma redução nas taxas de lise já que esses anticorpos estariam sendo formados em direção às formas vivas circulantes.

É importante considerar também a sensibilidade de tripomastigotas sanguíneos obtidos de hospedeiros infectados frente à determinados tipos celulares. Kierszenbaun & Hayes (1980) observaram que células linfóides humanas ou murinas exibem a capacidade de destruir formas tripomastigotas de T. cruzi (cepa Tulahuén) "in vitro". Esses autores observaram que a quantidade de parasitas mortos não alcançou proporções significantes (maior que 2%) a menos que antisoro específico contra esse flagelado estivesse presente na reação.

Sanderson & Souza (1979) descreveram anteriormente a capacidade de eosinófilos de ratos em destruir tripomastigotas de T. cruzi "in vitro", em uma reação aumentada na presença de anticorpo específico. Esses resultados de citotoxicidade celular anticorpo dependente (Kierszenbaun & Hayes, 1980; Sanderson & Souza, 1979), bem como os de citotoxicidade complemento dependente por nós apresentados, mostram o envolvimento dos anticorpos e a sensibilidade das formas tripomastigotas de T. cruzi, à lise causada por

células linfóides e também à lise causada pela presença de uma fonte ativa de complemento respectivamente. Embora esses estudos revelem uma sensibilidade "in vitro" das formas tripomastigotas de T. cruzi, não podemos descartar a possibilidade desses eventos ocorrerem no hospedeiro infectado, os quais contribuiriam na redução das formas circulantes do parasita, contribuindo assim para a sobrevivência do hospedeiro.

Considerando que o critério aqui utilizado para se avaliar a atividade tripomastigocida dos soros foi de natureza morfológica, ou seja, a perda de motilidade das formas tripomastigotas de T. cruzi, adicionalmente estudou-se a capacidade dos tripomastigotas que foram submetidos à reação de lise imune mediada pelo complemento, de infectar diferentes linhagens isogênicas de camundongos.

O perfil parasitêmico do grupo experimental dos híbridos F_1 , no qual os parasitas foram submetidos à CoML foi acentuadamente menor quando comparados ao grupo controle (Figura 5), que corresponde aos animais inoculados com parasitas tratados com soro imune e adicionalmente tratados com SMuN inativado. O grupo experimental apresentou o pico parasitêmico no 12º dia de infecção com uma média de 25 parasitas/mm³, enquanto que o grupo controle apresentou 180 parasitas/mm³ nesse mesmo dia. A parasitemia permaneceu baixa para ambos os grupos durante os 33 dias de infecção, período após o qual não mais se detectou parasitas no sangue circulante.

Os camundongos CBA/J, os quais foram tratados da mesma forma, apresentaram uma parasitemia mais elevada quando comparados aos híbridos F_1 , sendo o pico parasitêmico detectado também no 12º dia após a infecção. Nesse dia, esses animais apresentaram uma média de 320 parasitas/mm³ e 70 parasitas/mm³ nos grupos controle e experimental respectivamente (Figura 6).

Igual procedimento experimental foi utilizado na determinação dos níveis de parasitemia para os camundongos C₃He/J. Tais animais foram os que apresentaram a maior susceptibilidade ao inóculo de tripomastigotas sensibilizados pelo soro imune adicional

dos de soro humano normal descomplementado (Figura 7). Observou-se nesses animais uma redução no período pré-patente da infecção, pois já no 5º dia após os animais terem recebido este inóculo, foi possível observar-se parasitas no sangue circulante, ao contrário dos híbridos F_1 e dos CBA/J que iniciaram a parasitemia no 10º dia e em níveis bem mais baixos.

Adicionalmente, esses animais tiveram o pico parasitêmico no 10º dia, anterior aos demais, com uma média de 1400 parasitas/mm³. Durante todo curso da infecção esses animais tiveram uma parasitemia mais elevada, permanecendo assim até o 20º dia. O perfil parasitêmico dos camundongos C_3 He/J foi o mais elevado quando comparados aos outros grupos de animais utilizados. O grupo de camundongos C_3 He/J no qual os parasitas foram submetidos à CoML, exibiu um pico parasitêmico no 9º dia com 550 parasitas/mm³. Os níveis de parasitemia observados nas 3 linhagens de camundongos testados estão correlacionados com os índices de mortalidade determinados.

Dessa forma, os híbridos F_1 que receberam tripomastigotas sensibilizado com soro imune mais uma fonte ativa de complemento, tiveram uma sobrevida de 100% mesmo após 6 meses de observação. Em relação aos camundongos CBA/J e C_3 He/J observou-se uma mortalidade de 25% e 50% respectivamente no 20º dia (Tabela XI).

Nos diferentes grupo de animais controles, onde o inóculo correspondia à parasitas sensibilizados pelo soro imune, adicionados de SHuN descomplementado, os híbridos F_1 novamente apresentaram uma sobrevida similar ao do grupo experimental (100%). Por outro lado, as linhagens CBA/J e C_3 He/J mostraram uma maior susceptibilidade a esse tipo de inóculo, uma vez que no 20º dia após a inoculação, a mortalidade foi consideravelmente alta, com 62,5% para os animais CBA/J e de 75% para os C_3 He/J (Tabela X). Esses animais ao final de 30 dias após a infecção apresentaram 100% de mortalidade.

Os resultados aqui mostrados estão de acordo com aqueles obtidos por Trischmann et al (1978) e Corsini et al (1981) onde diferentes linhagens de camundongos

diferem com relação ao grau de susceptibilidade à infecção pelo I. cruzi. Mais recentemente, Wrightsman et al (1982) utilizando camundongos congênicos infectados com I. cruzi cepa Peru, observaram que a parasitemia e o tempo de sobrevivência eram influenciados por diversos genes. Esses autores sugerem que um ou mais genes localizados fora da região H-2 estariam envolvidos em regular o nível da parasitemia durante a infecção. Outros genes ligados ao H-2, estariam envolvidos em determinar a sobrevivência à esse tipo de infecção, e parecem ser únicos ao haplótipo H-2^S.

As diferenças observadas entre a mortalidade e os níveis de anticorpos detectados nas linhagens testadas, principalmente no que se referem aos camundongos Biozzi, sugerem que diferentes mecanismos imunológicos podem participar no controle da infecção causada pelo I. cruzi. Embora os camundongos Biozzi "Bons" respondedores, que tem como característica uma boa produção de anticorpos da classe IgG e também altos níveis de anticorpos líticos, uma alta mortalidade foi observada independente desses fenômenos. Já nos animais Biozzi "Maus" respondedores, os quais mostram altíssimos índices de anticorpo lítico porém níveis de IgG pouco intensos detectados através de imunofluorescência, igual mortalidade foi detectada. Ambos os fenômenos parecem sugerir que esses tipos de respostas poderiam estar envolvidos concomitantemente à outros, em uma tentativa do hospedeiro em controlar a infecção causada pelo agente invasor, nesse caso o I. cruzi.

Além do mais nossos resultados mostraram que os tripomastigotas submetidos à reação de lise imune mediada pelo complemento e posterior inoculação dessas formas nas diferentes linhagens de animais, diminuiu significativamente a sua infectividade, mas não a aboliu totalmente.

Analisando os resultados obtidos, podemos concluir que não foi possível obter correlação entre os títulos obtidos através da reação de imunofluorescência convencional utilizando-se epimastigotas fixados, nos soros de camundongos Biozzi "Bons" e "Maus" respondedores e (CBA/J x C₅₇B1/10)F₁, com aqueles obtidos pela reação de lise das for-

mas tripomastigotas circulantes.

Verificou-se também que não houve necessidade de uma reinfecção para se obter títulos elevados de IgG detectados pela técnica de lise, já que esses títulos permaneceram inalterados nos grupos de animais inoculados uma ou duas vezes.

Nesse caso, parece que a infecção primária induziu uma resposta imune eficaz e que as reinoculações não deram origem a uma resposta humoral do tipo secundária. Pereira & Krettli (1983) sugerem que, durante a fase crônica da infecção pelo I. cruzi, a resposta humoral protetora uma vez instalada se exerce independentemente de reinoculações com o parasita.

Os resultados obtidos na titulação dos soros coletados durante a fase aguda da infecção, para camundongos Biozzi "Bons" e "Maus" respondedores e para os híbridos F₁ mostraram que esses soros são ricos em anticorpos líticos, confirmando as observações anteriores feitas por Krettli & Brener (1982), onde esses autores sugerem que tais anticorpos estariam sendo formados "em direção" à tripomastigotas vivos circulantes no hospedeiro infectado. Esses anticorpos porém não desempenham um papel importante durante a fase aguda da infecção, onde os níveis de complemento, de C₃ e properdina são muito baixos (Cunningham et al, 1978; Krettli et al, 1979; Dalmaso & Jarvinen, 1980), explicando assim, a alta mortalidade dos camundongos Biozzi os quais possuem altos níveis de anticorpos líticos. Conseqüentemente, a lise imune dos tripomastigotas via complemento "in vivo" estaria de um certo modo "inibida" durante a fase aguda da infecção.

Por outro lado, já foi demonstrado (Budzko, 1975) evidências de que fatores do complemento operam "in vivo", onde a depleção do componente C₃ através do fator do veneno de cobra (CoV) resultou em um aumento na severidade da infecção aguda em camundongos. O mecanismo de lise imune parece-nos não desempenhar de fato um papel principal na fase aguda da infecção pelo I. cruzi, mas participaria talvez da tentativa do hos-

pedeiro em desenvolver uma resposta imune mais rápida e eficaz. A ausência dessa resposta poderia, de um certo modo, causar um desequilíbrio na resistência do hospedeiro, aumentando desta forma a severidade das infecções.

É importante ressaltar ainda que durante a fase aguda da infecção pelo T. cruzi, existe também a imunossupressão da resposta imune celular (Krettli & Lima Pereira, 1981; Corsini, 1982; Costa, 1982), e diferentes eventos nessa fase podem favorecer a sobrevivência do parasita, como os baixos níveis de complemento, bem como a habilidade do parasita em sobreviver no interior dos macrófagos. Portanto, apesar dos anticorpos estarem sendo produzidos, a mortalidade do hospedeiro é um evento comum nessa fase. Nossos resultados sugerem ainda que as imunoglobulinas detectadas através da reação de imunofluorescência utilizando epimastigotas fixados e as detectadas pela lise imune mediada pelo complemento são diferentes. Esses resultados são similares aos já obtidos por outros autores, os quais demonstraram a presença em pacientes chagásicos (Krettli et al, 1982) ou em animais cronicamente infectados pelo T. cruzi (Krettli & Brener, 1982) de anticorpos que diferem funcionalmente entre si.

Mais recentemente, Stefani et al (1983) mostraram que a atividade lítica no soro imune está relacionada com imunoglobulinas de isótipo IgG, incluindo as sub-classes IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e possivelmente IgG₃. Em outro trabalho Krettli et al (1982) sugerem que diferentes sub-classes de imunoglobulinas poderiam participar de uma maneira diferente nos testes de lise imune, bem como em outros testes sorológicos explicando assim, a dissociação por nós observada. Esses autores discutem a possibilidade da IgG₃ desempenhar essa função de atividade lítica, por sua alta capacidade de fixar complemento.

Fica clara a importância de se estudar os anticorpos que participam da lise imune, a fim de se tentar elucidar muitos pontos que ainda permanecem obscuros. A pesquisa desses anticorpos que dependem da presença do parasita pode representar um recur

so adicional para demonstrar-se a infecção chagásica ativa. Nesse sentido, Lopes et al, (1984) detectaram anticorpos líticos, através da lise imune mediada pelo complemento, em 11 líquidos pericárdicos obtidos de pacientes chagásicos falecidos subitamente, ou por causas não relacionadas à Doença de Chagas, e que estão incluídos em um estudo da forma indeterminada dessa doença.

O estudo dos anticorpos líticos abre assim perspectivas para melhor conhecermos a patologia da Doença de Chagas, contribuindo igualmente na determinação de infecções chagásicas ativas. É de importância também o estudo da cronicidade de infecções causadas por protozoários, já que tal estado reflete a existência de um complexo balanço, entre a reatividade imune do hospedeiro, que produz respostas humorais potencialmente letais para o parasita, e a capacidade do parasita evadir, sobrevivendo.

V - RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho estudamos a presença de anticorpos líticos contra o I. cruzi, cepa Y durante a infecção em camundongos (CBA/J x C₅₇Bl/10)F₁ e Biozzi "Bons" e "Maus" respondedores (seleção III) e correlacionamos os títulos dos soros obtidos através da técnica da lise imune mediada pelo complemento humano com os títulos verificados nas reações de imunofluorescência.

Nossos resultados nos permitem concluir que:

1 - A resposta humoral para os anticorpos pertencentes à classe IgM foi detectada logo nos primeiros dias após a infecção somente nos camundongos Biozzi "Bons" respondedores. Nos híbridos F₁ e nos Biozzi "Maus" respondedores esse anticorpo aparece mais tardiamente.

2 - Para os anticorpos da classe IgG, durante a resposta humoral primária, os camundongos BH foram os que responderam mais rapidamente. Os índices de mortalidade porém foram semelhantes aos dos camundongos BL.

3 - Durante a resposta secundária observamos títulos consideravelmente umentados para os anticorpos da classe IgG, em relação aos títulos obtidos durante a respos-ta primária para os camundongos F₁. Esses valores mostraram-se aumentados tanto para o grupo de animais reinfectedados no 42º dia, como para aqueles reinfectedados no 97º dia após a primó-infecção.

4 - A titulação dos soros pela técnica da lise imune mediada pelo complemento, indicou que os soros de todas as linhagens de animais testadas possuem anticorpos líti-cos.

5 - Camundongos BL apresentaram altas porcentagens de lise em seus soros quan-do comparados aos F₁ e aos BH, principalmente no 20º dia de infecção.

6 - A reinfecção nos camundongos F₁ não causou um aumento nos níveis dos anti-corpos líticos, portanto não se observou uma resposta secundária, diferentemente do que ocorreu com as reações de imunofluorescência.

7 - Tripomastigotas sanguíneos submetidos à reação de lise imune mediada pelo complemento, permanecem infectivos para as 3 linhagens de animais utilizadas. A reação de lise diminuiu a infectividade dos tripomastigotas para o hospedeiro vertebrado, mas não a aboliu completamente.

Os dados apresentados sugerem que as imunoglobulinas detectadas através da reação de imunofluorescência e aquelas detectadas pela lise imune são diferentes. Este fato ficou bem caracterizado através da análise das titulações dos soros de camundongos Biozzi "Maus" respondedores, os quais apresentam altos títulos de anticorpos líticos, e níveis baixos de IgG detectados pelo imunofluorescência. Outra diferença observada foi com relação à resposta secundária, já que as reinfecções não deram origem à um aumento nos níveis dos anticorpos líticos, sendo que através da reação de imunofluorescência, um aumento nos níveis dos anticorpos da classe IgG foi observado.

- 1 - ABRAHAMSOHN, I.A. & DIAS da SILVA, W. (1977) Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity against Trypanosoma cruzi. Parasitol. 75: 317-323.
- 2 - ACHA, P.N. & SZYFRES, B. (1980) Parasitic zoonoses and comunicable diseases common to man and animals. PAHO Publications 354.
- 3 - ALCANTARA, S.G. & BRENER, Z. (1978) The in vitro interation of Trypanosoma cruzi bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. Acta Trop. 35: 209-219.
- 4 - ALMEIDA, M.T.; ALCANTARA, A. & BRENER, Z. (1982) Ultraestructural studies on the in vitro interaction of T. cruzi bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. Acta Trop. 39 (2): 99-109.
- 5 - ANDRADE, S.G.; SILVA, A.A. & ANDRADE, Z. (1976) Bloqueio e estimulação do SRE na Doença de Chagas (Estudo experimental em camundongos). Gaz. Med. Bahia. 67: 19-30.
- 6 - BIOZZI, G.; STIFEEL, C.; MOUTON, D.; BOUTHILLIER, Y. & DECRENSE-FOND, C. (1972) Cytodynamics of the immune response in two lines genetically selected for "high" and "low" antibody synthesis. J. Exp. Med. 135: 1071-1094.
- 7 - BRENER, Z. (1962) Therapeutic activity and criterion of cure on mice infected with Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 4: 389.
- 8 - BRENER, Z. (1965) Comparative studies of different strains of Trypanosoma cruzi. Ann. Trop. Med. Parasitol. 59: 19.
- 9 - BRENER, Z.; KRETTLI, A.U. & ALCANTARA, F.G.A. (1979) Role of the spleen in Chagas' Disease. in: Tropical Diseases Research, Schowabe and Co. A.G. Basel. 1: 121.

- 10 - BRENER, Z. (1980) Immunity to Trypanosoma cruzi. Adv. Parasitol. 18: 245-292.
- 11 - BRENER, Z. (1981) Chagas' Disease. in: Modern Genetic Concepts and Techniques in the studies of parasites. Schowabe and Co. A. G. Basel. 345-363.
- 12 - BRUMPT, L. (1980) Epidemiologie de la maladie de Chagas. Bull. Acad. Nat. Med. 164 (8): 782-785.
- 13 - BUDZKO, D.B.; PIZZIMENTI, M.C. & KIERSZENBAUM, F. (1975) Effects of complement depletion in Experimental Chagas' Disease: Immune lysis of virulent blood forms of Trypanosoma cruzi. Infect. Immun. 11 (1): 86-91.
- 14 - CAMARGO, M.E. (1966) Fluorescent antibody test for the sero - diagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi in a slide test. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 8: 227 - 234.
- 15 - CASTRO-FILHO, J. & SILVEIRA, A.C. (1979) Distribuição da Doença de Chagas no Brasil, Rev. Bras. Malar. D. Trop. 31: 85-98.
- 16 - CERISÓLA, J.A. (1977) Chemoterapy of Chagas' infection in man. in: Chagas' Disease, PAHO Scientific Publications. 347: 35-47.
- 17 - CIAMPI, D.B.; BRAZ, R. & CORSINI, A.C. (1981) Trypanosoma cruzi: Cross protection between CI and Y strains. VIII Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambu. 119.
- 18 - COLLI, W. (1979) Chagas' Disease. in: The Membrane Pathobiology of Tropical Diseases, Schowabe and Co. A. G. Basel. 131-153.

- 19 - COHEN, S. & SADUM, E. (1976) in: Immunology of Parasitic Infections. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 498.
- 20 - CORSINI, A.C.; CLAYTON, C.E.; ASKONAS, B.A. & DLGIVIE, B.M. (1977) Supressor cells and loss of B-cell potential in mice infected with Trypanosoma brucei. Clin. Exp. Immunol. 29: 122-131.
- 21 - CORSINI, A.C.; COSTA, M.G.; OLIVEIRA, O.L.P.; CAMARGO, I.J.B. & STELLINI JR, A. (1980) Susceptibility of inbred mice to Trypanosoma cruzi strain Y. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 22 (4): 192-196.
- 22 - CORSINI, A.C. & STELLINI JR, A. (1981) Immune T-cells control Trypanosoma cruzi infections. Experientia. 37: 904-905.
- 23 - CORSINI, A.C., VILELA, M.S. & PIEDRABUENA, A.E. (1981) Unpaired delayed type hypersensitivity in contrast with humoral suppression to thyphoid vaccine. Tropenmed. Parasitol. 32: 82.
- 24 - CORSINI, A.C.; BRAZ, R.; CIAMPI, D.B. & ZUCATO, M.R.L. (1982) Resistance to Trypanosoma cruzi infection in relation to the timing of IgG humoral response. Z. Parasitenkd. 68: 15-25.
- 25 - CORSINI, A.C. (1982) Immune dysfunction in animals with experimental trypanosomiasis. Afr. J. Clin. Exp. Immunol. 3: 107-118.
- 26 - COSTA, M.G. (1982) Imunossupressão na infecção pelo Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909): I - Efeitos dos extratos de epimastigotas e tripomastigotas sobre a resposta imune em camundongos. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - Departamento de Microbiologia e Imunologia.

- 27 - CULBERTSON, J.T. & KOLODNY, M.H. (1938) Acquired immunity in rats against Trypanosoma cruzi. J. Parasitol. 24: 83-90.
- 28 - CUNNINGHAM, D.S.; CRAIG, W & KUHN, R. (1978) Reduction of complement levels in mice infected with Trypanosoma cruzi. J. Parasitol. 64: 1044-1049.
- 29 - DALMASSO, A.P. & JARVINEN, J.A. (1980) Experimental Chagas' Disease in complement-deficient mice and guinea-pig. Infect. Immun. 28: 434-440.
- 30 - DE-CASPARI, E.N. & ABRAHAMSOHN, I.A. (1983) The effect of acute phase serum transfer on the parasitemia by Trypanosoma cruzi in mice. X Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas.
- 31 - DIAS, J.C.P. & DIAS, R.B. (1982) Housing and the control of vectors of human Chagas' Disease in the state of Minas Gerais, Brasil. PAHO. 16 (2): 117-129.
- 32 - FERNANDES, J.F. & CASTELLANI, D. (1968) Nutrição e crescimento do Trypanosoma cruzi. in: Cançado, J.R. ed. Doença de Chagas. Belo Horizonte, Brasil. Imprensa Oficial de Minas Gerais. 68-86.
- 33 - FIFE JR, E.H. (1971) Advances in methodology for immunodiagnosis of parasitic diseases. Exp. Parasitol. 30 (1): 132-163.
- 34 - FIFE, E.H. (1976) in: Immunology of Parasitic Infections. Cohen, S. & Sadun, E. eds. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 77-93.
- 35 - FREITAS, G.; COSTA, S.C.G. da; PEREIRA, N.M.; QUINTÃO, L.G. & SOUZA, J.G. de (1976) Imunoglobulinas na fase crônica da Doença de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 74: 183-190.

- 36 - GOBLE, F.C. (1951) Studies on experimental Chagas' Disease in mice in relation to chemotherapeutic testing. *J. Parasitol.* 37: 408.
- 37 - GOBLE, F.C. (1970) South American Trypanosomes. in: *Immunity to Parasitic Animals*. eds. Jackson, G.J.; Herman, R. & Singer, I. Appleton-Century-Crofts, Educational Division, Meredith Corporation.
- 38 - GOLDBAUM, M. (1979) Aspectos Sócio:Epidemiológicos da Doença de Chagas. Congresso Internacional sobre Doença de Chagas.
- 39 - GONZALES-CAPPA, S.M.; VATTUONE, N.H.; MENES, S. & SCHMUNIS, G.A. (1973) Humoral antibody response and Ig characterization of the specific agglutinins in rabbits during experimental American Tripanosomiasis. *Exp. Parasitol.* 34: 32-39.
- 40 - GROGL, M. & KUHN, R. (1985) Identification of Antigens of Trypanosoma cruzi which induce antibodies during experimental Chagas' Disease. *J. Parasitol.* 71 (2): 183-191.
- 41 - GUERREIRO, C. & MACHADO, A. (1913) Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento de diagnóstico. *Brasil. Med.* 23: 225-226.
- 42 - HANSON, W.L. (1976) Immunology of American Trypanosomiasis (Chagas' Disease). in: *Immunology of parasitic infections*. Cohen, S. & Sadun, E. eds. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 224-234.
- 43 - HANSON, W.L. (1977) Immune response and mechanisms of resistance in Trypanosoma cruzi. PAHO Scientific Publications. 347: 22-34.

- 44 - HAUSCHKA, T.S. (1947) Sex of host as a factor in Chagas' Disease. J. Parasitol. 33: 399-404.
- 45 - HOARE, C.A. (1972) The trypanosomes of mammals - A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 46 - HOFF, R. (1975) Killing in vitro of Trypanosoma cruzi by macrophages from mice immunized with Trypanosoma cruzi or B.C.G. and absence of cross-immunity on challenge in vivo. J. Exp. Med. 142: 299-311.
- 47 - JAYWARDENA, A.N. & WAKSMAN, B.H. (1977) Suppressor cells in experimental trypanosomiasis. Nature. 265: 359.
- 48 - KAGAN, I.Q. & NORMAN, L. (1961) Immunologic studies on Trypanosoma cruzi.
III - Duration of acquired immunity in mice initially infected with a North American strain of Trypanosoma cruzi. J. Inf. Dis. 108: 213-217.
- 49 - KAGAN, I.Q. & NORMAN, L. (1962) Immunological studies on Trypanosoma cruzi.
IV - Serial transfer of organisms from immune to non immune mice. J. Parasitol. 48: 584-588.
- 50 - KIERSZENBAUM, F.; KNECHT, E.; BUDZKO, D. & PIZZIMENTI, M. (1974) Phagocytosis: a defense mechanism against infection with Trypanosoma cruzi. J. Immunol. 112: 1830-1844.
- 51 - KIERSZENBAUM, F. & HOWARD, J.G. (1976) Mechanisms against Trypanosoma cruzi infections: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. J. Immunol. 116: 1208-1211.

- 52 - KIERSZENBAUM, F.; IVANY, J. & BUDZKO, D.B. (1976) Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infections. Role of complement in avian resistance to Trypanosoma cruzi infections. Immunol. 30: 1.
- 53 - KIERSZENBAUM, F. (1976) Cross-reactivity of lytic antibodies against blood forms of Trypanosoma cruzi. J. Parasitol. 62: 134-138.
- 54 - KIERSZENBAUM, F. & PIENKOWISKI, M.M. (1979) Thymus-dependent control of defense mechanisms against Trypanosoma cruzi infection. Infect. Immun. 24: 117-120.
- 55 - KIERSZENBAUM, F. & HAYES, M.M. (1980) Mechanisms of resistance against experimental Trypanosoma cruzi infection. Requiriments for cellular destruction of circulating forms of Trypanosoma cruzi in human and murine in vitro systems. Immunol. 40: 61-66.
- 56 - KIERSZENBAUM, F. (1980) Protection of congenitally athymic mice against Trypanosoma cruzi infection by passive antibody transfer. J. Parasitol. 66 (4): 675-677.
- 57 - KOLODNY, M.H. (1939) Studies on age resistance against trypanosoma infections. V - The influence of age of the rat upon experimental infection with Trypanosoma cruzi per os. Amer. Jour. Hyg. Sect C. 29 (3): 155-161.
- 58 - KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. (1976) Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections. J. Immunol. 116: 755-760
- 59 - KRETTLI, A.U. (1978) Efeito de anticorpos e do complemento sobre tripomastigotas sanguíneos de camundongos infectados com Trypanosoma cruzi. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Parasitologia.

- 60 - KRETTLI, A.U.; WEIZ-CARRINGTON, P. & NUSSENZWEIG, R.S. (1979) Membrane-bound antibodies of bloodstream Trypanosoma cruzi in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. Clin. Exp. Immunol. 37: 416-423.
- 61 - KRETTLI, A.U.; THOMAS, N. & EISEN, H. (1980) Escapes mechanisms of Trypanosoma cruzi from the host immune system. Cancer. Immunol. Parasite. Immunol. INSERM. 97: 553-558.
- 62 - KRETTLI, A.U. & LIMA-PEREIRA, F.E. (1981) Immunossuppression in protozoal infections. in: Levandowski and Hunter: Biochem. Phys. Protozoa. vol. 4 2^o ed. Academic Press, New York. 431-461.
- 63 - KRETTLI, A.U. (1982) Antibodies to Trypanosoma cruzi in experimental and human infections. Afr. J. Clin. Exp. Immunol. 3: 327-345.
- 64 - KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. (1982) Resistance against Trypanosoma cruzi associated to anti-living tripomastigotes antibodies J. Immunol. 128: 2009-2012.
- 65 - KRETTLI, A.U.; CANÇADO, J.R. & BRENER, Z. (1982) Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas' Disease. Trans. Soc. Trop. Med. Hyg. 76: 334-340.
- 66 - KUHN, R.E.; VAUGHN, R.T. & HERBST, G.A. (1975) The effect of B.C.G. on the course of experimental Chagas' Disease in mice. Int. J. Parasitol. 5: 557-560.
- 67 - LELCHUCK, R.; DALMASSO, A.P.; INGLESINI, C.L.; ALVAREZ, M. & CERISOLA, J.A. (1970) Immunoglobulin studies in serum of patients with American Trypanosomiasis (Chagas' Disease). Clin. Exp. Immunol. 6: 547-555.

- 68 - LOPES, L.R.; PEREIRA, M.E.S.; MORAES, C.; KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. (1984) Anticorpos líticos detectados em líquido pericárdico de chagásicos crônicos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 17: 127 - 131.
- 69 - Mc HARDY, N. (1977) Passive immunization of mice against Trypanosoma cruzi using convalescent mouse serum. Tropenmed. Parasitol. 28: 195-201.
- 70 - MAGNANI, M.A.C.; FERRIOLI, F. & SIQUEIRA, A.F. (1973) Imunoglobulinas específicas em soros de chagásicos crônicos verificadas por reações de imunofluorescência indireta. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 15: 72-75.
- 71 - MIRANDA-SANTOS, I.K.F. & CAMPOS NETO, A. (1981) Receptor for immunoglobulin Fc on pathogenic but not non pathogenic protozoa of the Trypanosomatidae. J. Exp. Med. 154: 1735-1742.
- 72 - MURREL, K.D. (1981) Protective role of immunoglobulin G in immunity to Strongyloides ratti. J. Parasitol. 67(2): 167-173.
- 73 - NOGUEIRA, N.; GORDON, S. & COHN, N. (1977) Trypanosoma cruzi: Modification of macrophage function during infection. J. Exp. Med. 146: 157-171.
- 74 - OKABE, K; KIPNIS, T.L.; GALICH, V.L.G. & DIAS DA SILVA, W. (1980) Cell-mediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi. I - Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity to tripomastigotes bloodstream forms. Clin. Immunol. Immunopathol. 16: 344-353.
- 75 - ORTIZ-ORTIZ, L.; GONZALEZ-MENDOZA, A. & LAMOYI, E. (1975) A vaccination procedure against Trypanosoma cruzi in mice by non specific immunization. J. Immunol. 114: 1224-1225.

- 76 - PERALTA, J.M. (1980) Trypanosoma cruzi antibodies in mice infected with different strains of T. cruzi. J. Parasitol. 66: 342-344.
- 77 - PEREIRA DA SILVA, L.H. & NUSSENZWEIG, V. (1953) Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco. Folia. Clin. e Biol. 20: 191.
- 78 - PEREIRA, M.E.S. & KRETTLI, A.U. (1983) Transferência passiva de imunidade anti- Trypanosoma cruzi com soros de animais repetidamente inoculados com formas sanguíneas do parasita. X Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas.:
- 79 - PINDER, M. (1984) Trypanosoma congolense: Genetic control of resistance to infection in mice. Exp. Parasitol. 57: 185-194.
- 80 - PIZZI, T.; RUBIO, M. & KNIERIM, F. (1954) Immunologia de la enfermedad de Chagas. Bol. Chil. Parasitol. 9: 35-47.
- 81 - RIERA, N.E.; MALBRAN, A.; RITACCO, V.; COSSIO, P.M.; ARANA, R.M. & DE BRACCO, M.M.E. (1980) El sistema complemento en la enfermedad de Chagas cronica. Med. (Buenos Aires) 40: 125-132.
- 82 - ROMEIRO, S.A.; TAKEHARA, H. & MOTA, I. (1984) Isotype of lytic antibodies in serum of Chagas' Disease patients. Clin. Exp. Immunol. 55: 413.
- 83 - ROWE, D.S.; Mc GREGOR, I.A.; SMITH, S.J.; HALL, P. & WILLIAMS, X. (1968) Plasma immunoglobulin concentration in a West African (Gambian) community and in a group of healthy British adults. Clin. Exp. Immunol. 3 (1): 63-79.
- 84 - RUBIO, M. (1956) Actividad litica de sueros normales sobre formas de cultivo y sanguíneas de Trypanosoma cruzi. Bol. Chil. Parasitol. 11: 62-69

- 85 - SANDERSON, C.J.; LOPES, A.F. & BUNN-MORENO, M.M. (1977) Eosinophils and not lymphoid cells kill Trypanosoma cruzi epimastigotes. *Nature*, 268: 340-341.
- 86 - SANDERSON, C.J. & DE SOUZA, W. (1979) A morphologic study of the interaction between Trypanosoma cruzi and rat eosinophils, neutrophils and macrophages "in vitro". *J. Cell. Sci.* 37: 275.
- 87 - SANTOS-BUCH, C.A. & TEIXEIRA, A.R.L. (1974) The immunology of experimental Chagas' Disease. III - Rejection of allogeneic heart cells in vitro. *J. Exp. Med.* 140: 38-53.
- 88 - SEED, J.R. (1977) The role of immunoglobulins in immunity to Trypanosoma brucei gambiensi. *Int. J. Parasitol.* 7: 55-60.
- 89 - SIQUEIRA, M.; BANDIARI, A.; REIS, M.S.; SANT'ANNA, O.A. & BIZZI, G. (1976) Selective breeding of mice for antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of Salmonellae. *Eur. J. Immunol.* 6: 241.
- 90 - STEFANI, M.M.A.; TAKEHARA, H.A. & MOTA, I. (1983) Isotype of antibodies responsible for immune lysis in Trypanosoma cruzi infected mice. *Immunol. Letters.* 7: 91-97.
- 91 - TAKEHARA, H.A.; PERINI, A.; DA SILVA, M.H. & MOTA, I. (1981) Trypanosoma cruzi: Role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exp. Parasitol.* 52: 137-146.
- 92 - TEIXEIRA, A.R.L.; TEIXEIRA, G.; MACEDO, V. & PRATA, A. (1978) Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' Disease. *J. Clin. Invest.* 62: 1132-1141.

- 93 - TRISCHMANN, T.; TANOWITZ, H.; WITTNER, M. & BLOOM, B. (1978) Trypanosoma cruzi: Role of immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. Exp. Parasitol. 45: 160.
- 94 - VATTUONE, N.H.; SZARFMAN, A. & GONZALES-CAPPA, S.M. (1973) Antibody response and immunoglobulins levels in humans with acute or chronic Trypanosoma cruzi infections (Chagas' Disease). J. Trop. Med. Hyg. 76: 45-47.
- 95 - WILLIAMS, D.M.; SAWYER, S. & REMINGTON, J.S. (1976) Role of activated macrophages in resistance of mice to infection with Trypanosoma cruzi. J. Infect. Dis. 134 (6): 610-614.
- 96 - WRIGHSTMAN, R.; KRASSNER, S. & WATSON, J. (1982) Genetic control of responses to Trypanosoma cruzi in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. Infect. Immun. 36 (2): 637-644.