

VANDA APARECIDA GAVINO

"Doença de Chagas - Atividade Protetora dos soros de camundongos infectados com formas tripomastigotas sanguíneas ou de cultura de tecido".

*Este exemplar corresponde a
redação final da Tese defendida pela
aluna Vanda Aparecida Gavino e aprovada pela
Comissão julgadora. 13/12/85.*

Tese apresentada ao
Instituto de Biologia
para a obtenção do
grau de Mestre.

Orientadora: Dária Repka

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Biologia

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Campinas

- 1985 -

G245d

6725/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

"Fôssemos nós como
deveríamos ser e não
haveria em nós neces-
sidade de ilusão".

(Fernando Pessoa)

"À todos que comigo
conviveram durante
a realização deste
trabalho."

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio e carinho, aos amigos pela compreensão e estímulo nos momentos de desânimo.

À Dra. Daria Repka pela amizade e orientação.

A Wirla M.C. Tamashiro e Ajax M. Atta pelo companheirismo e incentivo inicial.

Aos professores Dra. Adenir Perini, Dra. Maria Cristina Barreira, Dra. Júlia K. Sakurada e Dr. Luiz Candido de Souza Dias pela análise do trabalho e sugestões apresentadas.

Aos colegas do curso de pós-graduação pelos momentos e materiais compartilhados.

Aos funcionários, em especial a D. Alzira C. Castro, D. Ismália M. Doné, Dirce L. Gabriel e Lucia Maria C. Gabos pela amizade e auxílios dispensados.

Por fim, aos camundongos que sem opção, perderam suas vidas para tornar possível a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado com recursos fornecidos pela FINEP e Departamento de Micro e Imunologia da UNICAMP.

Durante a realização do mesmo recebi auxílio da CAPES e CNPq.

ÍNDICE

Introdução.....	01
Materiais, e Métodos.....	08
Resultados.....	15
1. Susceptibilidade de camundongos CBA à infecção com formas tripomastigotas sanguícolas ou provenientes de cultura de tecido.....	15
2. Testes de proteção com soros anti-TS ou TC.....	19
3. Atividade protetora dos soros anti-TS da 6ª semana.....	23
4. Especificidade dos anticorpos protetores.....	26
Discussão.....	35
Conclusões.....	49
Bibliografia.....	52

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, que tem por agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* descoberto em 1909 por Carlos Chagas, acomete atualmente mais de 35 milhões de pessoas nas Américas⁽¹²⁾. A principal forma de manutenção desta endemia ainda é realizada pelos triatomíneos, embora ocorram transmissões congênitas^(2,103) e através de transfusões sanguíneas^(2,28,56). Esta doença, a princípio de transmissão intradomiciliar em zonas rurais, transformou-se em um problema urbano com a migração de doentes para os grandes centros⁽⁶⁵⁾, constituindo um dos maiores problemas de saúde pública do nosso país. Confirmando desta forma, o prognóstico feito por Carlos Chagas há mais de 50 anos caracterizou a doença "como uma das infecções tropicais mais maléficas, quer como causa imediata de grande letalidade especialmente das crianças em zonas contaminadas, quer como determinante de uma condição mórbida crônica que inutiliza o indivíduo para a atividade vital, quer finalmente como um fator de degeneração humana⁽⁷⁴⁾."

A doença de Chagas ocorre naturalmente em mais de 100 espécies de mamíferos, de diversas ordens, incluindo-se entre estes os animais domésticos além do próprio homem⁽¹⁰⁾. Os anfíbios e as aves são refratários a ela. Os experimentos realizados por KIERSZENBAUM et alii^(41,45) sugerem que a resistência nas aves estaria relacionada ao sistema complemento.

Estudos realizados em ratos e camundongos indicam que características intrínsecas do indivíduo como fatores genéticos (16,99,104,105), sexo^(6,36), idade^(26,49), etc. interferem no grau de susceptibilidade do animal à infecção pelo *T.cruzi*. Por outro lado, no estabelecimento desta infecção também influem características do protozoário. Os estudos realizados com diversas cepas do *T.cruzi* demonstram que elas apresentam diferenças quanto ao tropismo^(1,62), susceptibilidade à agentes quimioterápicos⁽⁷⁾, constituição antigênica^(10,70,71) e virulência^(1,5,70). Pesquisas recentes utilizando a clonagem do *T. cruzi* demonstram em uma cepa a presença de clones com diferentes características^(3,75,76). Este fato, sugere que uma cepa possa ser constituída por subpopulações do parasito com diferentes atividades biológicas⁽⁸⁾.

A despeito destes conhecimentos, não dispomos até o momento de métodos profiláticos^(9,94,98) ou terapêuticos^(7,10) que possam ser considerados eficientes, bem como de dados para a perfeita/compreensão dos mecanismos envolvidos na patogenia da doença.

Esta infecção caracteriza-se por uma fase aguda onde observa-se altos níveis de parasitos circulantes, a superação desta, leva a fase crônica na qual a detecção do parasito só é possível através de técnicas especializadas⁽¹⁰⁾. A baixa parasitemia, observada nesta fase, está relacionada ao desenvolvimento da resistência específica pelo hospedeiro⁽⁶⁾. No entanto, esta resistência não consegue eliminar o parasito, visto que é possível a detecção do mesmo anos após a infecção⁽⁸⁸⁾.

Este fato sugere que o protozoário desenvolva mecanismos de escape às defesas do organismo. Pesquisas realizadas neste sentido indicam como mecanismos de evasão o "capping" fenômeno no qual o parasito através de uma reorganização de seus anti-

genos retiraria os complexos ag-ac de sua superfície^(48, 55, 90). No entanto, resultados recentes⁽⁵³⁾ sugerem que formas tripomastigotas a semelhança de *Tetraymena pyriformis*⁽²⁹⁾ podem desenvolver o fenômeno da "Fabulação" clivando desta maneira as Igs aderidas a membrana. Outros autores sugerem que constituintes da membrana poderiam inativar a ação do sistema complemento⁽⁴⁶⁾ ou então apresentar características anti-fagocitárias^(66, 67) que permitiriam a evasão do parasito do sistema fagocítico.

Constituintes do parasito poderiam ainda induzir um estado de supressão da resposta imune do hospedeiro, facilitando assim, o escape do parasito. A supressão da resposta à antígenos heterólogos^(21, 22, 23, 24, 77, 78, 95) foi descrita em animais experimentalmente infectados. O mecanismo pelo qual tal fenômeno ocorre não encontra-se ainda esclarecido, tendo sido sugerido atividade depressora de linfócitos T⁽⁷⁸⁾, presença de substâncias supressoras no soro de animais infectados^(22, 23, 95) e a ativação policlonal⁽²⁴⁾.

Entretanto, se por um lado diferentes mecanismos de escape vem sendo sugerido ao parasito, por outro a ocorrência da resistência específica do hospedeiro à Trypanosomíase Americana, foi demonstrada em 1938 por CULBERSTON & KOLODNY⁽²⁵⁾. Estes autores infectando ratos com formas virulentas do *T. cruzi*, verificaram a não recorrência da infecção quando de um desafio com as mesmas.

Este fato levou diversos pesquisadores a investigarem a possibilidade da obtenção da vacina, sendo utilizado nestas pesquisas, parasitos vivos^(25, 27, 38, 63, 69, 93), mortos^(64, 37), extratos antigênicos^(33, 34) ou antígenos purificados^(91, 11). No entanto, uma proteção efetiva não foi ainda observada; os resultados indicam apenas uma diminuição da parasitemia e aumento da sobrevida dos animais imunizados, sugerindo a participação do sistema imuno-

lógico na reação do organismo ao parasito.

Maiores evidências dessa participação vem sendo demonstrada através de experimentos de transferência de imunidade ou imunodepressão.

Os experimentos de imunodepressão foram realizados utilizando-se animais deprimidos pela ação de raio X⁽⁸³⁾, timec-tomia neonatal^(84,89), administração de drogas imunodepressoras ou ainda administração de soros: anti-timócito⁽⁸⁴⁾ ou anti- μ ⁽⁸⁶⁾. Estes animais quando infectados pelo T. cruzi apresentaram níveis elevados de parasitemia e mortalidade. Resultados similares foram obtidos em camundongos "Biozzi" "maus respondedores"⁽⁴⁰⁾ e camundongos atímicos^(43,87) naturalmente deficientes na resposta imune.

A possibilidade de transferir imunidade vem sendo investigada em diferentes experimentos, constatando-se que tanto a transferência de células de animais chagásicos^(13,17,42,79,85,92,100) quanto a transferência de soros imunes^(35,52,59,96) propiciam a diminuição do número de parasitos circulantes e aumento da sobrevivência dos animais infectados pelo T. cruzi.

Se por um lado, não existem dúvidas quanto a participação do sistema imune no controle da infecção, por outro ainda são desconhecidos os determinantes antigênicos que estimulam essa resistência.

A infecção experimental de camundongos vem sendo utilizada como modelo no estudo da Doença de Chagas. Resultados obtidos com diferentes linhagens destes animais, demonstraram haver diferenças quanto a suscetibilidade à esta infecção^(16,99). CORSINI et alli⁽¹⁸⁾ estudando camundongos (CBA x C₅₇ Bl/10)F1 sugerem que a resistência apresentada por essa linhagem, esteja associada à rápida resposta humoral ao parasito. SCOTT⁽⁹¹⁾ trabalhando

com a mesma linhagem de camundongos, verificou que a proteção oferecida pela transferência de células esplênicas, era abolida quando estas células eram depletadas de linfócitos B, o mesmo não ocorrendo quando os linfócitos T eram removidos. Estes resultados, levam o autor a sugerir que a proteção oferecida por camundongos convalescentes da infecção por *T. cruzi* é mediada predominantemente por células B, sendo o envolvimento de células T restrito a função auxiliadora.

Os estudos de imunoproteção realizados com soros obtidos através de infecção experimental em camundongos, demonstraram que os anticorpos protetores estariam presentes na fase crônica da infecção^(51,59). HANSON⁽³⁵⁾ pesquisando a atividade protetora de soros de camundongos CF1, verificou que o soro obtido na 6ª semana de infecção apresentava maior capacidade protetora, assim como, maior concentração de γ -globulina. TAKEHARA et alli⁽⁹⁶⁾ demonstrou que esta capacidade estava presente nas sub-classes IgG_{2a} e IgG_{2b} dos soros de camundongos A/Sn.

/ Apesar do conhecimento da classe e sub-classe das imunoglobulinas envolvidas na proteção, não encontra-se esclarecida a especificidade e a forma de ação das mesmas.

Neste sentido, resultados de diferentes autores tem demonstrado que células humanas e/ou de camundongos como eosinófilos⁽⁴⁴⁾, neutrófilos⁽⁵⁸⁾ ou ambos^(46,72), seriam citotóxicos ao parasito na presença de anticorpos.

Resultados de KRETTLI e BRENER⁽⁵²⁾ mostraram que os soros da fase crônica exerciam uma atividade lítica sobre as formas tripomastigotas. Por outro lado, ZINGALEZ et alli⁽¹⁰⁶⁾ sugerem que estes soros atuariam inibindo determinantes antigênicos envolvidos no processo de reconhecimento e interiorização das mesmas formas. Estes resultados, sugerem que provavelmente os

anticorpos protetores seriam dirigidos contra formas tripomastigotas.

No entanto, pesquisas de imunização com extratos antigênicos de formas epimastigotas, demonstram que os anticorpos protetores podem ser induzidos por determinantes antigênicos presentes nas formas epimastigotas^(60,37).

A demonstração da existência de antígenos comuns as diferentes formas evolutivas do parasito^(47,81,82), não permitem a exclusão da possibilidade dos mesmos serem dirigidos contra determinantes antigênicos presentes nas demais formas evolutivas do parasito.

Portanto, para uma maior compreensão e por conseguinte melhor manipulação do sistema imune, quer seja no sentido de imunoproliferação ou de evitar fenômenos imunopatológicos^(19,54,97), torna-se necessária a investigação da especificidade dos anticorpos protetores.

Em vista dos conhecimentos expostos até o presente, pretendemos investigar a atividade protetora e a especificidade de soros de camundongos, em fase crônica, infectados experimentalmente com baixo número de parasito (cepa Y).

Como foram descritas⁽¹⁰²⁾ alterações biológicas de formas tripomastigotas quando mantidas em culturas celulares, no presente trabalho investigaremos a atividade protetora de soros de camundongos infectados com formas tripomastigotas mantidas em culturas de células ou com formas mantidas por repiques sucessivos em camundongos.

Baseados na sugestão⁽¹⁸⁾, de que a resistência apresentada pela linhagem (CBA x C₅₇B1₁₀/j)F1 está associada à uma rápida resposta humoral ao T. cruzi, utilizaremos esta linhagem na obtenção de soros. A atividade protetora destes soros, será in-

vestigada através de experimentos de transferência passiva para camundongos "sensíveis" (CBA) à esta cepa.

Como parâmetros de avaliação serão verificados os níveis parasitêmicos e a mortalidade destes animais. A especificidade dos soros protetores será investigada através da absorção dos mesmos, com as diferentes formas evolutivas do parasito.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais - Foram utilizados camundongos (♀ e ♂) das linhagens Swiss-55, CBA e F1 (CBA x C₅₇Bl₁₀/j) com 3 meses de idade, provenientes do Biotério Central da UNICAMP - SP - Brasil.
2. Trypanosoma cruzi - A cepa Y⁽⁷³⁾ inicialmente cedida pelo Dr. Zigman Brener da Universidade Federal de Minas Gerais - M.G. - Brasil, vem sendo mantida em nossos laboratórios através de passagens sucessivas em camundongos Swiss-55, em meio líquido e/ou em cultura de tecido.
3. Células HeLa - Células de carcinoma uterino humano, cedidas pela Dra. Edda de Rizzo do Instituto Butantã - São Paulo, foram cultivadas a 37°C em meio R.P.M.I. 1640 adicionado de 10% de soro de vitelo; sendo seu subcultivo realizado seguindo-se as indicações de TUCHYA et alli⁽¹⁰¹⁾.
4. Cultura do T. cruzi em células HeLa - As culturas de células HeLa foram inicialmente infectadas com formas tripomastigotas sanguícolas, obtidas de camundongos infectados com 10⁵ parasitas e sangrados assepticamente, através de punção cardíaca, no pico parasitêmico. O sangue coletado foi deixado à coagular, em tubos mantidos inclinados, durante 1 hora à temperatura ambiente. O soro resultante, rico em formas tripomastigotas, foi utilizado na infecção das culturas que em seguida, pas

savam a ser mantidas a temperatura de 32,5°C segundo indicações de KREIER et alli⁽⁵⁰⁾. O meio R.P.M.I. 1640 adicionado de 10% de soro de vitelo, foi empregado na manutenção das células, processando-se a troca do mesmo a cada 3 ou 4 dias. As infecções posteriores, para novas culturas, foram realizadas através de repiques sucessivos do sobrenadante de culturas ricas em formas tripomastigotas.

5. Obtenção das diferentes formas evolutivas do T. cruzi.

5a) Formas epimastigotas - Obtidas de culturas mantidas durante 7 dias à 28°C em meio Liver Infusion Tryptose (LIT) segundo indicações de FERNANDES & CASTELLANI⁽³⁰⁾, após este período eram lavadas 3x em solução fisiológica gelada à 1465g por 15 minutos à 4°C e tratadas segundo as necessidades.

5b) Formas tripomastigotas sanguícolas (TS) - Camundongos CBA infectados i.p. com 10^5 formas de T. cruzi foram sangrados através do plexo vascular braquial 7 dias após a infecção. O sangue colhido em solução estéril de Citrato de Sódio 3,8% e centrifugado a 365 g à 4°C durante 15 minutos e a seguir mantido a temperatura ambiente durante 30 minutos. Após este período o sobrenadante era cuidadosamente retirado e submetido a nova centrifugação a 1465g, 15', 4°C. O sedimento obtido era lavado 2x em NaCl 0,15M pH:7,0 durante 15' a 4°C tratado segundo as necessidades.

5c) Formas tripomastigotas de cultura (TC) - O sobrenadante de cultura de células HeLa, infectados ao menos há duas semanas, era colhido em tubos cônicos e centrifugado durante 10' a 365g

na temperatura de 4°C seguindo-se um período de repouso de 30' a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante era colhido e centrifugado por 10' a 1465 g o sedimento resultante, rico em formas tripomastigotas, era então, lavado 2x em NaCl 0,15M pH:7,0 por 15' a temperatura de 4°C e tratado conforme as necessidades.

5d) Formas amastigotas - Eram provenientes de culturas de células HeLa infectadas com formas tripomastigotas e mantidas a atmosfera de 5% CO₂. O processo de obtenção das formas era similar ao utilizado para as formas tripomastigotas até o repouso de 30' a temperatura ambiente. Após este período dispensava-se o sobrenadante, sendo o sedimento constituído principalmente por formas amastigotas, lavados 2x em NaCl 0,15M pH:7,0 a 1465 g por 10' a 4°C.

As diferentes formas do parasito quando necessário, eram tratadas com formol a 2% (V/V) por 10' a temperatura ambiente. Após o tratamento o excesso de formol era retirado através de lavagens em NaCl 0,15M pH:7,0 (3x, 1020 g, 15' a 4°C).

6. Soros

6a) Soros anti-T. cruzi - Os soros anti-T. cruzi foram obtidos de diferentes lotes de camundongos (CBA x C₅₇Bl₁₀/j)F₁ infectados intra-peritonealmente com 10² formas tripomastigotas sanguícola (520 animais) ou com formas tripomastigotas provenientes de cultura de tecido (300 animais). A infecção nos animais foi constatada através de pesquisa de parasitos no sangue perifé-

rico. Após 4, 6 e 8 semanas de infecção lotes destes camundongos foram sangrados através do plexo vascular braquial e o sangue deixado a coagular por 30 minutos a 37°C, em seguida centrifugado durante 15 minutos a 1465 g temperatura de 4°C. Os soros obtidos foram divididos em alíquotas de $\pm$ 5ml, rotulados como soro anti-TS (formas tripomastigotas sanguícolas) ou soro anti-TC (tripomastigotas de cultura), liofilizados e armazenados a 4°C até o momento do uso.

- 6b) Soro normal - Provenientes de 400 camundongos (CBA x C₅₇B1₁₀/j)F1, mantidos e sangrados nas mesmas condições que os animais infectados. Sendo o soro obtido e estocado por processo similar ao utilizado para os soros anti-T. cruzi.

7. Absorção de soros

Os soros anti-T. cruzi ressuspensos no seu volume original, após a inativação à 56°C por 30 minutos, foram absorvidos com as diferentes formas evolutivas do T. cruzi obtidas como descrito anteriormente. Nas absorções foram empregadas 4×10^8 formas epimastigotas, 4×10^6 formas tripomastigotas (TS ou TC) ou 22×10^6 formas amastigotas por ml de soro, tolerando-se uma contaminação máxima de 1×10^6 formas (tripo ou amastigotas) nas suspensões obtidas do sobrenadante de cultura de tecido. Após as absorções realizadas em condições descritas abaixo, os soros tiveram sua reatividade as diferentes formas testadas através da técnica de imunofluorescência e foram armazenados a -20°C até o momento do uso.

- 7a) Absorção com formas vivas do T. cruzi - As absorções com formas epimastigotas, tripomastigotas (TC ou TS) ou amastigotas

processaram-se durante 1 hora em banho de gelo e 1 hora a temperatura ambiente. Após este período as suspensões foram centrifugadas durante 15' a 1465 g, o soro colhido, congelado e descongelado por 3x consecutivas e a pesquisa de formas íntegras realizada através de observação microscópica. Estes soros foram armazenados nas mesmas condições que os anteriores.

- 7b) Absorção com formas mortas do T. cruzi - Foram realizadas absorções utilizando-se formas tripomastigotas sanguícolas tratadas com formol a 2% ou congelada e descongeladas por 3x consecutivas, sendo neste caso, a pesquisa de formas íntegras realizada por observação microscópica. As condições empregadas nas absorções foram similares as utilizadas para as absorções com formas vivas.

As absorções com formas epimastigotas lisadas (EBTC) obtidas segundo indicações de REPKA et alli⁽⁸⁰⁾ foram realizadas utilizando-se alíquotas de 20 μ g (4×10^8 parasitos) ou 100 μ g as quais foram adicionadas a 1 ml de soro e deixadas durante 1 hora a temperatura ambiente e 1 hora a 0°C. Após este período a mistura foi centrifugada 15 minutos a 4080 g e o soro colhido e armazenado.

8. Reações de Imunofluorescência - As reações de imunofluorescência foram realizadas segundo CAMARGO⁽¹⁵⁾ utilizando-se como antígeno as diferentes formas evolutivas do parasito tratadas pelo formol como descrito anteriormente. Empregou-se como conjugado o soro de Coelho anti-Ig de camundongo, gentilmente cedido pela Dra. Júlia K. Sakurada, que foi conjugado a fluoresceína através da técnica de adição lenta de fluorocromo⁽¹⁵⁾.

9. Parasitemia - Foi acompanhada do 4º ao 9º dia de infecção, sendo a determinação do número de parasitos circulantes realizada através do método indicado por BRENER⁽⁴⁾.
10. Teste de susceptibilidade de camundongos CBA ao T. cruzi - Lotes de 10 camundongos CBA receberam por via intra-peritoneal, diferentes inóculos (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 ou 10^5) de formas tripomastigotas sanguícolas ou provenientes de cultura de células. A infecção destes animais foi detectada pela pesquisa de parasitos circulantes e a sobrevida acompanhada até o 30º dia após a infecção.
11. Teste de virulência das formas tripomastigotas de cultura
A virulência de formas tripomastigotas obtidas após 1, 3 ou 5 semanas de manutenção em cultura de células, foi investigada através da infecção de camundongos CBA (lotes de 10 animais) com 10^5 formas. A parasitemia dos animais foi acompanhada do 4º ao 9º dia de infecção e a mortalidade durante 30 dias. Como controle dos experimentos, foram utilizados animais inoculados com formas tripomastigotas mantidas unicamente por passagens em camundongos.
12. Investigação de alterações da virulência de formas TC pela passagem "in vivo" - Camundongos CBA (10 animais) infectados com 10^5 formas TC, foram sangrados no pico parasitêmico (7º dia) através do plexo vascular braquial e o sangue coletado em solução estéril de citrato de sódio 3,8%. Após a contagem de parasitos, inóculos de 10^5 formas tripomastigotas foram utilizados na infecção de camundongos CBA (lotes de 10 animais). A parasitemia destes animais foi acompanhada do 4º ao

9º dia e a mortalidade verificada diariamente até 30 dias após a infecção.

Como controle nestes experimentos foram utilizados:

- camundongos inoculados com formas tripomastigotas mantidas unicamente por passagem em camundongos;
- camundongos inoculados com formas mantidas em cultura de células HeLa.

13. Imunização passiva - Lotes de camundongos CBA (5 animais) foram inoculados com 0,25ml de soro anti-T. cruzi ou Normal através do plexo retro orbital. Decorrida uma hora os animais foram infectados i.p. com 10^5 formas sanguíneas do T. cruzi. A parasitemia destes animais, foi acompanhada do 4º dia ao 9º dia e a mortalidade, verificada diariamente durante 30 dias. Após este período de observação, os sobreviventes foram sacrificados.
14. Análise Estatística - A análise dos picos parasitêmicos dos animais infectados com T. cruzi foi realizada empregando-se o teste "Student t" como descrito por FISHER⁽³¹⁾.

RESULTADOS

1. Suscetibilidade de camundongos CBA à infecção com formas tripomastigotas sanguícolas ou provenientes de cultura de tecido.

Com a finalidade de comparar a suscetibilidade dos camundongos CBA às formas tripomastigotas sanguícolas (TS) e as provenientes de cultura de células (TC), lotes de camundongos, divididos em 2 experimentos, receberam diferentes inóculos do parasito (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 ou 10^5). A infecção em todos os animais foi detectada e a sobrevivência acompanhada durante 30 dias.

Os resultados obtidos acham-se apresentados na Figura 1, onde verifica-se que enquanto os animais infectados com 10^5 formas TS (Fig. 1A) não sobreviveram ao 12º dia, os infectados com igual número de formas provenientes de cultura de tecido apresentaram 70% de sobreviventes no 30º dia após a infecção.

Os lotes de animais que receberam inóculos inferiores (10^1 ou 10^2) de TS apresentaram no 30º dia respectivamente, 60 e 40% de sobreviventes. Enquanto 100% dos animais que receberam inóculos similares de formas tripomastigotas provenientes de cultura sobreviveram ao 30º dia de infecção.

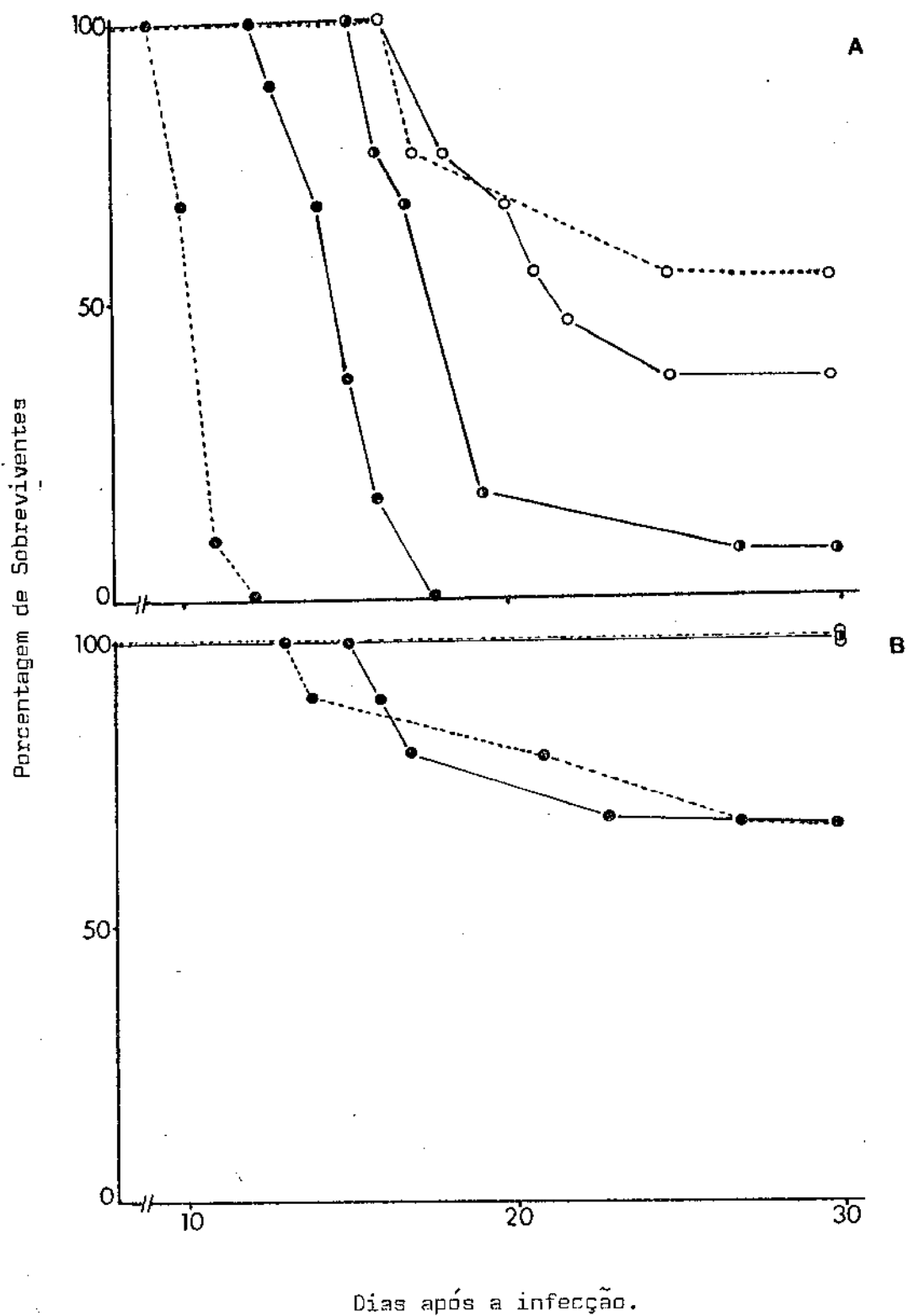


Figura 1 - Sobrevida de camundongos CBA (lotes de 10 animais) infectados com formas tripomastigotas sanguíneas (A) ou provenientes de cultura de tecido (B).

Legenda:

10^1 (o-----o), 10^2 (o—o), 10^3 (o—o), 10^4 (•—•)
ou 10^5 (•-----•) parasitos/animal.

A parasitemia dos animais inoculados com 10^5 formas tripomastigotas sanguícolas ou de cultura, foi acompanhada do 4º ao 9º dia de infecção não observando-se entretanto, diferenças significativas quanto aos níveis de parasitos circulantes (Fig. 2).

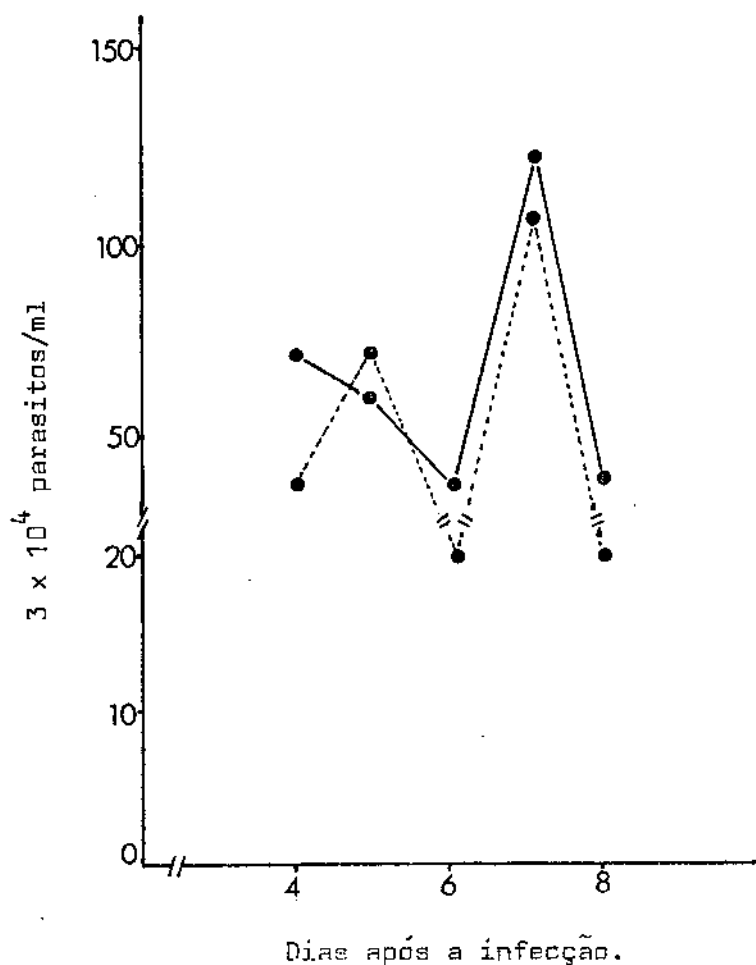


Figura 2 - Média dos níveis parasitêmicos apresentados por camundongos CBA (lotes de 10 animais) infectados com 10^5 formas tripomastigotas.

Legenda:

- (●—●) tripomastigotas sanguícolas
- (●- - -●) tripomastigotas de cultura de células

A partir destes resultados procurou-se investigar se formas TC mantidas por repiques sucessivos durante diferentes períodos de tempo apresentavam a mesma virulência (índice mortalidade). Para isso lotes de camundongos foram inoculados com 10^5 formas TC obtidas após 1, 3 ou 5 semanas de cultivo. Os resultados obtidos não indicaram diferenças significativas na virulência das for-

mas TC obtidas nestes períodos. Os resultados obtidos foram similares aos apresentados na Fig. 1B.

O acompanhamento dos níveis parasitêmicos nestes animais, também não indicaram diferenças significativas em relação aos apresentados na Fig. 2.

Com a finalidade de investigar se a baixa virulência das formas TC era alterada pela passagem "in vivo", lotes de 10 camundongos CBA foram inoculados com 10^5 TC, sangrados no pico parasitêmico e o sangue (10^5 formas) utilizado na infecção de 10 novos animais. Como controle foram utilizados lotes de 10 camundongos inoculados com o mesmo número de formas sanguícolas obtidas unicamente por passagem em camundongos. Os resultados mostraram níveis parasitêmicos e mortalidade semelhantes aos obtidos no grupo controle, onde nenhum animal sobreviveu ao 12º dia de infecção.

A partir destes resultados foi padronizado como 10^5 formas tripomastigotas sanguícolas, mantidas unicamente por passagens em camundongos como o inóculo a ser utilizado nos testes subsequentes de proteção.

2. Testes de proteção com soros anti - TS ou TC

A investigação da capacidade protetora dos soros anti-TS ou anti-TC da 4ª, 6ª e 8ª semana provenientes de camundongos F1, foi realizada através da transferência passiva destes soros à lotes de camundongos CBA divididos em 3 experimentos. A capacidade protetora, foi avaliada pela proporção de sobreviventes. Como controle foram utilizados animais transfundidos com soro normal.

A sobrevida dos animais tratados com os diferentes soros acha-se expressa na Fig. 3, onde pode-se verificar que os animais controles não sobreviveram além do 11º dia de infecção (Fig. 3 A, B e C).

Os lotes de animais que receberam os soros anti-TS e anti-TC da 4ª semana de infecção (Fig. 3C) apresentaram % de sobrevida similares entre si, exibindo índices em torno de 10% ao final de 30 dias de observação. Também foram observados resultados similares entre os soros anti-TS e TC da 8ª semana, porém os animais tratados com estes soros não sobreviveram ao 25º dia de infecção (Fig. 3A).

Diferenças significativas entre os soros anti-TS e anti-TC foram encontradas nos soros obtidos na 6ª semana de infecção (Fig. 3B). Enquanto 40% dos animais tratados com anti-TS sobreviveram ao final dos experimentos, nenhum animal tratado com o soro anti-TC sobreviveu ao 15º dia.

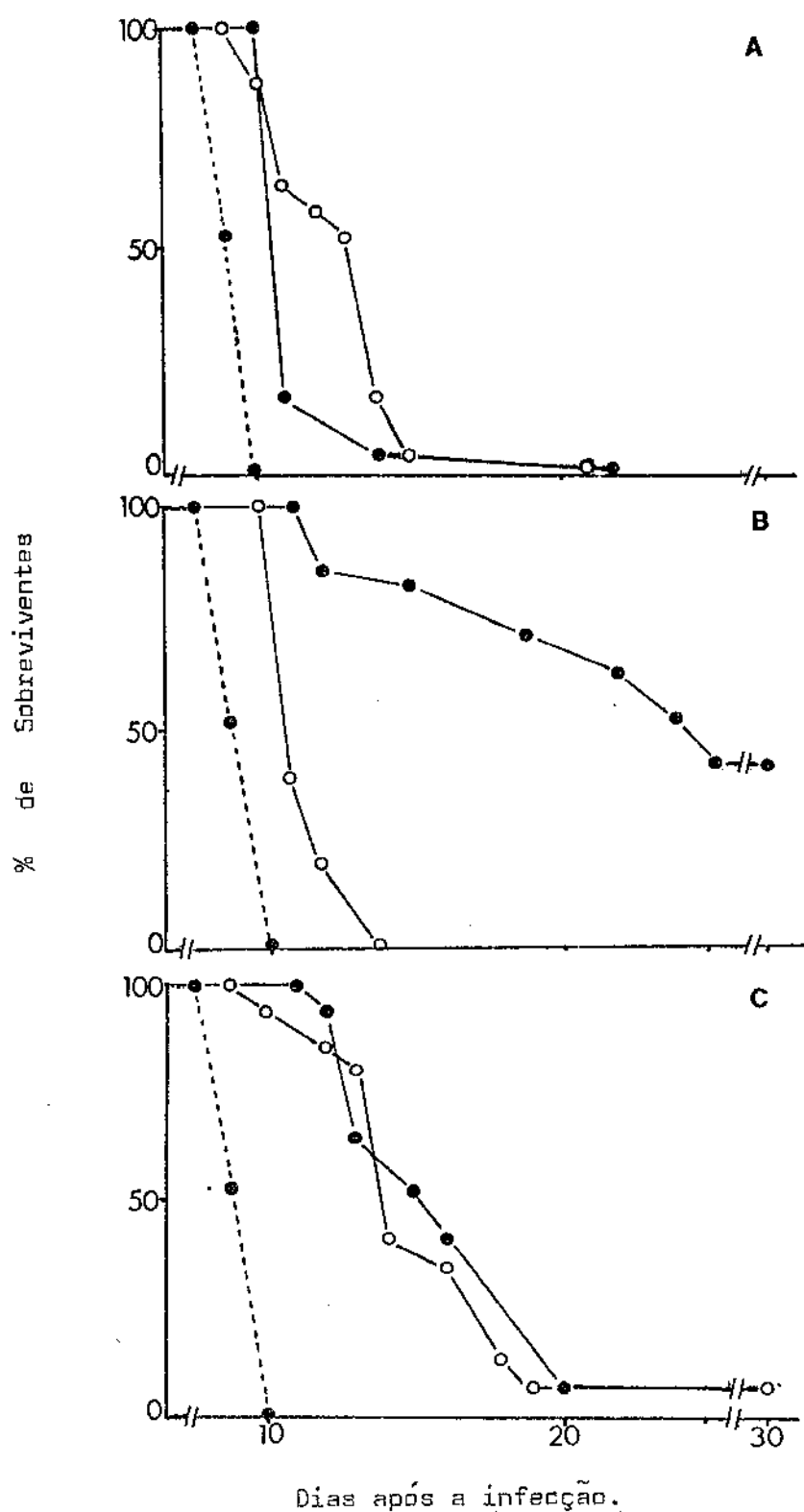


Figura 3: Sobrevida de camundongos CBA (lotes de 15 animais) tratados com 0,25 ml de soro normal, anti-TS ou anti-TC de diferentes períodos, 8^ª (A), 6^ª (B) ou 4^ª (C) semana de infecção. - Após 1 hora, infectados com 10^5 formas sanguícolas.

Legenda:

- (●-----●) Soro normal
- (●——●) Soro anti-TS
- (○——○) Soro anti-TC

Os animais em experimentação tiveram sua parasitemia acompanhada do 4º ao 9º dia de infecção (Fig. 4). Diferenças significativas ($< 0,001$) foram verificadas nos picos de parasitemia dos lotes de animais tratados com os soros anti-TS e anti-TC. Enquanto os primeiros exibiam baixos níveis de parasitos circulantes, os tratados com os soros anti-TC da 4ª, 6ª e 8ª semanas apresentaram índices similares aos encontrados nos grupos controles (Fig. 4 A, B e C).

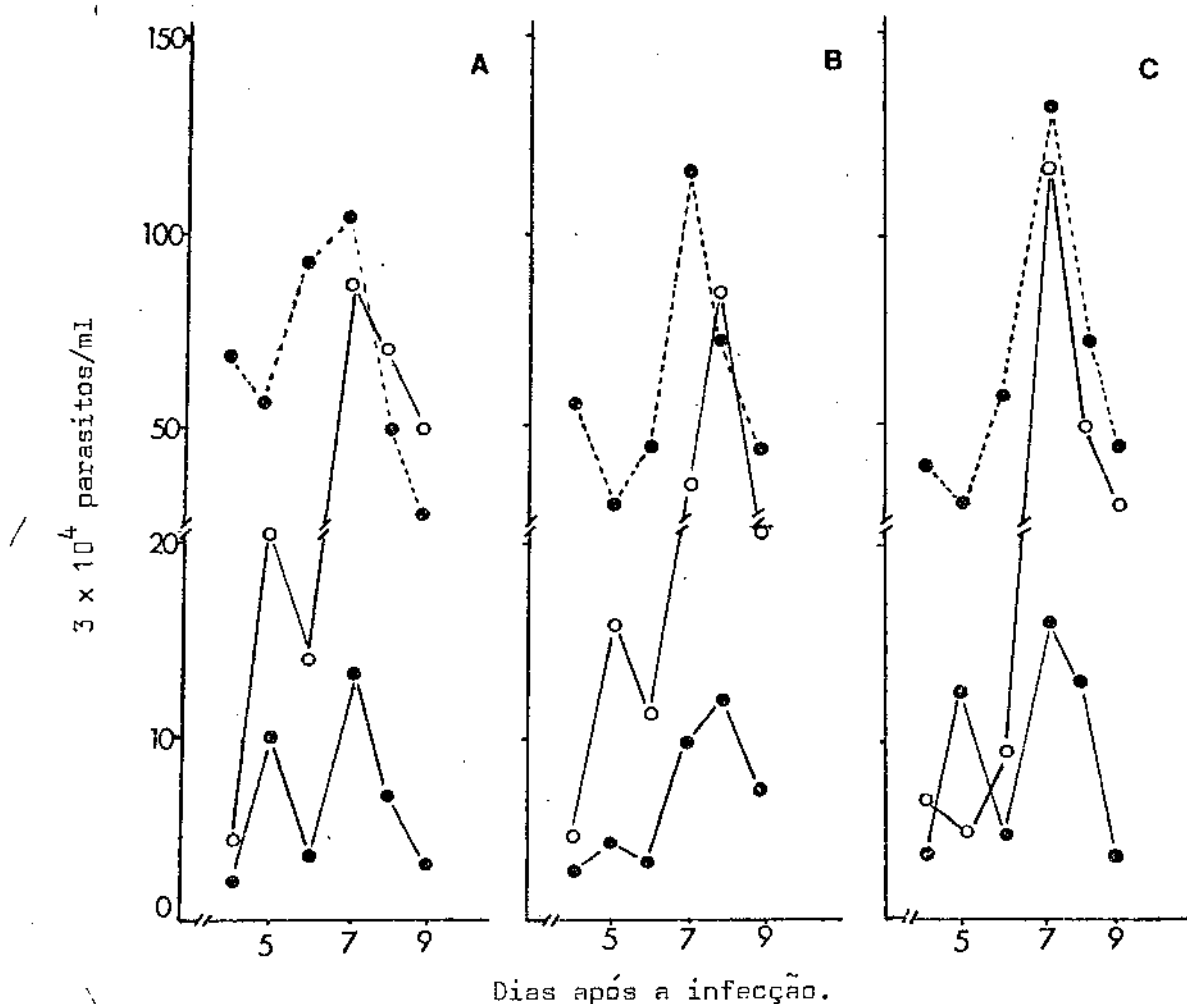


Figura 4: Média Parasitêmica de camundongos CBA (lotes de 15 animais) transfundidos com 0,25 ml de soro normal, anti-TS ou anti-TC da 4ª (A), 6ª (B) ou 8ª (C) semana e infectados 1 hora após com 10^5 formas TS.

Legenda:

- (●---●) Soro normal
- (●—●) Soro anti-TS
- (○—○) Soro anti-TC

Os resultados apresentados na Figura 4, indicam que os soros anti-TS da 4ª, 6ª e 8ª semana controlam de maneira similar os níveis de parasitos circulantes.

Nas figuras 3 e 4 verificamos que os camundongos tratados com soro anti-TS da 6ª semana além de apresentarem baixos níveis de parasitos, apresentavam índices de sobrevivência superiores aos observados nos lotes tratados com os demais soros. Testes de proteção variando-se a dose deste soro não indicaram diferenças significativas entre 0,2 e 0,25 ml. Com a dose de 0,1 ml nenhum animal sobreviveu ao 15º dia de infecção, padronizando-se 0,25 ml a dose a ser utilizada nos testes subsequentes.

3. Atividade protetora do soro anti - TS da 6ª semana.

Os resultados acumulados ao longo dos experimentos de proteção com o soro anti-TS da 6ª semana (180 animais) e com o soro normal (170 animais) encontram-se expressos na Figura 5. Nesta figura, verificamos que os animais controles não sobrevivem além do 13º dia ocorrendo um maior número de mortes no 10º dia de infecção. Os animais tratados com soro anti-TS da 6ª semana apresentaram uma distribuição de mortalidade entre o 9º e 26º dia após a infecção, havendo ao final do período de observação um índice de 50% de mortalidade.

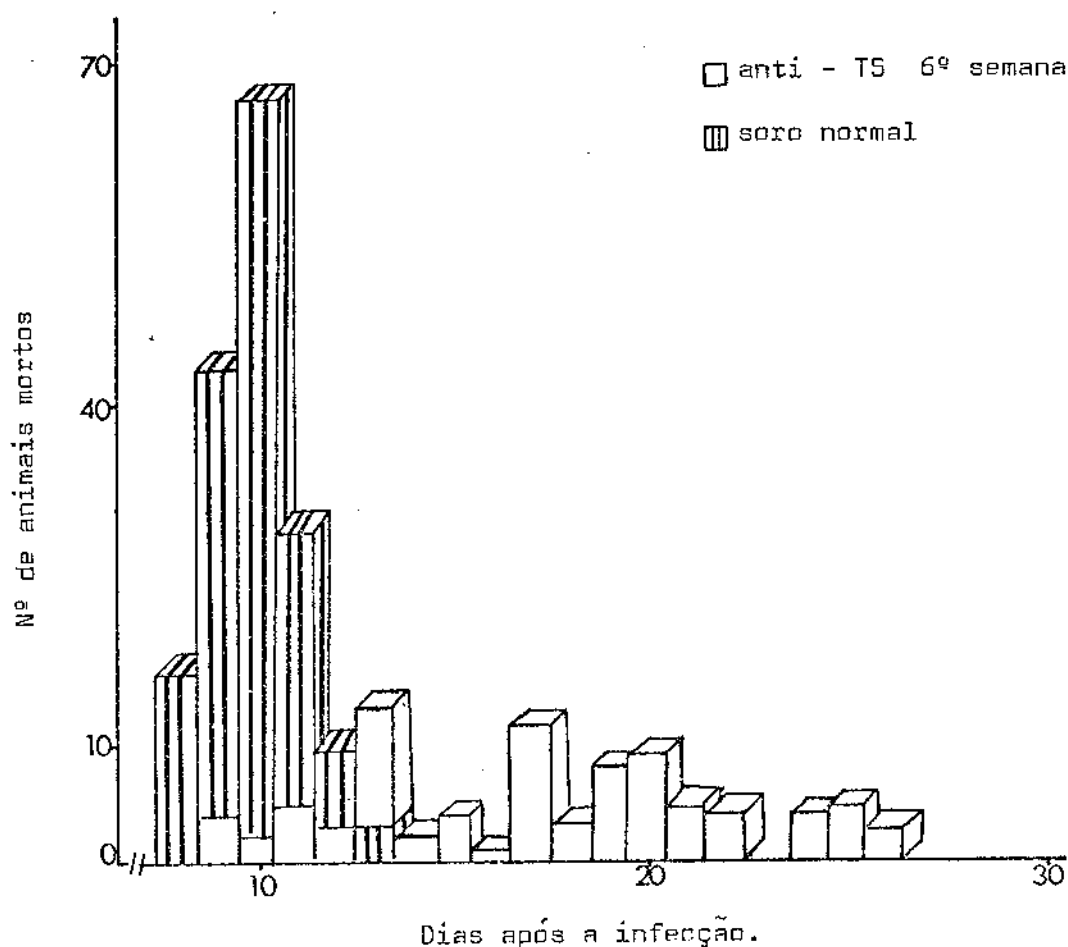


Figura 5 - Distribuição da mortalidade de camundongos CBA tratados como soro anti-TS da 6ª semana (180 animais) ou com soro normal (170 animais) e infectados com 10^5 formas TS.

O índice de mortalidade apresentado pelos animais tratados como soro anti-TS da 6ª semana e infectados com 10^5 formas TS foi no 30º dia, similar ao observado nos lotes de animais não tratados e inoculados com 10^2 formas TS (Fig. 1A).

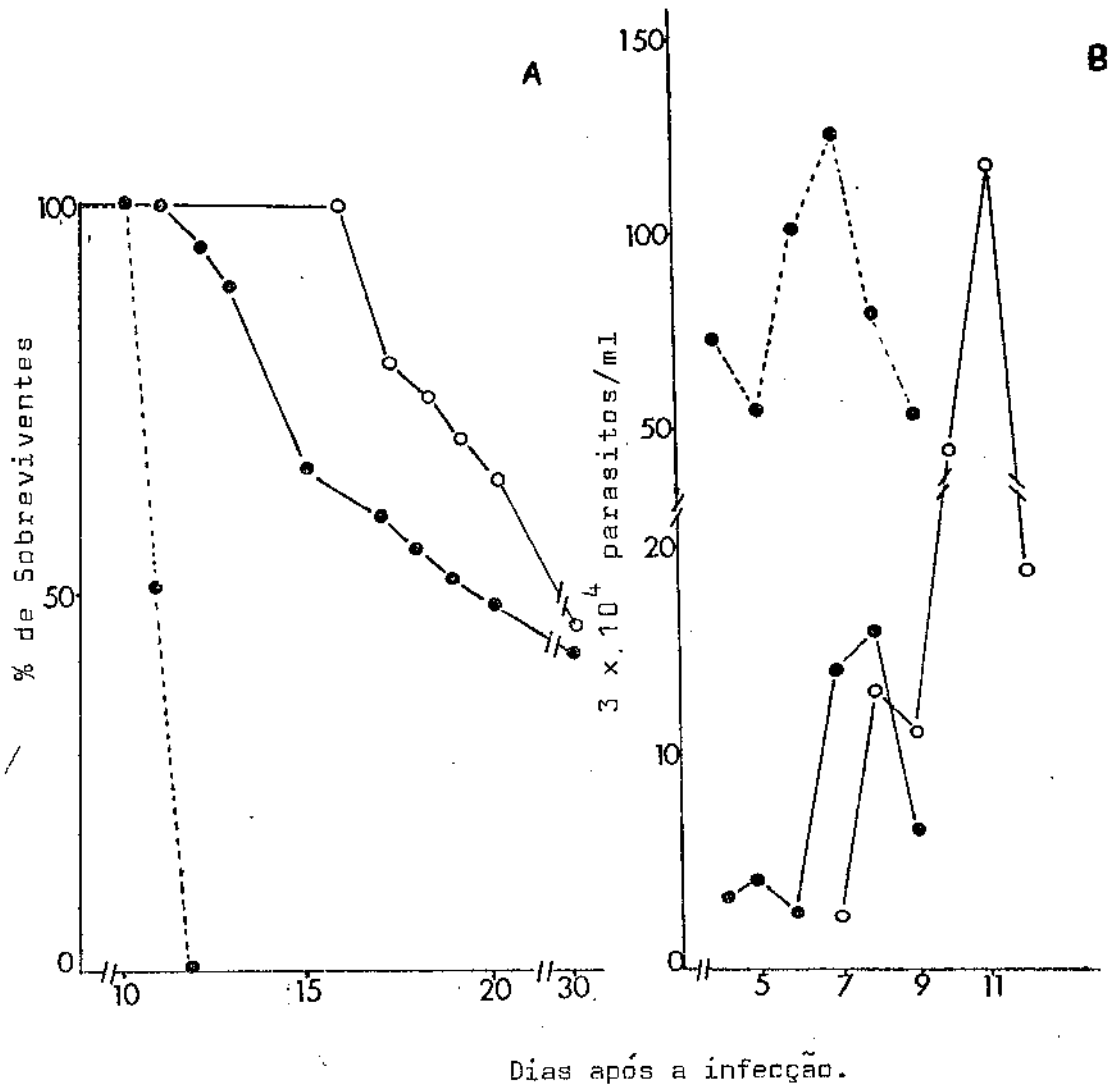


Figura 6: Sobrevida (A) e Média Parasitêmica (B) de camundongos CBA (lotes de 15 animais) infectados com 10^2 tripomastigotas sanguícola ou tratados como soro normal ou soro anti-TS da 6ª semana e após 1 hora infectados com 10^5 TS.

Legenda:
 (●- - - ●) Soro normal
 (●- - ●) Soro anti-TS
 (○- - ○) Inoculados com 10^2 TS.

Lotes de camundongos inoculados nas mesmas condições tiveram sua parasitemia acompanhada. Os resultados apresentados na Figura 6B mostram diferenças significativas na parasitemia dos animais não tratados e inoculados com 10^2 formas sanguícolas e os tratados e infectados com 10^5 formas TS. Enquanto os primeiros apresentaram altos níveis de parasitos circulantes e um pico parasitêmico no 11º dia, os tratados com soro anti-TS da 6ª semana apresentaram baixa parasitemia e o pico no 8º dia após a infecção. A mortalidade destes animais foi acompanhada e os resultados acham-se expressos na Figura 6A, onde pode-se observar que no 30º dia de infecção a porcentagem de sobreviventes nos dois lotes era similar, embora a distribuição da mortalidade ao longo do período de observação fosse diferente.

4. Especificidade dos anticorpos protetores

A especificidade dos anticorpos protetores foi investigada através da transferência passiva de soro anti-TS da 6ª semana absorvidos com as diferentes formas evolutivas do parasito. A reatividade dos soros absorvidos para as diferentes formas foi testado através da técnica de Imunofluorescência Indireta.

Os resultados expressos na Tabela I indicaram que o soro anti-TS não absorvido reagia com as 3 formas do parasito, apresentando maiores títulos para as formas amastigotas e os menores para as formas epimastigotas. Após a absorção com formas epimastigotas vivas ou lisadas não houve uma alteração significativa dos títulos para formas tripo e amastigotas. Absorções com formas tripomastigotas apresentaram reações negativas para formas epimastigotas, porém, não alteraram os títulos para as formas amastigotas. Os soros absorvidos com formas amastigotas mostraram diminuição no título para as formas tripo e reações negativas para as formas epimastigotas.

Os testes de proteção com os soros absorvidos foram realizados em lotes de 10 ou 15 animais divididos em 2 ou 3 experimentos. Como controle destes, foram empregados igual número de animais tratados com soro normal (CN) e tratados com soro anti-TS da 6ª semana não absorvido (CI).

A Figura 7 corresponde à percentagem de animais sobreviventes nos testes de proteção realizados com o soro absorvido com formas epimastigotas vivas e lisadas. Pode-se observar nesta figura, que a absorção com formas íntegras ou lisadas (20 µg/ml) apresentaram resultados similares. Menor proteção no entanto, foi

TABELA 1

Reações de Imunofluorescência Indireta com o soro anti-TS da 6ª semana absorvido com as diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*.

Soro anti-TS 6ª semana	Antígeno		
	epimastigotas	amastigotas	tripomastigotas
não absorvido	1:40	1:640	1:80
abs. epimastigotas	-	1:320	1:40
abs. EBTC	-	1:320	1:40
abs. amastigotas	-	-	1:20
abs. tripomastigotas	-	1:320	-
Controle S.N /	-	-	-

Utilizou-se diluição do soro acima de 1:10.

observada nos lotes de animais tratados com soros absorvidos com 100 μ g de EBTC.

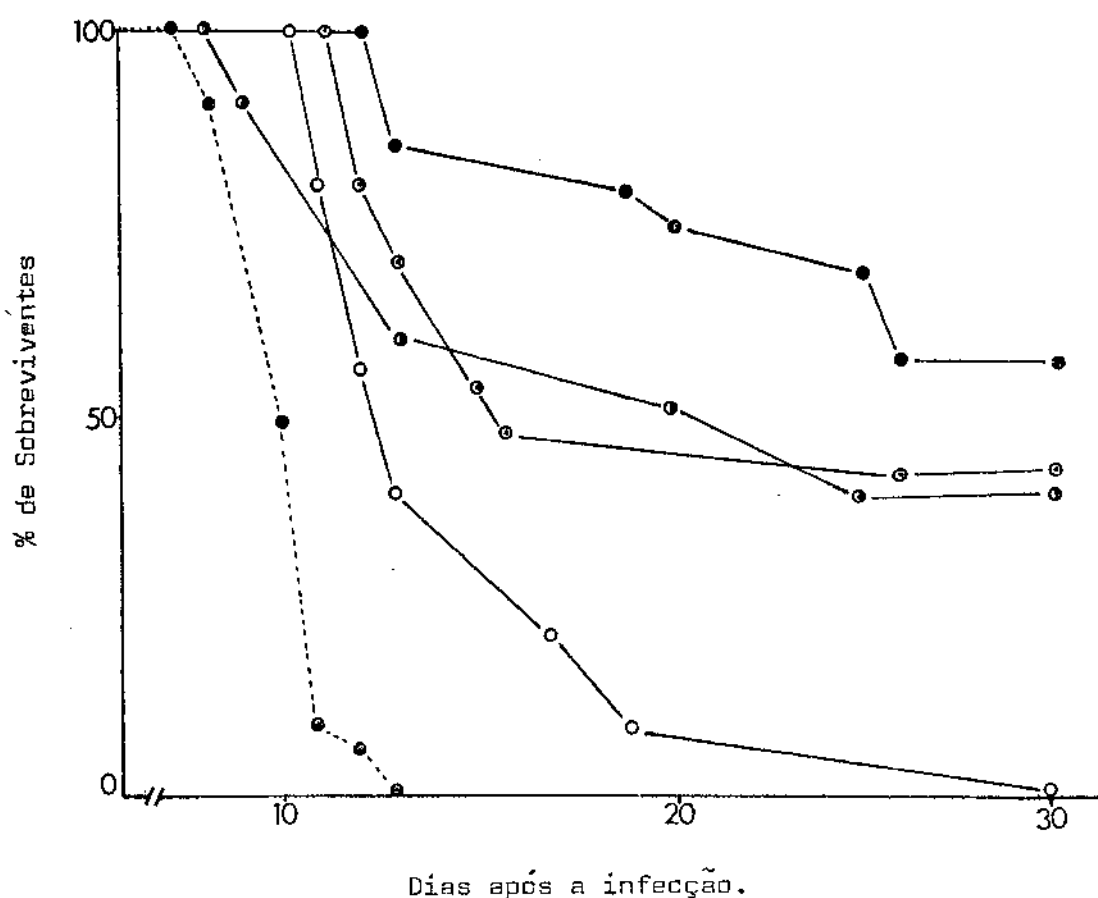


Figura 7: Sobrevivência de camundongos CBA (lotes de 10 ou 15 animais) transfundidos com soro normal, soro anti-TS 6ª semana não absorvido, ou absorvido com formas epimastigotas íntegras ou lisadas e infectados após 1 hora com 10^5 formas TS.

Legenda:

- (●---●) soro normal
- (●—●) soro anti-TS não absorvido
- (○—○) soro anti-TS absorvido epimastigotas íntegro.
- (△—△) soro anti-TS absorvido epimastigotas (20 μ g/ml)
- (□—□) soro anti-TS absorvido epimastigotas (100 μ g/ml)

Os resultados obtidos na transferência passiva de soros absorvidos com formas tripomastigotas sanguíneas ou provenientes de cultura de tecido acham-se apresentados na Fig. 8. Pode-

se observar nesta figura que os animais tratados com soro absorvido com formas sanguícolas vivas não sobreviveram ao 15º dia de infecção, no entanto, 20% dos animais tratados com o soro absorvido com TC vivos sobreviveram ao 30º dia.

A utilização de soros absorvidos com TS lisados ou tratado com formol apresentaram resultados similares aos obtidos com TS vivos. A absorção com formas TC lisadas no entanto, apresentaram resultados similares aos obtidos com TS vivos:

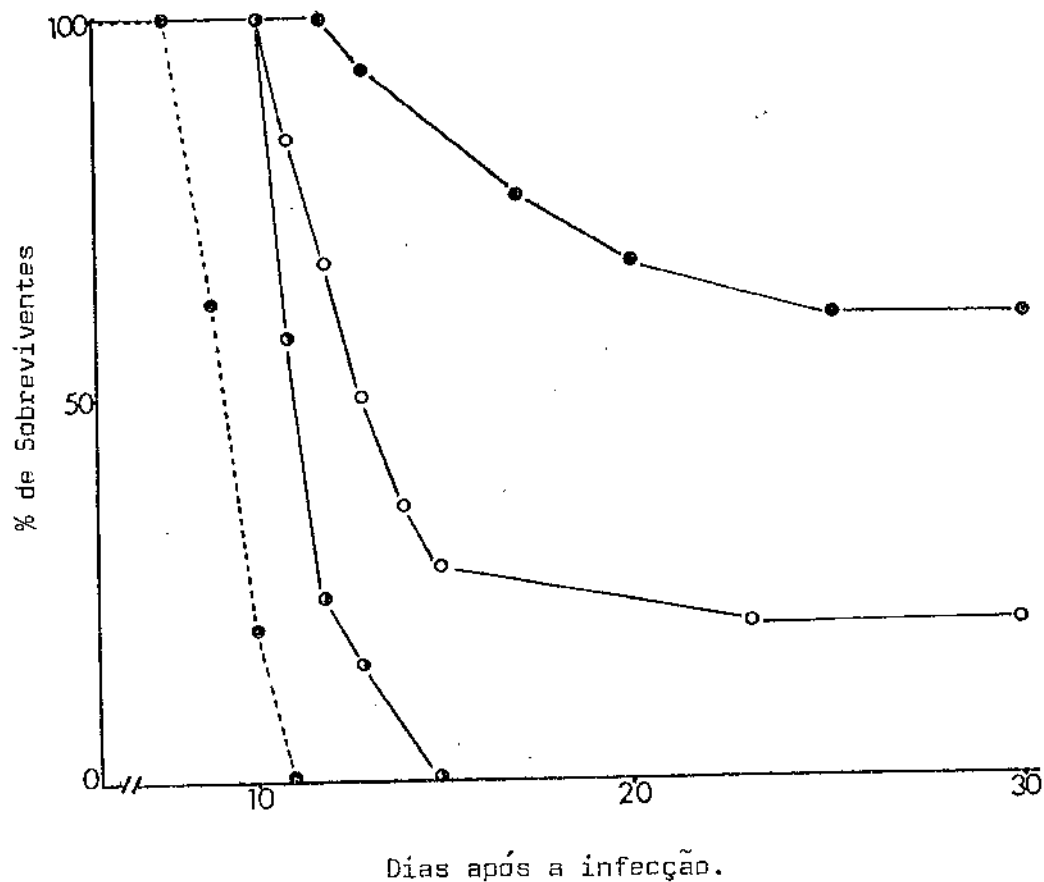


Figura 8: Sobrevida de camundongos CBA (lotes de 10 ou 15 animais) transfundidos com 0,25 ml de soro normal, soro anti-TS da 6ª semana não absorvido ou absorvido com formas tripomastigotas sanguícolas ou de cultura. Após 1 hora, os animais foram infectados com 10^5 formas TS.

Legenda:

- (●-----●) Soro normal
- (●——●) Soro anti-TS não absorvido
- (●——●) Soro anti-TS absorvido tripo sanguícola
- (○——○) Soro anti-TS absorvido tripo cultura

A Figura 9 mostra os resultados obtidos com o tratamento dos animais com soros anti-TS absorvido com formas amastigotas íntegras. Pode-se observar que até o 23º dia os lotes tratados com soro absorvido comportaram-se similarmente aos tratados com soro imune. Entretanto, no 30º dia somente 10% dos animais encontravam-se vivos enquanto a sobrevida do controle imune era de 40%.

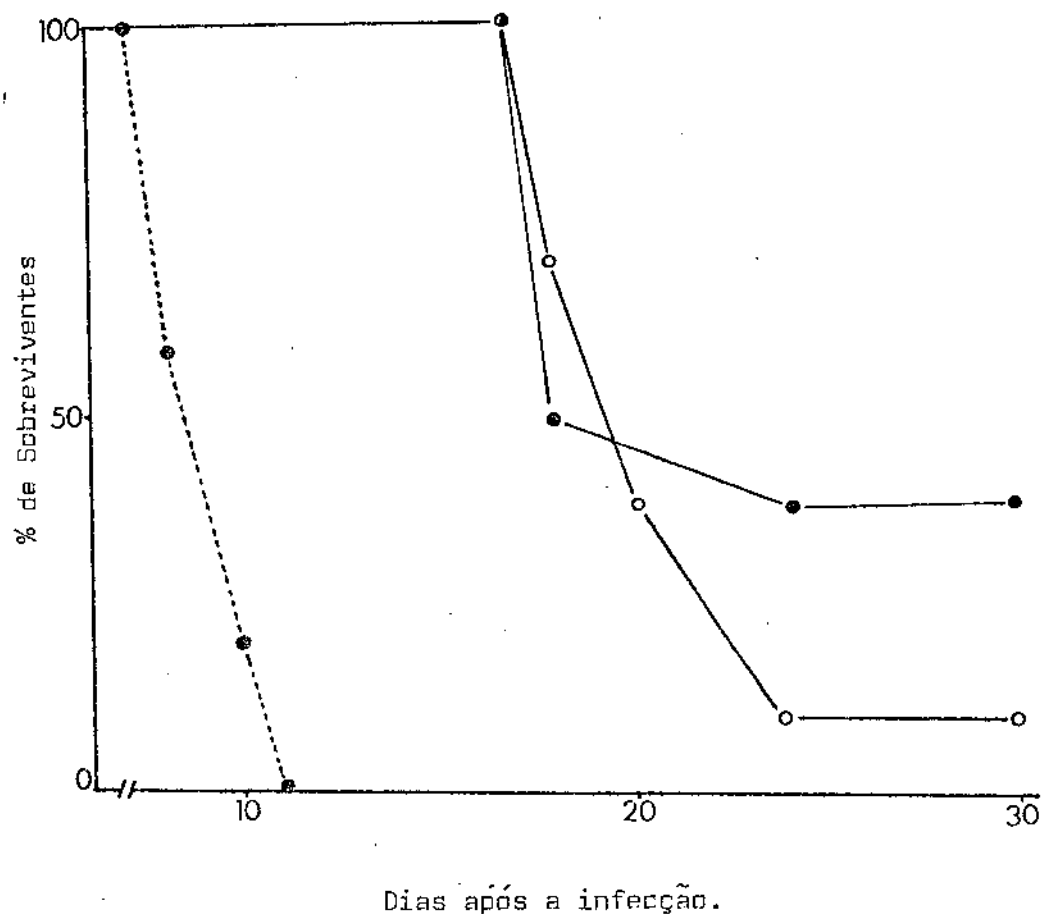


Figura 9: Sobrevida de camundongos CBA (lotes de 10 animais) transfundidos com 0,25 ml de soro normal, soro anti-TS 6ª semana não absorvido ou absorvido com formas amastigotas.

Legenda:

- (●-----●) Soro normal
- (●——●) Soro anti-TS não absorvido
- (○——○) soro anti-TS absorvido amastigotas

Paralelamente a observação da sobrevida, os animais em experimentação tiveram sua parasitemia acompanhada do 4º ao 8º dia de infecção.

Os resultados apresentados pelos animais tratados com soro absorvido com formas epimastigotas íntegras ou lisadas, acham-se expressas na Figura 10, onde verifica-se que os lotes de animais tratados com os soros absorvidos apresentam índices parasi-

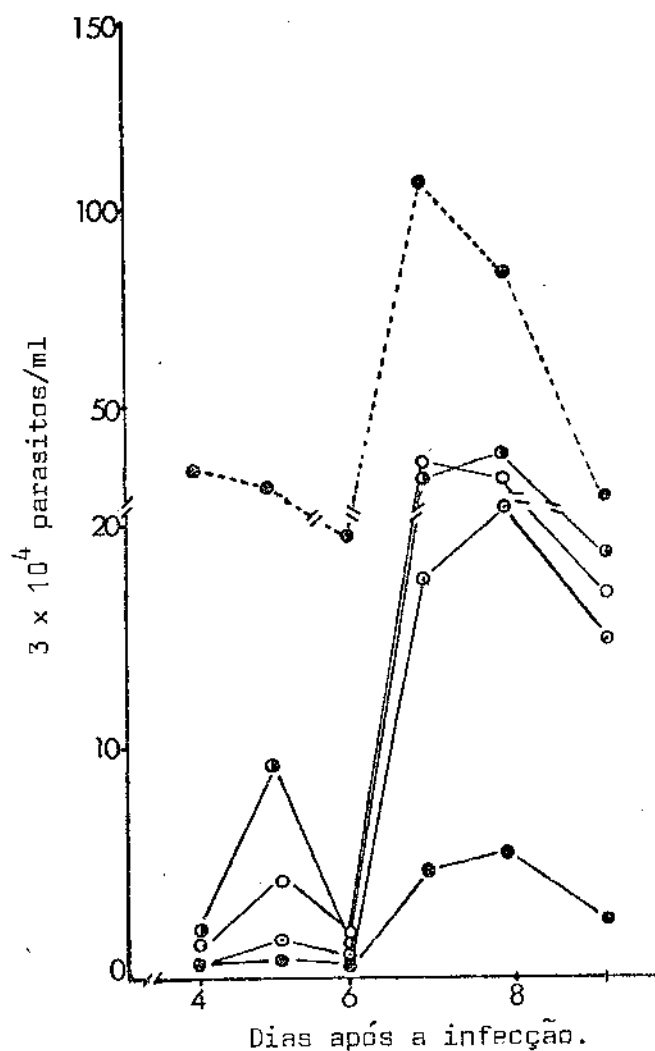


Figura 10: Médias Parasitêmicas de camundongos CBA (lotes de 10 ou 15 animais) transfundidos com 0,25 ml de soro normal, soro anti-TS 6ª semana não absorvido ou absorção com formas epimastigotas íntegras ou lisadas.

Legenda:

- (●---●) Soro normal
- (●—●) Soro anti-TS não absorvido
- (○—○) Soro anti-TS abs. íntegras.
- (●—●) Soro anti-TS abs. lisadas (20µg/ml)
- (○—○) Soro anti-TS abs. lisadas (100µg/ml)

têmicos próximos entre si. A análise estatística realizada nos picos parasitêmicos destes animais mostraram diferenças significativas ($< 0,001$) em relação aos controles normais e imunes.

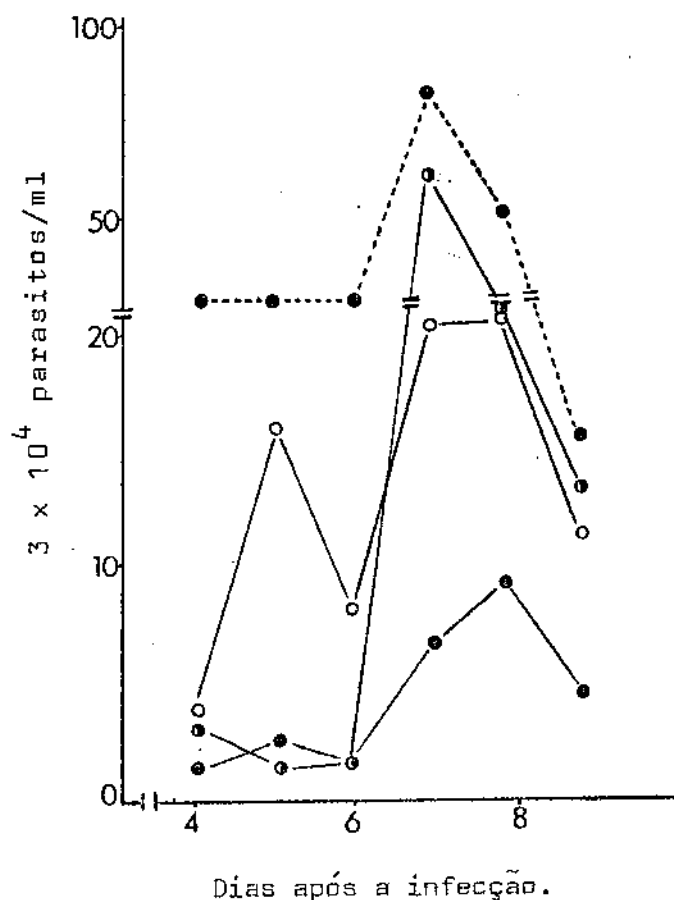


Figura 11: Média Parasitêmica de camundongos CBA (10 ou 15 animais) transfundidos com 0,25 ml de soro normal, soro anti-TS 6ª semana não absorvido ou absorvido com formas tripomastigotas de cultura ou sanguícola.

Legenda:

- (●---●) Soro normal
- (●—●) Soro anti-TS não absorvido
- (○—○) Soro anti-TS absorvido TS
- (○—○) Soro anti-TS absorvido TC

As parasitemias dos animais tratados com soros absorvidos com formas tripomastigotas sanguícolas e as provenientes de cultura acham-se expressas na Figura 11. Nesta figura, verificamos que

os animais tratados com soro absorvido com formas TS apresentam pico de parasitemia próximos ao do controle normal, enquanto os tratados com soro absorvido com TC, exibiram níveis parasitêmicos intermediários aos observados nos CN e CI. O Test t não indicou diferenças significativas nos níveis de parasitos apresentados no pico parasitêmico dos animais tratados com soro absorvido com TS e o controle normal. Porém, os tratados com soro absorvido com formas TC apresentaram picos de parasitemia significativamente inferiores ($< 0,001$) aos do CN embora fossem superiores ($< 0,001$) aos do CI. Diferenças significativas ($< 0,001$) também foram observadas entre os picos parasitêmicos dos animais tratados com soro absorvido com formas TS e os absorvidos com formas TC.

Os animais tratados com soros absorvidos com formas tripomastigotas sanguícolas lisadas ou formoladas, ou com formas tripomastigotas de cultura lisadas apresentaram níveis parasitêmicos similares aos observados nos animais tratados com soro absorvido com formas TS íntegras.

/ Na Figura 12, acha-se apresentada a curva de parasitemia dos animais tratados com soro anti-TS da 6ª semana absorvido com formas amastigotas íntegras. A realização de Test-t, indicou diferenças significativas entre os picos parasitêmicos apresentados pelos animais tratados com o soro absorvido com formas amastigotas e os tratados com soro não absorvido. Diferenças também significativas ($< 0,001$), foram observadas nos picos parasitêmicos dos animais tratados com soro absorvido e os tratados com soro normal.

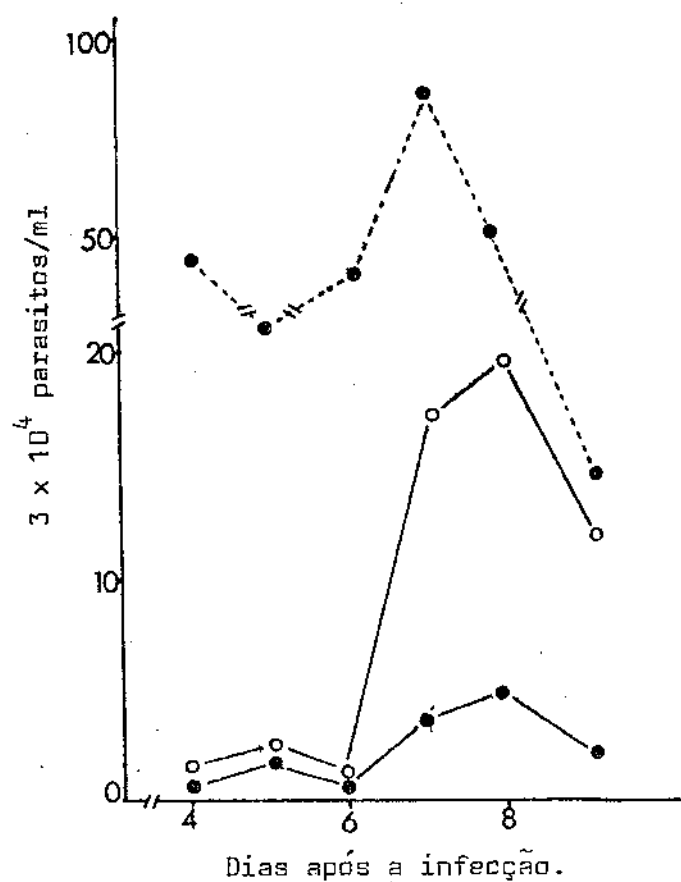


Figura 12: Média Parasitêmica de camundongos CBA (lotes de 10 animais) transfundidos com 0,25 ml de soro normal, soro anti-TS 6ª semana não absorvido ou absorvido com formas amastigotas.

Legenda:

- (●- - - ●) Soro normal
- (●- - ●) Soro anti-TS não absorvido
- (○- - ○) Soro anti-TS absorvido amastigotas

DISCUSSÃO

Entre os fatores que determinam a severidade de infecção chagásica encontram-se: a resistência do hospedeiro e a virulência da cepa responsável pela infecção. A maior ou menor suscetibilidade de um animal à esta, tem sido atribuída principalmente a constituição genética dos mesmos.

Os resultados obtidos no presente trabalho, a semelhança dos apresentados por CORSINI et alli⁽¹⁶⁾ indicam que os camundongos CBA são susceptíveis a infecção com formas TS da cepa Y, sendo que o inóculo de 10^5 formas ocasionou a morte de 100% dos animais até o 13º dia de infecção. No entanto, quando realizamos a infecção utilizando igual inóculo de formas (TC) provenientes de cultura de tecido, 70% dos animais infectados sobreviveram ao 30º dia.

Tais resultados indicam, que apesar das formas TC manterem a capacidade de infectar os animais, sua virulência foi alterada pela manutenção em cultura de tecido, visto que, animais considerados "susceptíveis" a infecção pela cepa Y apresentaram-se "resistentes" a mesma.

Observação similar foi realizada por URDANETA-MORALES⁽¹⁰²⁾ em camundongos C₃H com relação a cepa Brazil. Este autor, correlaciona a atenuação da virulência com o tempo de manutenção em cultura de tecido e sugere que a atenuação seja decorrente da temperatura empregada no cultivo do parasito.

Em nossos experimentos realizados a 32,5°C, a atenuação

da virulência (mortalidade) fez-se notar após a primeira passagem por cultura de tecido, permanecendo constante após 3 e 5 semanas de cultivo. Experimentos realizados em camundongos Swiss (dados não apresentados), indicaram que a mortalidade dos animais infectados com formas TC mantidas por 24 semanas em cultura de tecido, era similar àquela ocasionada por formas obtidas após uma semana de cultivo.

Quanto a influência da temperatura neste fato, não temos dados que nos permitam uma conclusão, desde que, não foram realizados experimentos variando-se a temperatura de cultivo. Por outro lado, a maioria dos pesquisadores^(39, 61, 102) que demonstraram diferenças em atividades biológicas entre as formas tripomastigotas, não citam a temperatura de cultivo das mesmas, o que dificulta a correlação temperatura - virulência.

Todavia, a atenuação da virulência obtida por URDANETA-MORALES⁽¹⁰²⁾, manifesta-se em relação a parasitemia e mortalidade. Nossos resultados demonstram alterações somente a nível de mortalidade; permanecendo a parasitemia dos animais inoculados com formas TC similar a de seus grupos controles, inoculados com formas TS (Fig. 4). Este fato, indica que a cepa Brazil e Y do *T. cruzi* s ofereceriam de maneira diversa a influência do micro ambiente de cultivo. A observação sugere ainda, que na cepa Y, parasitemia e mortalidade seriam fenômenos distintos, sob os quais o micro ambiente atuaria de forma diferente.

KANBARA et alli⁽³⁹⁾ estudando a cepa Tulahuen observou que as formas provenientes de cultura eram mais facilmente fagocitadas que as sanguícolas. O mesmo autor verificou ainda, que a proliferação de parasitos no baço e fígado dos animais infectados com formas de cultura, era superior à apresentada pelos animais infectados com formas sanguícolas. No entanto, o autor não refe-

re-se a mortalidade ou a parasitemia destes animais. Este fato, dificulta a correlação entre os nossos resultados e os do autor, desde que este, não estabelece uma relação entre a proliferação de parasitos no tecido, níveis parasitêmicos e mortalidade dos animais.

NOGUEIRA et alli⁽⁶⁷⁾ utilizando as cepas Y e CL também demonstraram diferenças quanto a capacidade em infectar macrófagos entre as formas provenientes de cultura de tecido e as sanguícolas, observando que as primeiras eram mais infectantes. Resultados da autora sugerem ainda, a presença na membrana das formas sanguícolas de um componente sensível a ação da tripsina e com características anti-fagocitárias^(66,67). A realização de experimentos utilizando um inibidor da síntese de proteínas, indicaram ser este componente sintetizado pelo parasito⁽⁶⁷⁾.

MEIRELLES et alli⁽⁶¹⁾ obtiveram resultados semelhantes aos da autora e sugerem que possivelmente, o contato do parasito com o sistema imune do hospedeiro induzisse a formação desta substância anti-fagocitária, o que explicaria, a presença deste fator somente nas formas tripomastigotas sanguícolas.

O conjunto destes resultados, indica que possivelmente a manutenção de uma cepa em diferentes meios ambientes alteraria características biológicas do protozoário. Contudo, estudos realizados recentemente utilizando a clonagem de *T. cruzi*, indicam que uma cepa possa ser constituída por subpopulações do parasito^(75,76). A demonstração de que clones isolados de uma mesma amostra podem apresentar características biológicas distintas; ^(8,75,76) levam-nos a supor que o micro ambiente pudesse também atuar sobre o parasito, selecionando ou facilitando a expansão de determinados clones. Baseados nesta hipótese, poderíamos imaginar que a manutenção da cepa Y em cultura de células, facilitasse a expansão ou seleção de clones com baixa virulência à camundongos CBA. No entanto,

nossos resultados mostram que, as formas colhidas no pico parasitário de animais infectados com formas tripomastigotas provenientes de cultura; apresentam virulência (índice de mortalidade) similar àquelas mantidas unicamente por passagens em camundongos. Estes resultados indicam que não pode ser afastada a possibilidade do fator responsável pela mortalidade dos camundongos infectados com a cepa Y, ser induzido pelo contato do parasito com o sistema imune, desde que, aparentemente, este encontra-se somente presente nas formas obtidas por passagens "in vivo" podendo-se talvez, estabelecer uma relação entre esse fator e o anti-fagocitário descrito por NOGUEIRA. Esta hipótese é reforçada ainda, pelos nossos resultados que indicam a possibilidade de reversão da virulência (índice de mortalidade) das formas TC pela passagem "in vivo". No entanto, não sabemos se as alterações de atividades biológicas descritas pelos demais autores^(39, 61, 102), seriam também reversíveis, visto que, os mesmos não fazem referência a realização de testes neste sentido.

Em virtude das diferenças constatadas entre as formas obtidas de cultura de tecido e as sanguícolas, procuramos investigar também, a capacidade das mesmas em induzir a síntese de anticorpos protetores.

Para isso, os soros anti-T.cruzi foram obtidos em camundongos (CBA x C₅₇Bl10/j)F1 "resistentes" a cepa Y. A utilização desta linhagem permitiu-nos a obtenção de soros da fase crônica da doença, sem a administração de quimioterápicos realizada por outros autores^(51, 95), sendo que 95% dos animais infectados com 10² formas TS sobreviveram ao 60º dia de infecção (dados não apresentados).

Por outro lado, o emprego como receptor nos experimentos de transferência passiva de uma linhagem de camundongos "sensível" a infecção (CBA) e a utilização de um inóculo (10^5 TS) capaz de matar 100% dos animais em curto espaço de tempo (Fig. 1A) facilitou a observação da atividade protetora dos soros testados. A escolha deste inóculo, acha-se de acordo com os resultados de LOUREIRO⁽⁵⁷⁾ que verificou ser a dispersão dos dados em torno da média, bem menor quando são utilizados inóculos altos (10^4 ou 10^5). A autora sugere, através de seus resultados, que em experimentos que vissem a verificação de proteção, devam ser utilizados altas doses de T.cruzi no desafio.

Diferença quanto a capacidade de suscitar o aparecimento de anticorpos protetores, foram observadas entre as formas TS e TC.

Os soros anti-TS da 4ª, 6ª e 8ª semana, quando passivamente transfundidos, controlaram similarmente as parasitemias que apresentaram-se significativamente inferiores a dos controles normais (Fig. 4 A, B e C). A mortalidade no entanto, foi controlada de maneira diversa, sendo a proteção oferecida pelo soro da 4ª e 8ª semana inferior àquela observada nos animais tratados com soro da 6ª semana (Fig. 3 A, B e C).

Já, os soros anti-TC 4ª, 6ª e 8ª semana mostraram-se incapazes de controlar a parasitemia (Fig. 4 A, B e C), não obstante, a mortalidade ser parcialmente controlada pelos soros 4ª e 8ª semana.

Estes resultados indicam que as formas TS induziriam a formação de anticorpos protetores, que independentemente do período de infecção atuariam sobre a parasitemia. Porém, as formas TC não foram capazes de induzir o aparecimento destes anticorpos.

O soro anti-TS da 6ª semana apresentou a maior atividade protetora em relação a mortalidade, contrariamente ao anti-TC de igual período.

Tais observações reforçam nossa sugestão inicial, de que na cepa Y, mortalidade e parasitemia seriam fatores distintos, provavelmente, controlados por diferentes anticorpos. Isto levaria-nos a supor que poderia haver uma soma de efeitos, mas não necessariamente, uma correlação entre parasitemia e mortalidade. Esta hipótese, acha-se de acordo com os resultados obtidos por WRIGHTSMAN^(104, 105) que sugerem que a mortalidade e parasitemia seriam independentes e controladas por genes distintos, presentes respectivamente, dentro e fora da região H-2.

No entanto, o fato de utilizarmos nos experimentos, animais isogênicos e obtermos diferenças em relação a mortalidade dos mesmos quando da infecção com formas TS ou TC da cepa Y, indica, que fatores do parasito também influiriam na mortalidade.

Ainda a favor da disvinculação entre parasitemia e mortalidade, temos os resultados de pesquisadores^(16, 57, 59) que não encontram uma relação direta entre o número de parasitos circulantes e a morte dos animais.

Nossos resultados, encontram-se de acordo com tal sugestão, desde que, animais infectados com formas TC que apresentaram altos níveis de parasitos circulantes (Fig. 2), exibiram baixos índices de mortalidade (Fig. 1B).

Em função destes resultados, podemos inferir a importância dos parâmetros utilizados para verificar proteção e/ou infecção na Doença de Chagas experimental, visto que, a utilização de um único parâmetro pode dificultar a interpretação dos resultados.

Se assumirmos que, a diminuição da parasitemia e aumento da sobrevida sejam decorrentes da presença de anticorpos protetores

res, entre os soros por nós testados, o anti-TS da 6ª semana era o que apresentava maior concentração destes anticorpos. Tal observação, quanto ao período, acha-se de acordo com os dados obtidos por HANSON⁽³⁵⁾ que utilizando camundongos CF1 verificou ser o soro da 6ª semana o que apresentava maior capacidade protetora entre os soros por ele testados. No entanto, este autor utilizou 4 doses de 0,4 ml de soro nos testes de proteção, dose esta, seis vezes superior a por nós empregada.

Dose superior a nossa, foi também utilizada por KRETTLI et alli⁽⁹¹⁾ que demonstraram que no período de 20 dias, $\pm$ 50% dos animais transfundidos com soro da fase crônica (cepa Y) sobreviveram a infecção com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas. TAKEHARA et alli⁽⁹⁶⁾, utilizando diferentes doses de soro mostraram que 0,4 ml, protegia 50% dos animais, no período de 60 dias quando infectados com 10^1 formas tripomastigotas.

Uma maior correlação entre estes resultados e os nossos torna-se difícil pelas variações ocorridas em relação ao período e a forma de obtenção dos soros, dose de soro transfundida e inóculo de tripomastigotas utilizadas nos testes de proteção.

Todavia, nossos resultados demonstram que enquanto os animais tratados com soro normal e desafiados com 10^5 TS não sobrevivem além do 13º dia de infecção (Fig. 5) os tratados com 0,25 ml de soro anti-TS da 6ª semana apresenta ao final do período de observação, um índice de sobrevivência em torno de 50% (Fig. 6B).

A análise dos resultados apresentados, sugere que a atividade protetora presente no soro anti-TS da 6ª semana seria superior à observada nos soros testados pelos demais autores.

Tal fato, poderia estar ocorrendo em virtude dos autores utilizarem um "pool" de soros da fase crônica, obtidos em diferentes semanas, o que segundo nossos resultados (Fig. 3) oca-

sionaria a diluição dos anticorpos protetores. Outro fator que poderia ser considerado é a linhagem de camundongos utilizados na obtenção dos imunossoros, visto que, no presente trabalho utilizamos uma linhagem naturalmente "resistente" a infecção pelo *T. cruzi*.

A infecção com 10^2 TS (Fig 1A) mostrou índices similares de sobrevivência ao apresentado pelos animais transfundidos com o soro anti-TS 6ª semana e infectados com 10^5 TS, sugerindo que os anticorpos presentes no soro da 6ª semana atuassem de maneira a reduzir o inóculo inicial em 100 vezes.

Estes resultados, são coincidentes com a teoria proposta por KRETTLI et alii⁽⁵³⁾ a partir de resultados obtidos "in vitro", de que os anticorpos protetores apresentariam uma atividade lítica contra formas tripomastigotas.

Por conseguinte, se realmente o inóculo de 10^5 TS pela ação dos anticorpos fosse reduzido em 100 vezes, o pico parasitário ocorreria em período similar ao dos lotes controles inoculados com 10^2 TS. No entanto, não foram esses os nossos resultados, o pico parasitário dos animais passivamente imunizados e desafiados com 10^5 TS ocorreu em período similar aos controles normais, inoculados com 10^5 TS, indicando a permanência do inóculo inicial.

McHARDY⁽⁵⁹⁾ através de experimentos variando o tempo entre a administração dos soros imunes e a inoculação de parasitos, sugere que o soro passivamente transfundido não exerça efeito nos inóculos iniciais de *T. cruzi*, desde que, a administração do soro um dia após a infecção, exerceu um efeito protetor superior ao apresentado quando o soro era ministrado um dia antes.

Entretanto, LOUREIRO⁽⁵⁷⁾ utilizando condições similares as nossas, demonstrou que o soro anti-TS da 6ª semana quando

ministrado 3 dias antes da infecção exercia atividade protetora controlando a parasitemia e a mortalidade. Porém, a inoculação 3 dias após a infecção, controlou apenas a parasitemia.

A forma de ação dos anticorpos protetores, provavelmente, será mais facilmente elucidada após o conhecimento da especificidade dos mesmos. Neste sentido a atividade protetora dos soros anti-TS da 6ª semana foi investigada após a absorção do mesmo com as diferentes formas evolutivas do parasita.

A reatividade dos soros para as diferentes formas evolutivas do parasito foi testada por reações de imunofluorescência, antes e após a absorção, mostrando que o soro não absorvido reagia com as três formas do protozoário, apresentando títulos maiores para as formas amastigotas e os menores para as formas epimastigotas. Resultados similares, foram obtidos por REPKA et alli⁽⁸⁰⁾ utilizando soros de camundongos Swiss-55.

Após a absorção do soro com formas epimastigotas vivas ou lisadas, não detectou-se alterações significativas nos títulos apresentados pelas formas tripo e amastigotas. No entanto, a absorção com formas tripomastigotas foi capaz de negativar as reações com formas epimastigotas, porém, sem alterar os títulos para as formas amastigotas. Após a absorção com formas amastigotas, os testes indicaram queda no título para as formas tripo e fluorescência negativa para as formas epimastigotas. Resultados similares foram obtidos por KLOETZEL et alli⁽⁴⁷⁾ utilizando "pools" de soro da fase crônica de camundongos infectados com a cepa Y do T cruzi. Estes resultados, indicam a presença de anticorpos capazes de reagir cruzadamente com as três formas evolutivas do parasito, assim como, a presença de anticorpos específicos para as formas tripo e amastigotas.

Nos experimentos de proteção realizados com soro anti-TS da 6ª semana absorvido com formas epimastigotas integras,

não foram observadas alterações significativas à nível de mortalidade dos animais. Entretanto, quando formas epimastigotas lisadas (100 μ g/ml) foram empregadas na absorção, verificou-se uma diminuição da sobrevivência dos animais passivamente transfundidos, sugerindo que constituintes internos das formas epimastigotas absorvessem os anticorpos protetores, ou que, determinantes antigênicos presentes na superfície das formas e anteriormente inacessíveis ao anticorpo, pudessem através da lise do parasito entrar em contato com os mesmos. Estas hipóteses, justificariam a proteção obtida por alguns pesquisadores^(9,11) utilizando extratos antigênicos de formas epimastigotas na imunização dos animais. Quando realizou-se a absorção empregando-se uma menor quantidade de EBTC (20 μ g/ml) a sobrevivência dos animais transfundidos com este soro foi similar a dos grupos controles, tratados com soro anti-TS não absorvido.

Estes resultados, leva-nos a supor que determinantes antigênicos capazes de absorver os anticorpos protetores estariam presentes nas formas epimastigotas, porém, em baixa concentração. Ocorrendo, portanto, a absorção somente quando fossem empregados grande número de formas. Contudo, em virtude da grande quantidade de antígenos aplicada, não podemos descartar a possibilidade da absorção observada ser inespecífica ou ainda, decorrente da presença de formas metacíclicas, que como sabe-se constituem 10% das formas mantidas em meio de L.I.T..

As curvas de parasitemia dos animais tratados com soro absorvido com formas epimastigotas íntegras ou lisadas (20 e 100 μ g/ml), apresentaram-se próximas entre si, sendo estas significativamente diferentes das apresentadas pelos CI e CN, o que evidencia a possibilidade de absorção parcial dos anticorpos que controlam a parasitemia.

A proximidade entre a curva de parasitemia dos animais tratados com soro absorvido com formas íntegras e lisadas, sugere que os anticorpos que controlam a parasitemia seriam voltados contra determinantes antigênicos, presentes na superfície das formas epimastigotas. Por outro lado, o fato de não haver diferenças nos níveis parasitêmicos apresentados pelos animais tratados com soro absorvido com 20 ou 100 μ g/ml de EBTC, indica que estes anticorpos não foram totalmente absorvidos, não em virtude da utilização de dose insuficiente de antígeno, mas provavelmente, pela ausência nas formas epimastigotas de determinantes antigênicos aos quais eram voltados. Essa observação leva-nos a teorizar que o controle da parasitemia seria realizado por ao menos dois tipos de anticorpos, um dos quais, dirigido contra determinantes presentes nas formas epimastigotas.

A mortalidade apresentada pelos animais transfundidos com soros absorvidos com formas amastigotas foi similar a do CI até o 23º dia de infecção (Fig. 9). Entretanto, ao final do período de observação (30 dias), somente 10% dos animais encontravam-se vivos, enquanto a sobrevivência nos grupos controles (CI) era de 40%. Diferenças significativas ($< 0,001$) foram observadas em relação aos picos parasitêmicos apresentados pelos animais tratados com soro absorvido e não absorvido (Fig. 12), sugerindo que os anticorpos que controlam a parasitemia reagem com determinantes antigênicos presentes na superfície destas formas. Como nas reações de imunofluorescência demonstrou-se que a absorção com formas amastigotas negativa as reações para as formas epimastigotas, é de se supor que, os anticorpos que reagem com as formas amastigotas e participam no controle da parasitemia, sejam aqueles que reagem cruzadamente com as formas epimastigotas.

Alterações à nível de parasitemia e mortalidade foram

observadas em animais tratados com soro absorvido com formas tripomastigotas sanguícolas íntegras (Fig. 8), lisadas ou formoladas, sendo estas capazes de retirar tanto os anticorpos que controlam a mortalidade, quanto os que controlam a parasitemia (Fig. 11). Este fato, indica a presença na superfície de formas tripomastigotas sanguícolas, de determinantes antigênicos estáveis a ação do formol e capazes de absorver anticorpos protetores.

No entanto, quando nas absorções foram usadas formas tripomastigotas íntegras provenientes de cultura de tecido, obtivemos somente absorção parcial dos anticorpos que controlam a parasitemia e a mortalidade. Porém, se as mesmas formas eram utilizadas lisadas, a absorção observada era correspondente à apresentada pelas formas sanguícolas; o que indica que os determinantes antigênicos capazes de absorver os anticorpos protetores encontram-se presentes também nas formas provenientes de cultura de tecido. Todavia, estes estariam provavelmente, distribuídos em menor concentração na superfície do parasito ou de forma menos acessível ao reconhecimento pelo anticorpo.

A análise dos picos parasitêmicos obtidos dos animais tratados com soro absorvido com formas epimastigota, tripomastigota sanguícola ou amastigota, sugerem que diferentes anticorpos poderiam estar envolvidos no controle da parasitemia. Alguns desses anticorpos reagiriam cruzadamente com estas 3 formas, enquanto que outros, seriam especificamente dirigidos contra formas tripomastigotas sanguícolas.

Durante a realização dos testes de proteção com os soros anti-TS dos diferentes períodos, verificamos que a atividade protetora dos mesmos, era máxima na 6ª semana, decaindo na 8ª semana de infecção. No entanto, testes de proteção (dados não apre-

sentados) com soros obtidos após 1, 2 ou 3 semanas da inoculação de 10^3 TS formolados camundongos infectados à 6ª semana (10^2 TS), mostrou que estes soros apresentavam atividade protetora superior à aquela exercida pelo soro anti-TS da 8ª semana e similar a do anti-TS 6ª semana.

Estes resultados sugerem que o tratamento com formol não alteraria a atividade imunogênica dos determinantes antigênicos envolvidos no controle da parasitemia e mortalidade.

Contudo, não podemos descartar a possibilidade de que a manutenção do título de anticorpos seja decorrente de um estímulo inespecífico.

No presente trabalho, mostramos que a cepa Y quando mantida em cultura de células ocasiona níveis parasitêmicos similares aos encontrados em camundongos inoculados com formas tripomastigotas sanguícolas, porém, a mortalidade dos animais inoculados com TC é significativamente inferior à apresentada pelos animais inoculados com TS. A pesquisa de anticorpos protetores, induzidos pelas formas TC, indicou baixa proteção quanto a mortalidade e ausência de controle dos níveis parasitêmicos quando comparados com os resultados obtidos com o soro anti-TS da 6ª semana. No entanto, não podemos afirmar que as formas TC não induzam a formação de anticorpos protetores; visto que, verificamos que camundongos CBA e Swiss⁽³²⁾ inoculados com 10^5 TC e reinfectados após 4 ou 6 semanas com 10^5 TS não apresentavam níveis parasitêmicos ou mortalidade no período de 30 dias. Este fato, pode sugerir que a dose de 10^2 TC utilizada na obtenção dos anti-soros induziria em camundongos F1, baixa concentração de anticorpos protetores nos períodos observados. Por outro lado, não podemos dizer que a proteção na Doença de Chagas Experimental, deva-se apenas a presença de anticorpos, desde que, experimentos com célu-

las^(13,17,42) tem demonstrado a participação das mesmas.

A análise dos trabalhos que investigam a proteção nesta doença, sugerem que ela seria dependente da interrelação dos fatores humorais e celulares. Neste sentido, SCOTT⁽⁹²⁾ demonstrou que células T interagem com células B, auxiliando a produção de anticorpos anti-T. cruzi. No entanto, como a investigação no presente trabalho não foi dirigida neste sentido, não dispomos de dados que nos permitam correlacionar e/ou discutir o envolvimento desses fatores na síntese de anticorpos protetores pela infecção por formas TS ou TC.

Contudo, nossos resultados demonstram que os determinantes antigênicos envolvidos na produção de anticorpos protetores, na cepa Y, estariam presentes preferencialmente na superfície das formas tripomastigotas sanguíneas.

CONCLUSÕES

1. Diferenças significativas foram observadas em relação a virulência (mortalidade) das formas tripomastigotas sanguíneas e as obtidas em cultura de tecido, para camundongos CBA.
- 1.1 - A mortalidade dos animais infectados com tripomastigotas sanguíneas foi significativamente superior a observada pela infecção com tripomastigotas de cultura.
- 1.2 - Os níveis parasitêmicos dos animais inoculados com formas TC e TS não apresentaram diferenças significativas.
- 1.3 - Não houve diferenças significativas nos níveis parasitêmicos e mortalidade dos animais inoculados com forma TC obtida após 1, 3 ou 5 semanas de cultura em células HeLa.
- 1.4 - A baixa virulência (mortalidade) apresentada pelas formas TC foi reversível pela passagem destas em camundongos.
2. A atividade protetora (controle parasitemia e mortalidade) dos soros anti-TS e anti-TC apresentaram-se significativamente diferentes.

- 2.1 - Os soros anti-TS da 4ª, 6ª e 8ª semana foram capazes de controlar similarmente a parasitemia, sendo esta significativamente inferior à apresentada pelos animais tratados com soro normal.
- 2.2 - Os soros anti-TC, 4ª, 6ª e 8ª semana, mostraram-se incapazes de controlar a parasitemia, apresentando níveis parasitêmicos similares aos encontrados nos animais tratados com soro normal.
- 2.3 - Os soros anti-TS e anti-TC mostraram-se similares quanto a capacidade de controlar a mortalidade quando obtidos na 4ª ou 8ª semana de infecção.
- 2.4 - Diferenças significativas no controle da mortalidade foram observadas nos animais tratados pelo soro anti-TS e anti-TC da 6ª semana.
- 2.5 - Maior atividade protetora, entre os soros por nós testados, foi obtida pela transfusão do soro anti-TS da 6ª semana.
3. A análise dos picos parasitêmicos dos animais tratados com soros absorvidos com as diferentes formas do parasito, sugerem que os anticorpos específicos das formas tripomastigotas e anticorpos que reagem cruzadamente com as demais formas evolutivas, estariam envolvidos no controle da parasitemia.
- 3.1 - Os animais tratados com soro absorvido com formas tripomastigotas sanguícolas, apresentaram porcentagem de mortalidade similar ao do grupo tratado com soro normal.

3.2 - Diferenças na capacidade de absorção dos anticorpos protetores foram observadas entre as formas TS e TC.

3.3 - Os anticorpos protetores (parasitemia e mortalidade) seriam dirigidos preferencialmente contra determinantes antigênicos presentes nas formas TS.

BIBLIOGRAFIA

1. BICE, D.E. & ZELEDON, R. (1970) Comparasion of infectivity of strains of T. cruzi (Chagas, 1909). J. Parasitol. 56:663-670.
2. BITTENCOURT, A.L. (1976) Congenital Chagas'disease. A review A.J.Dis.Child. 130: 97-103.
3. BONGERTZ, V. & DVORAK, J.A. (1983) Trypanosoma cruzi: antigenic analysis of cloned stocks. AM.J.Trop.Med.Hyg. 32(4): 716-722.
4. BRENER, Z. (1962) Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 4: 389-396.
5. -----.(1965) Comparative studies of different strains of Trypanosoma cruzi. Ann.Trop. Med. Parasit. 59: 19-26.
6. -/-----; (1973) Biology of Trypanosoma cruzi. Ann. Rev. Microb. 27: 347-383.
7. -----; COSTA, C.A.G. & CHIARI, C. (1976) Differences in the susceptibility of Trypanosoma cruzi strains to active chemotherapeutic agents. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 18(6): 450-455.
8. -----; (1977) Intraspecific variation in Trypanosoma cruzi two types of parasite populations presenting distint characteristics. P.A.H.O. Scient. Publication. 347: 11-21.
9. -----; (1979) Vacinação. In: Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas (Eds. Z. Brener & Z. Andrade) Edit. Guanabara, Rio de Janeiro, pp. 450-455.

10. BRENER, Z. (1980) Immunity to Trypanosoma cruzi. Adv. Parasitol. 18: 247:292.
11. ----- & CAMARGO, E.P. (1981) Perspectives of vaccination in Chagas' disease. In: Working Group on Perspectives of Immunization in Parasitic Diseases. Ed. Carlos Chagas - P.A.S. Vaticano - pp. 145 - 168.
12. BRUMPT, L. (1980) Épidémiologie de la maladie de Chagas. Bull. Acad. Nat. Med. 164: 782-785.
13. BURGUESS, D.E. & HANSON, W.L. (1979) Adoptive transfer of Protection against Trypanosoma cruzi with lymphocytes and Macrophages. Infect. Immun. 25(3): 838-843.
14. ----- & -----;(1980) Trypanosoma cruzi: T-cell dependence of primary immune response and the effects of depletion on T cells and Ig-bearing cells on immunologically memory. Cel. Immunol. 52: 176-182.
15. CAMARGO, M.E. (1966) Fluorescent Antibody Test for the Serodiagnosis of American Trypanosomiases. Technical modification Employing preserved culture forms of T. cruzi in slide test. Rev.Inst.Med. Trop. São Paulo 8: 227-234.
16. CORSINI, A.C.; COSTA, M.G., OLIVEIRA, O.L.P.; CAMARGO, I.J.B. & STELINI, Jr. A. (1980) Susceptibility of inbred mice to Trypanosoma cruzi strain Y. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 22(4): 192-196.
17. ----- & STELINI, Jr.A. (1981) Immune T cells control Trypanosoma cruzi infections. Experientia. 37: 904-906.

18. CORSINI, A.C., BRAZ, R.; CIAMPI, D.B. & ZUCATO, M.R.L. (1982)
Resistance to Trypanosoma cruzi infection in Relation to the
Timing IgG Response. Z. Parasitokd. 68: 15-25.
19. COSSIO, P.M.; DIEZ, C.; SZARFMAN, A.; KREITZER, B.; CANDIOLO, B.
& ARANA, R. (1974) Chagasic cardiopathy. Demonstration of a
serum gamma globulin factor wich reacts with indocardium and
vascular structures. Circulation. 49: 13-21.
20. CRUZ, F.S.; MARR, J.J. & BERENS, R.L. (1980) Prevention of
transfusion induced in Chagas' disease by amphoterecin B.
Ann. J. Trop. Med. Hyg. 29(5): 761-765.
21. CUNNINGHAM, D.S.; GROGL, M. & KUHN, R.E. (1980) Suppression of
Antibody Responses in Humans Infected with Trypanosoma cruzi
Infect. Immun. 30(2): 496-499.
22. ----- & KUHN, R.E. (1980) Trypanosoma cruzi -
induced suppressor substance. II Regulatory activity.
/ Immunogenetics. 10: 557-571.
23. ----- & -----; (1980) T. cruzi - induced a
suppressor substance. III Activation of suppressor cells.
J. Parasitol. 66: 881-887.
24. CUNNINGHAM, D.S; KUHN, R.E.; TARLENTON, R.L. & DUNN, R.S. (1981)
Trypanosoma cruzi: effect on B-cell responsive and responding
clones. Exp. Parasitol. 51: 257-268.
25. CULBERSTON, J.T. & KOLODNY, M.H. (1938) Acquired Immunity in
rats against Trypanosoma cruzi. J. Parasitol. 24: 83-90.
26. ----- & KRUSSLER, W.R. (1942) Age resistance of mice to
Trypanosoma cruzi. J. Parasitol. 28: 155-158.

27. DE CAMPANINI, A.R.; ESTEVA, M.; LAGUENS; R.P. & SEGURA, E.L.
(1982) Trypanosoma cruzi and immunoprotection: study of an attenuated strain. *Medicina (B.A.)* 42: 502-506.
28. DIAS, J.C.P. (1979) Mecanismos de transmissão. In: Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. (Eds. Z. Brener & Z. Andrade) Edit. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, pp. 152-176 (1979).
29. EISEN, H. & TALAN, I. (1977) Tetrahymena pyriformis recovers from antibody immobilization by producing univalent antibody fragments. *Nature*. 270: 514 - 515.
30. FERNANDES, J.F. & CASTELLANI, O. (1966) Growth characteristics and chemical composition of Trypanosoma cruzi. *Exp. Parasitol.* 18: 195-202.
31. FISHER, R.A. (1934) "Statistical Methods for Research Workers" Oliver and Boyd. Edinburgh.
32. GAVINO, V.A.; GABOS, L.M.C.; REPKA, D. & RANGEL, H.A. (1984) Virulência de Formas Tripomastigotas do Trypanosoma cruzi (cepa Y) Resumo I-21 na XI Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas - Caxambú - MG.
33. GONZALEZ - CAPPA, S.M.; PESCE, U.J.; CANTARELLA, A.I. & SCHUMUÑIS, G.A. (1974) Trypanosoma cruzi: protection of mice with epimastigote antigens from immunologically different parasite strains. *Exp. Parasitol.* 35: 179:186.
34. -----;CANTARELLA, A. I., LAYMONOVICH. S & SEGURA, E.S. (1976) Experimental Chagas' disease: Studies on the Stability of a Protective Antigen. *J. Parasitol.* 62(1):130-133.

35. HANSON, W.L. (1977) Immune response and Mechanisms of Resistance in Trypanosoma cruzi. P.A.H.O. 347: 22-34.
36. HAUSCHKA, T.S. (1947) Sex of host as a factor in Chagas' disease. J. Parasitol. 33: 399-404.
37. JOHNSON, P.; NEAL, R.A. & GALL, D. (1963) Protective Effect of Killed Trypanosoma Vaccines with incorporated Adjuvantes Nature. 5: 83.
38. KAGAN, I.G. & NORMAN, L. (1961) Immunologic studies on Trypanosoma cruzi. III - Duration of acquired immunity in mice initially infected with a North American strain of T. cruzi. J. Infect. Dis. 108: 213-217.
39. KAMBARA, H. & NAKABAYASHI, T. (1983) Comparative studies on trypomastigotes of Trypanosoma cruzi from infected mouse blood and infected fibroblast cell (L-cell) culture. J. Biken 26: 57-62.
40. KIERSZENBAUM, F. & HOWARD, J.G. (1976) Mechanisms of resistance against experimental Trypanosoma cruzi infection: The importance of antibodies and antibody forming capacity in the Biozzi High and Low responder mice. J. Immunol. 116(5): 1208-1211.
41. KIERSZENBAUM, F.; IVANY, J. & BUDZKO, D.B. (1976) Mechanisms of natural resistance to trypanosoma infection. Role of complement in avian resistance to Trypanosoma cruzi infection. Immunology. 30: 1-6.
42. ----- & PIENKOWSKI, N.M. (1979) Thymus-Dependent Control of Host Defense Mechanisms against Trypanosoma cruzi infection. Infect. Immun. 24(1): 117-120.

43. KIERSZENBAUM, F.(1980) Protection of Congenitally Athymic Mice against Trypanosoma cruzi infection by Passive Antibody transfer. J. Parasitol. 66(4): 673-675.
44. -----, ACKERMAN, S.J. & GLEICH, G.H. (1981) Destruction of Bloodstream Forms of Trypanosoma cruzi by Eosinophil Granule Major Basic Protein. Am. J. Trop. Med. Hyg. 30(4): 775-779.
45. -----, GOTTLIEB, C.A. & BUDZKO, D.B. (1981) Antibody Independent, Natural Resistance of Birds to Trypanosoma cruzi infection. J. Parasitol. 67(5): 656-660.
46. KIPNIS, T.L.; JAMES, S.L.; SHER, A. & DAVID, J.R. (1981) Cell mediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi. II- Antibody Dependent Killing of Bloodstream forms by mouse eosinophils or neutrophils. Am.J.Trop.Med.Hyg. 30(1): 47-53.
47. KLOETZEL, J.; CAMARGO, M.E. & GIOVANNINI, V.L. (1975) Antigenic / differences among epimastigotes, amastigotes trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. J. Protozol. 22(2): 259-261.
48. KLOETZEL, J. & DEANE, M.P. (1977) Presence of Immunoglobulins on the surface of bloodstream Trypanosoma cruzi. Capping during differentiation in culture. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 19(6): 397-402.
49. KOLODNY, M.H. (1939) Studies on age resistance against trypanosoma infection. I the resistance of rats of different ages to infection with Trypanosoma cruzi. Am.J.Hyg. 29: 13-17.
50. KREIER, J.P.; AL ABBASSAY, S.M.; SEED, T.M. & REPKA, D. (1976) T. cruzi: observations on entry, development, release and ultrastructure of parasites grow in cell culture. O.J.Sci. 76(6): 243-253.

51. KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. (1976) Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections. J. Immunol. 116(3): 755-760.
52. ----- & -----; (1982) Resistance Against Trypanosoma cruzi Associated to anti-living Trypomastigote antibodies. J. Immunol. 128(5): 2009-2012.
53. -----; (1983) Resposta Imune Humoral na Doença de Chagas. Interdência 8(6): 374-383.
54. LENZI, H.L.; LENZI, J.G.A. & ANDRADE, Z.A. (1982) Experimental production of EVI antibodies. Am.J.Trop.Med.Hyg. 31(1). 48-52.
55. LEON, W.; VILLALTA, F.; QUEIROZ, T. & SZARFMAN, A. (1979) Antibody Induced Capping of the Intracellular Stage of Trypanosoma cruzi. Infect. Immun. 26(3): 1218-1220.
56. LORCA, M.; ATIAS, A.; ASTORGA, B.; MUÑOZ, P. & CARRERE, I. / (1983) Trypanosoma cruzi infection in blood banks of 12 chilean hospitals. P.A.H.O. Bulletin 17(3): 269-274.
57. LOUREIRO, I.V.M. (1985) - Evolução da Infecção Experimental por Trypanosoma cruzi em camundongos Passivamente Imunizados. Tese de Mestrado apresentada no Instituto de Biologia da UNICAMP.
58. MADEIRA, E.D.; de ANDRADE, A.F.B.; BUNN-MORENO, M.B. & BARCINSKI, M. (1979) Antibody-Dependent cellular Cytotoxicity of Trypanosoma cruzi. Characterization of the Effector Cell from Normal Human Blood. Infect. Immun. 25(1): 34-38.
59. MCHARDY, N. (1977) Passive Immunization of mice against T.cruzi using convalescent mouse serum. Tropenmed. Parasit. 28: 195-201.

60. Mc HARDY, N. (1978) Immunization of mice against Trypanosoma cruzi the effect of chemical treatment or immune on Epimastigote vaccine. Trop. Parasit. 29: 215-222.
61. MEIRELLES, M.N.L.; CHIARI, E. & de SOUZA, W. (1982) Interaction of bloodstream, tissue culture-derived and axenic culture-derived trypomastigotes of T. cruzi with macrophages. Acta Trop. 39: 195-203.
62. MELO, C. & BRENER, Z. (1978) Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains. J. Parasitol. 64(3): 475-482.
63. MENEZES, H. (1968) Protective effect of an avirulent (cultivated) strain of Trypanosoma cruzi against experimental infection in mice. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 10: 1-4.
64. -----; (1970) Essays on immunization of mice with ultraviolet radiated virulent and avirulent culture forms of Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 12: 310-319.
65. MILES, M.A. (1976) Human Behaviour and Propagation of Chagas' disease. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 70(5/6): 521-522.
66. NOGUEIRA, N.; CHAPLAN, S. & COHN, Z. (1980) Trypanosoma cruzi: factors modifying ingestion and fate of blood form trypomastigotes. J. Exp. Med. 152: 447-451.
67. ----- ; -----; TYDINGS, J.D.; UNKELESS, J. & COHN, Z. (1981) Surface Antigens of Blood and Culture Forms. J. Exp. Med. 153: 629-639.
68. ----- ; UNKELESS, J. & COHN, Z. (1982) Specific glycoprotein antigens on the surface of insect and mammalian stages of T. cruzi. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 168-174.

69. NORMAN, L. & KAGAN, I.G. (1960) Immunologic studies on Trypanosoma cruzi. II- Acquired immunity in mice infected with avirulent American strains of T. cruzi. J. Infect. Dis. 107: 168-174.
70. NUSSENWEIG, V.; DEANE, L.M. & KLOETZEL, J. (1963) Differences in antigenic constitution of strains of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasitol. 14: 221-232.
71. ----- ; KLOETZEL, J. & DEANE, L.M. (1963) Acquired Immunity in mice infection with strains of immunological types A and B of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasitol. 14: 233-239.
72. 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 Trypomastigote Bloodstream forms. Immunopathology 16: 344-353.
73. PEREIRA da SILVA, L.H. & NUSSENWEIG, V. (1953) Sobre uma cepa de / Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo albino. Folia. Clin. Biol. 20: 191-207.
74. PESSOA, A.S.B. & MARTINS, A.V. Trypanosomatides - Gênero Trypanosoma. In: Pessoa Parasitologia Médica. Edit. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 10ª ed. pp. 143-190 (1978).
75. POSTAN, M.; DVORAK, J.A. & McDANIEL, J.P. (1983) Studies of Trypanosoma cruzi clones in Inbred Mice. I. A comparasion of the course of infection of C₃H/HEN mice with two clones isolated from a commom source. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32(3): 497-506.

76. POSTAN, M.; McDANIEL, J.P. & DVORAK, J.A. (1984) Studies of Trypanosoma cruzi clones in Inbred mice. II- Course of infection of C₅₇B1/6 mice with single-cell-isolated stocks. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33(2): 236-238.
77. RAMOS, C.; LAMOYI, E.; FEOLI, M.; RODRIGUEZ, M.; PEREZ, M. & ORTIZ-ORTIZ, L. (1978) Trypanosoma cruzi: Immunosupressed Response to different antigens in the infected mouse. Exp. Parasitol. 45: 190-199.
78. ----- ; SCHADTHER-SIWON, I. & ORTIZ-ORTIZ, L. (1979) Supressor cells present in the spleens of Trypanosoma cruzi infected mice. J. Immunol. 122: 1243-1247.
79. REED, S.G. (1980) Adoptive transfer of resistance to acute Trypanosoma cruzi infection with T-lymphocyte-Enriched Spleen Cells. Infect. Immun. 28(2): 404-410.
80. REPKA, D.; RANGEL, H.A. & BELLUCI, S.B. (1979) Immunochemical study lysates of epimastigote forms of Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909) Rev. Bras. Biol. 39: 721-733.
81. /----- ; CAMARGO, I.J.B.; SANTANA, E.M.; CUNHA, W.M.; SOUZA, O.C.; SAKURADA, J.K. & RANGEL, H.A. (1980) Surface antigenic determinants of epimastigote forms commom to trypomastigote and amastigote forms of different strains of Trypanosoma cruzi. Tropenmed. Parasit. 31: 239-246.
82. ----- ; GAVINO, V.A.; ATTA, A.M.; PIEDRABUENA, A.E. & RANGEL, H.A. Chagas' disease infection in mice infected with low doses of parasites. Rev. Brasileira de Biologia (in press).
83. ROBERSON, E.L.; CHAPMAN, W.L. & HANSON, W.L. (1973) The effects of total body X irradiation on Trypanosoma cruzi infection (Chagas' disease) in mice and rats. Z. Parastenked. 41: 84-94.

84. ROBERSON, E.L; HANSON, W.L. & CHAPMAN, W.L. (1973) Trypanosoma cruzi: effects of anti-thymocytes serum in mice and neonatal thymectomy in rats. Exp. Parasitol. 34: 168-173.
85. ----- & ----- (1974) Transfer of immunity to Trypanosoma cruzi. Trans. Roy. Trop. Med. Hyg. 68: 338-.
86. RODRIGUEZ, A.M.; SANTORO, F.; AFCHAIN, D.; BAZIN, H. & CAPRON, A. (1981) Trypanosoma cruzi infection in B-Cell-Deficient rats. Infect. Immun. 31(2): 524-529.
87. ----- ; AFCHAIN, D.; SANTORO, F., BAZIN, H. & CAPRON, A. (1983) Parasitological and Immunological Aspects of Trypanosoma cruzi Infection in Nude rats. Parasitolog. Research. pp. 143-147.
88. SALGADO, J.A.; GARCEZ, P.N.; OLIVEIRA, C.A. & GALIZZI, (1962) Revisão Clínica Atual do Primeiro Caso Humano Descrito da Doença de Chagas. Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo. 4(5): / 330-337.
89. SCHMUNIS, G.A.; GONZALEZ-CAPPA, S.M.; TRAVERSA, D.C. & YANOVSKY, J.F. (1971) The effect of immunodepression due to neonatal thymectomy on infection with Trypanosoma cruzi in mice. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg. 65: 89-94.
90. -----; SZARFMAN, A.; LANGEMBACH, T. & De SOUZA, W. (1978) Induction of capping in blood-stage trypomastigote of Trypanosoma cruzi by human anti-Trypanosoma cruzi antibodies Infect. Immun. 20(2): 567-569.
91. SCOTT, M.T. & SNARY, D. (1979) Protective immunization of mice using cell surface glycoprotein from T.cruzi. Nature 282(1):73-74.

92. SCOTT, M.T. (1981) The nature of immunity against Trypanosoma cruzi in mice recovered from acute infection. *Parasit. Immunol.* 3: 209-218.
93. SEAH, S. & MARSDEN, P.D. (1969) Protection of mice against a virulent strain of Trypanosoma cruzi by previous inoculation with a avirulent strains. *Am. of Trop. Med. Parasitol.* 63: 211-214.
94. SILVA, E.O. da R. (1979) Profilaxia - Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas (Eds. Z. Brener e Z. Andrade) Edt. Guanabara, Rio de Janeiro. pp. 425-449.
95. TARLENTON, R.L., SCHAFER, R. & KUHN, R.E. (1983) Effects of Extracts of Trypanosoma cruzi on Immune Response Induction of a non specific suppressor factor. *Infect. Immun.* 41(3): 978-986.
96. 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.
97. TEIXEIRA, A.R.L.; TEIXEIRA, M.L. & SANTOS-BUCH, C.A. (1975) The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *Am. J. Pathol.* 80: 163-179.
98. ----- ; (1979) Chagas'disease trends in immunological research and prospects for immunoprophylaxis. *Bull. W.H.O.* 57(5): 697-710.

99. TRISCHMAN, T.; TANOWITZ, H.; WITTNER, M. & BLOOM, B. (1978)
Trypanosoma cruzi: Role of Immune response in the Natural
Resistance of Inbred Strains in mice. Exp. Parasitol.
45: 160-168.
100. -----; BLOOM, B. (1980) Trypanosoma cruzi: Ability of
T-Cell-Enriched and Depleted Lymphocytes populations to
Passively Protect Mice. Exp. Parasitol. 49: 225-232.
101. TUCHYA, H.N.; MENDES, I.F.; MIYAKI, C. & RIZZO, E. (1980)
Study on the growth promotion capacity of calf serum for
animal cells "in vitro" I. Test of 56 lots of calf serum
against several cell lines and primary cell cultures. Rev.
Inst. Med. Trop. São Paulo. 22(6): 281-285.
102. URDANETA-MORALES, S. (1983) Trypanosoma cruzi: Attenuation of
virulence by culture in tissues. Ann. Parasitol. Hum. Comp.
58(4): 317-324.
103. VIEIRA, G.O.; MAGUIRE, J.; BITTENCOURT, A.L. & FONTES, J.A.S.
(1983) Doença de Chagas Congênita. Apresentação de um caso
com paralisia cerebral. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo. .
25(6): 305-309..
104. WRIGHTSMAN, R.; KRASSER, S. & WATSON, J. (1982) Genetic Control
of Response to Trypanosoma cruzi in mice: Multiples Genes
Influencing Parasitemia and Survival. Infect. Immun.
36(2): 637-644.
105. -----; -----; ----- & NANNING, J.E. (1984)
Role of the H-2 Haplotype in Survival. Infect. Immun.
44(2): 351-354.

106. ZINGALEZ, B.; ANDRADE, N.W.; KUWAJIMA, V.Y. & COLLI, W. (1982)

Cell surface antigens of Trypanosoma cruzi: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. Mol. Biochem. Parasitol. 6: 111-124.