

## ARTIGOS

### ESTUDO IMUNOBIOLOGICO DE ESTOQUES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* ISOLADOS DE PACIENTES NA FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS

#### 1. Principais parâmetros da infecção produzida no camundongo

T.L. Kipnis, P.M. Minóprio, A.O. Luquetti, A. Rassi e W. Dias da Silva

*Estoques de tripanossomas isolados de pacientes na fase aguda da doença de Chagas foram injetados em grupos de camundongos albinos não isogênicos nas doses de  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  parasitas/camundongos. O curso da infecção foi seguido por três meses. A parasitemia foi em geral baixa, com picos recorrentes, na maioria das vezes os animais evoluíram para cronicidade. Somente um estoque induziu alto índice de mortalidade. Os parasitas e as lesões apesar de detectadas no pico da parasitemia e restritos ao coração estavam ausentes aos três meses. Nesta época os perfis de Igs apresentaram diferenças marcantes. Grupos de animais que foram inoculados com estes estoques foram desafiados com doses letais da cepa Y ou CL. Em alguns casos obteve-se uma parasitemia, mas patente.*

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Estoques. Cepas. Isotipos de IgG.

Os mecanismos acionados pelo sistema imunitário dos hospedeiros vertebrados no decurso da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* vêm sendo intensivamente investigados usando-se como modelo básico, a infecção de animais de laboratório tais como camundongos, rato, coelho e mais raramente primatas com cepas de *T. cruzi* mantidas em laboratório, via de regra, por passagens sucessivas de camundongo a camundongo. Abstraindo-se a questão sobre se os hospedeiros comumente usados seriam os mais adequados para esclarecer os fenômenos imunopatológicos ou imunobiológicos que acontecem na doença humana ou no "equilíbrio de convivência" entre o parasita e seus reservatórios silvestres, pelo menos duas perguntas hão de ser feitas: a) As diferentes cepas de *T. cruzi* extensivamente empregadas como agentes ou fontes de agentes imunizantes são potencialmente capazes de acionar os mecanismos imunitários funcionantes nas infecções naturais? b) O emprego de tais cepas como células-alvo no estudo dos diferentes

mecanismos imunes efetores, tanto humorais como celulares, fornece informações transferíveis para os mecanismos efetores similares, desencadeados pelos tripanossomas presentes nos reservatórios silvestres e/ou causando doença humana nas zonas endêmicas?

A pertinência de tais questões reforça-se pelo fato já amplamente documentado, de que, apesar da grande semelhança morfológica e antigênica existente entre as cepas conhecidas de *T. cruzi*, estudos experimentais têm revelado acentuadas diferenças entre cepas com respeito, principalmente, à capacidade de sobrevivência e/ou multiplicação ou diferenciação do parasita dentro de certas células<sup>29</sup> e sua susceptibilidade à ação de um particular mecanismo imune efector<sup>1 10 12</sup>.

Com o objetivo de tentar esclarecer essas questões decidimos analisar alguns parâmetros imunobiopatológicos de estoques de *T. cruzi* colhidos de pacientes não tratados, na fase aguda da doença de Chagas e provenientes da mesma área endêmica. No presente trabalho, são apresentados os resultados relativos à infectividade, virulência, distribuição tecidual dos parasitos e lesões, e estimulação da produção policlonal de IgG durante a infecção experimental produzida em camundongos não isogênicos com 10 diferentes estoques recentemente isolados de *T. cruzi*.

Trabalho financiado por FAPESP, CNPq e UNDP/World Bank/WHO. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Departamento de Parasitologia, Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás e Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás.

Recebido para publicação em 9/5/1983.

## MATERIAL E MÉTODOS

Estoques de *T. cruzi* – No presente trabalho foram usados 10 estoques de *T. cruzi* obtidos de pacientes não tratados e na fase aguda da doença de Chagas. Logo em seguida ao fechamento do diagnóstico por meio de exames clínico e laborato-

rial, os pacientes eram submetidos ao xenodiagnóstico com *Triatoma infestans*. Na Tabela 1 encontram-se os dados referentes aos pacientes dos quais foram isolados os estoques de *T. cruzi* utilizados. As cepas de *T. cruzi* Y e CL, usadas como parâmetro, são mantidas neste laboratório através de passagens sucessivas de camundongo para camundongo.

Tabela 1 – Dados referentes aos pacientes dos quais foram isolados os estoques de *Trypanosoma cruzi*

Identificação					Características Clínicas							Exames					
Nº estoque	iniciais	sexo	idade	município (1)	zona	dias da infecção	porta de entrada	febre	hipertrofia linfonodos	hepatomegalia	esplenomegalia	edema subcutâneo	miocardite (2)	direto (3)	sorologia – IgM	Imunofl. IgG	FC (4)
1	ERS	M	8	Montal.	rural	17	Romaña	sim	sim	não	não	sim	não	+	16	64	2,8
2	MRSF	F	4	Montal.	urbana	12	Ausente	não	sim	não	não	sim	não	+	16	64	1,8
3	MLSG	F	12	Montal.	urbana	27	Romaña	sim	sim	não	não	sim	não	+	1.024	24	2,8
4	SLJ	F	62	Montal.	rural	32	Chagoma	sim	sim	não	não	não	não	+	128	256	2,2
5	CPO	F	53	Carinh.	rural	20	Chagoma	sim	não	sim	não	não	não	+	40	80	AC <sup>5</sup>
6	DPS	F	10	Barr.	rural	55	Romaña	sim	sim	sim	sim	não	não	+	128	256	2,7
7	AHML	M	10	Montal.	rural	14	Romaña	sim	não	não	sim	sim	não	+	10	20	2,8
8	ICF	F	10	Montal.	rural	14	Romaña	sim	sim	sim	não	não	não	+	5	20	2,8
9	HVNM	M	12	Montal.	rural	13	Chagoma	sim	não	sim	não	não	não	+	+	80	2,8
10	RST	M	10	Coteg.	rural	20	Chagoma	sim	sim	sim	sim	sim	não	+	+	+	1,8

(1) Refere-se ao município onde foi contraída a doença – Montal.: Montalvânia (MG), Carinh.: Carinhanha (BA), Barr.: Barreiras (BA), Cotegipe (BA)

(2) Miocardite pesquisada por eletrocardiograma e radiografia de tórax seriados.

(3) Pesquisa a fresco do sangue periférico entre lâmina e lamínula.

(4) Fixação do complemento pela técnica de Freitas e Almeida (4), realizada pelo Dept<sup>o</sup> de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Fac. de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

(5) Soro anticomplementar – AC.

Obtenção das formas metacíclicas – Os triatomíneos foram anestesiados com éter, presos sobre pranchas de dissecação, o abdome aberto, o trato digestivo dissecado, o reto retirado e aberto e o seu conteúdo depositado em placas de Petri contendo tampão fosfato-salina, pH 7, 5,  $\mu = 0.15$  (TFS), e penicilina (500 U/ml) é estreptomomicina (500  $\mu$  g/ml). Após passagem em gaze, as formas metacíclicas foram enumeradas e inoculadas pela via intraperitoneal (i.p.) em camundongos A/Sn ou C3H/He previamente irradiados com 570 rads (fonte de Césio) e a parasitemia avaliada a cada 3 dias.

Obtenção dos tripomastigotas sanguíneos – Uma vez obtidas parasitemias patentes, os animais foram sangrados, o sangue misturado com igual volume de TFS contendo 5 U/ml de heparina, os tripanossomas enumerados e as suspensões ajustadas para  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  formas tripomastigotas/ml. Tripomastigotas sanguíneos das cepas Y e CL eram obtidos também de camundongos A/Sn ou C3H/He previamente irradiados. Para a execução dos experimentos, formaram-se grupos homogêneos de 7 camundongos albinos, não isogênicos e com 5 a 6 semanas de idade pesando  $17 \pm 1$  g. Para cada estoque ou cepa de tripanossomas foram usados 3 grupos de camundongos machos e 3 grupos de camundongos fêmeas, designados IF e IM, IIF e IIM, IIIF e IIIM. Estes camundongos foram injetados i.p. com 1,0ml das suspensões  $10^3$ /ml (grupos IF e IM),  $10^4$ /ml (grupos IIF e IIM) e  $10^5$ /ml (grupos IIIF e IIIM). Os experimen-

tos de reinfeção destinados a verificar a possível indução de imunização cruzada foram feitos utilizando-se grupos de 6 a 7 camundongos que evoluíram para a cronicidade. Três meses após a primoinfeção, os camundongos eram reinoculados com  $10^5$  tripomastigotas sanguíneos das cepas Y e CL também obtidas de camundongos previamente irradiados.

Preparo dos tecidos para exames histopatológicos – De cada grupo foram retirados 3 camundongos com parasitemia patente, os quais eram sacrificados e fragmentos de coração, baço, diafragma, fígado, esôfago, duodeno, colo e ceco, fixados em líquido de Bouin e os cortes obtidos corados pela hematoxilina-eosina. Fragmentos de tais órgãos foram obtidos, também, de camundongos na fase crônica (3 meses) da infecção e processados da mesma maneira.

Preparo dos tripanossomas para exames morfológicos – Suspensões ricas em tripanossomas eram depositadas sobre lâminas, os parasitos fixados com metanol e as lâminas coradas pelo método de Giemsa.

Avaliação da parasitemia – Foi usado o método descrito por Brener<sup>5</sup>.

Fracionamento dos soros de camundongo em coluna de proteína

A – Sepharose – Lotes de 6 camundongos eram sangrados aos 3 meses após a infecção e os

soros obtidos passados em filtros de Millipore (Millipore, Co.) com poros de 0,2  $\mu$ m. Dois mililitros de soro eram misturados com igual volume de tampão-tris-HCl, pH 8, 6,  $\mu$  = 0.15 e passados na coluna de proteína A-Sepharose previamente equilibrada com este mesmo tampão. Após lavagem da coluna com este tampão até a absorvância do efluente atingir valores próximos de 0,02 os diferentes isótipos de IgG eram eluídos, sucessivamente, com os tampões fosfato-salina, pH 7,0,  $\mu$  = 0.15, citrato-ácido cítrico-salina, pH 5, 5,  $\mu$  = 0.15, fosfato-salina, pH 4,3,  $\mu$  = 0.15 e glicina-HCl salina, pH 2, 8,  $\mu$  = 0.15. Os efluentes correspondentes a cada eluição eram reunidos, o teor em proteínas determinado pelo método de Lowry e col.<sup>10</sup> e referido em termos de proteínas totais eluídas por tampão. Na padronização preliminar da coluna utilizando misturas de soros de camundongos na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* e soros monoespecíficos anti-isótipos de IgG de camundongos, verificou-se que o tampão pH 5,5 eluiu, predominantemente, IgG1, o tampão

pH 4,3 eluiu IgG2b e o tampão pH 2,5, Ig2a com traços de IgG2b. IgG3 não foi detectado. Os antissoros monoespecíficos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Ivan Mota – Departamento de Imunologia, ICB, USP e as análises feitas pelo método de dupla-difusão em gel de agarose.

Pesquisa de anticorpos específicos – Foi utilizado o método descrito por Freitas e Almeida<sup>7</sup> para a fixação do complemento e o método da imunofluorescência indireta<sup>6</sup> para dosar os anticorpos específicos.

## RESULTADOS

Características gerais da infecção experimental – Na Tabela 2 e Figura 1 encontram-se os principais dados referentes às infecções produzidas em camundongos não isogênicos com  $10^5$  tripomastigotas pertencentes aos 10 diferentes estoques de *T. cruzi* recentemente isolados de pacientes na fase aguda da doença de Chagas.

Tabela 2 – Características das infecções produzidas em camundongos não isogênicos por diferentes estoques de *Trypanosoma cruzi* isolados de pacientes na fase aguda da doença de Chagas<sup>a</sup>.

Identificação do estoque	Sexo do paciente	Sexo do camundongo	Dias dos picos <sup>b</sup>					Número de camundongos mortos	Dia da Morte			Parasitemia ( $10^3$ ml de sangue)	
9 HVNM	M	F	31	38	45			3/7	24	31	33	0,2	
		M	15	25	37	45	50	0/7	24(1)	31(1)		0,2	
8 ICF	F	F	22	33	44			0/7				0,3	
		M	23	33	60			0/7				2,3	
3 MLSG	F	F	23					5/7	37			2,3	
4 SLJ	F	F	18					1/7	33(1)			2,4	
		M	24	42				1/7	39(1)			15,4	
5 CPO	F	F	14					0/7				2,5	
10 RST	M	F	10	20				1/7	45(1)			4,0	
		M	27					0/7				7,1	
1 ERS	M	F	26	43				2/7	36(1)	43(1)		6,1	
2 MRSG	F	F	18	24				0/7				9,2	
		M	18	24				0/7				23,6	
6 DPS	F	F	15					0/7				9,8	
		M	13					7/7	13(1)	15(6)		22,6	
7 AHML	M	F	8					7/7	8(2)	10(2)	12(1)	14(1)	29,9
		M	8					6/7	10(5)	12(1)			30,5
CEPA CL		F	12					3/8	18(3)				10,0
		M	12					7/7	7(1)	12(1)	18(5)		26,3
CEPA Y		F	7					7/7	9(1)	11(6)			17,0
		M	7					7/7	7(2)	9(5)			26,5

(a) Dados referentes ao inóculo de  $10^5$  tripomastigotas

(b) Valores das parasitemias indicadas entre 6 parasitemias x  $10^5$  ml de sangue

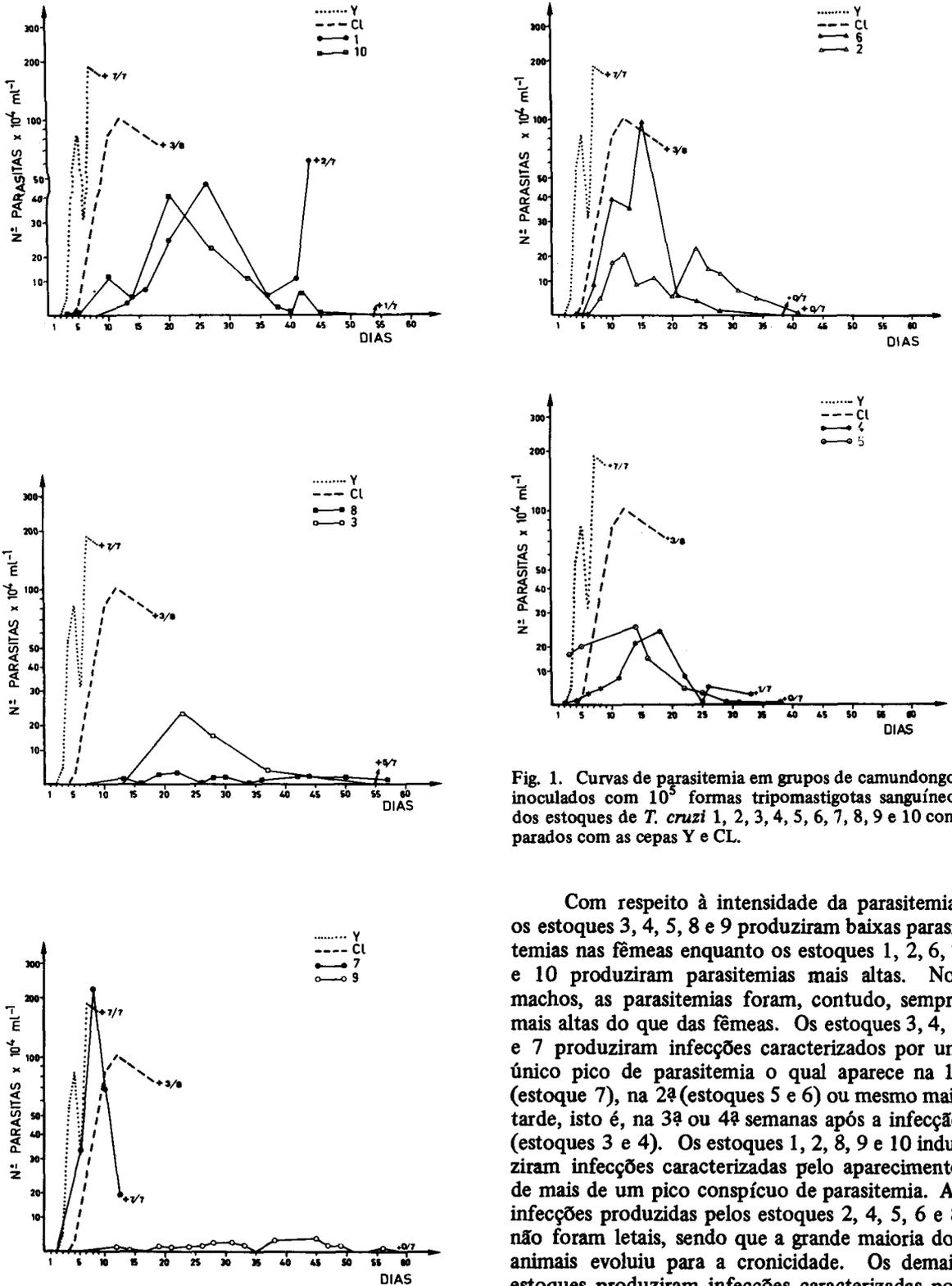


Fig. 1. Curvas de parasitemia em grupos de camundongos inoculados com  $10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas dos estoques de *T. cruzi* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 comparados com as cepas Y e CL.

Com respeito à intensidade da parasitemia, os estoques 3, 4, 5, 8 e 9 produziram baixas parasitemias nas fêmeas enquanto os estoques 1, 2, 6, 7 e 10 produziram parasitemias mais altas. Nos machos, as parasitemias foram, contudo, sempre mais altas do que das fêmeas. Os estoques 3, 4, 5 e 7 produziram infecções caracterizados por um único pico de parasitemia o qual aparece na 1ª (estoque 7), na 2ª (estoques 5 e 6) ou mesmo mais tarde, isto é, na 3ª ou 4ª semanas após a infecção (estoques 3 e 4). Os estoques 1, 2, 8, 9 e 10 induziram infecções caracterizadas pelo aparecimento de mais de um pico conspícuo de parasitemia. As infecções produzidas pelos estoques 2, 4, 5, 6 e 8 não foram letais, sendo que a grande maioria dos animais evoluiu para a cronicidade. Os demais estoques produziram infecções caracterizadas por

letalidade variável de acordo com o sexo do camundongo. Neste particular, sobressaem os estoques 3, 6 e 7, os quais produziram mortalidade elevada sendo que o estoque 6 só induz em camundongos machos. A diferença na virulência dos estoques de *T. cruzi* foi analisada com inóculos de  $10^3$  e  $10^4$  tripanossomas de dois estoques polares com respeito a este parâmetro, o estoque 7 virulento e o estoque 8 avirulento. Verificou-se que o estoque 7 induziu mortalidade mesmo com inóculos menores. Finalmente, como observação adicional, o estoque de virulência mais pronunciada (estoque 7) produziu infecção com padrão similar à produzida pela cepa Y. Nenhum dos estoques restantes produziu infecção semelhante à produzida pela cepa CL.

Distribuição tecidual dos parasitos e das lesões — O exame histopatológico de cortes do coração colhidos à época dos picos de parasitemia revelou, consistentemente, a presença de pseudocistos contendo amastigotas nas fibrocélulas cardíacas, principalmente naquelas das paredes ventriculares. Infiltrados constituídos predominantemente por células mononucleares ao lado de uma quantidade variável, porém substancial, de leucócitos polimorfonucleares, constituiu achado freqüente não só próximos a pseudocistos íntegros ou rompidos, mas mesmo em áreas dos cortes de coração aparentemente sem células contendo formas amastigotas de *T. cruzi*. Nos cortes de coração obtidos de camundongos na fase crônica da infecção, tanto pseudocistos de amastigotas como

lesões características da miocardite descrita acima foram, de outro lado, consistentemente ausentes.

O exame histopatológico dos demais órgãos, isto é, baço, diafragma, fígado, esôfago, duodeno, jejuno-íleo, colo e ceco, não revelou a presença de pseudocistos de amastigotas, salvo em um caso (estoque 7) no qual foram encontrados raros pseudocistos no baço. O exame dos tripanossomas corados pelo Giemsa revelou a presença, tanto de formas finas como de formas largas, nas preparações obtidas dos 10 estoques estudados.

Resistência à infecção — Na Tabela 3 estão representados os resultados de tentativa de reinfecção de camundongos sobreviventes à primo-infecções com alguns estoques de *T. cruzi* e, posteriormente, desafiados com inóculos de tripomastigotas sanguíneos das cepas Y e CL. Pelo fato dos camundongos fêmeas serem mais resistentes à infecção pelo *T. cruzi*, decidiu-se usar somente camundongos deste sexo no experimento. Os resultados mostram que camundongos na fase crônica da infecção produzida pelos tripanossomas do estoque 7 são resistentes à reinfecção por tripanossomas das cepas Y e CL; enquanto que camundongos na fase crônica da infecção produzida por tripanossomas dos estoques 2, 5 e 8 apresentam parasitemia discreta após desafio com tripanossomas de cepa CL. Os camundongos primo-infectados com o estoque 5 não apresentaram parasitemia patente após a infecção pela cepa Y.

Tabela 3 — Resistência induzida pela primo-infecção com alguns estoques de *Trypanosoma cruzi* isolados de pacientes na fase aguda da doença de Chagas à reinfecção.

Camundongos primo-infectados <sup>a</sup>	Inóculo	Desafio com $10^5$ tripanossomas:			
		Cepa Y		Cepa CL	
Estoque nº		Parasitemia	Letalidade	Parasitemia	Letalidade
2	$10^4$	—	—	+	0
(7) <sup>b</sup>	$10^5$	+	0	+	0
5	$10^5$	0	0	+	0
(7)					
7 <sup>c</sup>	$10^3$	0	0	0	0
(6)					
8	$10^3$	+	0	+	0
(7)					

a — Camundongos não isogênicos primo-infectados e desafiados 4 meses depois com parasitemia negativa.

b — Número de camundongos desafiados com as cepas Y e CL.

c — Camundongos primo-infectados com  $10^3$  formas sanguíneas.

porém não na fase crônica da infecção. Como 8 destes estoques de tripanossomas foram obtidos de indivíduos provenientes do mesmo município, a variabilidade dos diferentes estoques poderia ser atribuída a um efeito seletivo exercido pelo próprio hospedeiro. Tal suposição, conquanto necessite estudos mais cuidadosos, é reforçada pelo fato de os estoques 2 e 3 haverem sido isolados simultaneamente de duas irmãs, habitantes de uma mesma casa e que contraíram a infecção à mesma época, uma na fase aguda sintomática e a outra, oligossintomática ou alternativamente os parasitos destes estoques poderiam induzir imunossupressão em alguns hospedeiros<sup>14</sup>. Tal variabilidade foi também notada, quando animais na fase crônica da infecção produzida por alguns destes estoques eram desafiados com inóculos letais de tripanossomas das cepas Y ou CL. Observou-se, em alguns casos, (estoques 2, 5 e 8) parasitemias baixas, porém patentes, após o inóculo desafiante. Esta variação poderia ser devido a: I) diferenças na capacidade de modificar os processos de imunoregulação em funcionamento durante a infecção ou II) a presença nos tripanossomas de alguns epítomos diferentes. De outro lado, a existência de epítomos comuns é evidente face os resultados de imunoproteção cruzada. Experimentos recentes mostraram que camundongos infectados com tripanossomas da cepa Y produzem anticorpos predominantemente confinados aos isotipos IgG2a e IgG2b, porém ausentes ou em níveis muito baixos no isotipo IgG1<sup>17</sup>. O fracionamento dos soros dos camundongos infectados com alguns destes estoques em coluna de proteína A-Sepharose, revelou que as quantidades de IgG eluídas com tampões de pH 6,5, pH 5,5 e pH 2,5 e cujos eluatos contém respectiva e predominantemente IgG1, IgG2b e IgG2b + IgG2a, variam consideravelmente segundo a origem dos tripanossomas inoculados. Assim, contrariamente ao que ocorre com a cepa Y a qual induz restrição seletiva de IgG1 específica, a cepa CL e o estoque 4 produzem um aumento na produção deste isotipo de IgG. Com respeito ao isotipo IgG2a, entre os 5 tripanossomas estudados, (cepa CL e estoques 4, 7, 8 e 10) somente o estoque 10 não induziu restrição de síntese. Finalmente, com relação ao isotipo IgG2b, observou-se restrição de síntese deste isotipo pelos estoques 7 e 8 e uma significativa potenciação pelo estoque 4. Estes resultados, conquanto preliminares, sugerem que a restrição seletiva de isotipos de IgG no curso da infecção pelo *T. cruzi*, provavelmente controlada pelo repertório antigênico do parasito se constitui em um dos mecanismos determinantes do direcionamento da infecção ou para o equilíbrio (fase

crônica) ou para o desequilíbrio (morte do hospedeiro). Tal hipótese não é improvável, uma vez que dois mecanismos efetores admitidos serem importantes no controle da infecção, isto é, lise induzida por anticorpo e complemento<sup>10</sup> e a citotoxicidade medida por anticorpos e por células<sup>11 12 15</sup> envolvem a participação de IgG2b. Com o propósito de esclarecer o papel dessa regulação — disregulação na produção dos vários isotipos de IgG no destino da infecção, a síntese específica e inespecífica destas imunoglobulinas ao longo da infecção por tripanossomas de diferentes estoques, está sendo investigada neste laboratório. — Os dados da Tabela 1 mostram que nos 10 pacientes dos quais foram isolados os estoques de *T. cruzi* utilizados neste trabalho, a doença apresentou-se com características variáveis. Assim, sinal de Romã ou Chagoma acompanhados de febre presentes em alguns pacientes eram ausentes em outros. Hipertrofia de linfonodos, hepatomegalia e esplenomegalia conquanto observadas na maioria dos pacientes não foram detectados em alguns. Constantes entretanto, foram a presença de parasitos e de anticorpos específicos no sangue circulantes, este último fato indicando reatividade imunológica. Com respeito a estes dados os pacientes MLSG, SLJ e DPS fornecedores dos estoques de *T. cruzi* de nº 3, 4 e 6, respectivamente, apresentaram títulos muito elevados de anticorpos IgM, os dois últimos acompanhados também por altos títulos de IgG detectados por imunofluorescência indireta. Estas diferenças observadas na evolução da doença adquirida “in natura” reproduziram-se também, embora com outros parâmetros de avaliação, nas infecções experimentais produzidas em camundongos por estes estoques de *T. cruzi*. Tomando-se o parâmetro parasitemia, apenas os estoques 2 e 3 mostraram perfis parasitêmicos semelhantes, os quais, por coincidência, são provenientes dos pacientes MRSG e MLSG duas irmãs que habitavam uma mesma casa. Pelo parâmetro virulência, alguns estoques como por exemplo os de nº 7 produziram índices elevados de mortalidade enquanto os demais são de baixa virulência ou mesmo são incapazes de produzir doença de evolução fatal. Com respeito à produção dos diferentes isotipos de IgG nos estoques estudados foram observadas variações marcantes como por exemplo, a produção de IgG2a pelo estoque 10 e de IgG2b pelo estoque 4, enquanto que grandes quantidades de IgG1 foram produzidas pela cepa CL e estoque 4. É óbvio que isto se deve à diferenças acentuadas na capacidade dos tripanossomas dos diferentes estoques em estimular o sistema imunitário. Isto se reflete pelo menos em certo grau na

intensidade da resistência à reinfecções adquiridas pelos animais na fase crônica da infecção. Muito embora todos os estoques tenham a capacidade de induzir imunidade cruzada a inóculos-desafios com tripanossomas virulentos das cepas Y ou CL esta resistência em certos casos, era menos pronunciada. Isto se deve, provavelmente, à presença de repertórios antigênicos comuns e diferentes na superfície dos tripanossomas estudados. Tais diferenças poderiam responder pelo menos em parte pelas variações nos padrões das infecções por eles induzidas.

Este fato já tem sido assinalado por vários autores<sup>3, 4</sup> em cepas de *T. cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano, e de pacientes crônicos<sup>1, 6</sup>. No presente trabalho os autores encontraram resultados similares em pacientes na fase aguda. Seria recomendável no futuro o estudo do comportamento de tripanossomas isolados de pacientes na fase aguda assintomática, por ser esta a forma mais freqüente<sup>1, 3</sup>. Uma das razões pelas quais os pesquisadores preferem a utilização de cepas altamente virulentas é a facilidade de obtenção de um grande número de parasitos, porém, desde que acreditamos ter demonstrado junto com outros autores, que na doença humana este não é o padrão dominante de infecção justifica-se assim o estudo dos estoques menos virulentos com o objetivo de obter resultados comparáveis aos da doença humana. Ressalte-se que neste caso a mortalidade via de regra é inferior a 10% como aconteceu na maioria dos camundongos inoculados com os diferentes estoques utilizados no presente estudo.

Em conclusão, os nossos resultados permitem assinalar a importância do estudo de outras cepas, convenientemente caracterizadas, em futuros estudos experimentais. O fato de ter-se achado apenas um estoque com as características de virulência assinaladas para as cepas comumente empregadas nas infecções experimentais, CL, Tulahuén e outras permite pressupor-se que na infecção natural em humanos, prevalecem populações de tripanossomas com características bem menos virulentas que as descritas na literatura.

#### SUMMARY

Ten stocks of trypanosomes isolated from patients at the acute phase of Chagas' disease were injected into groups of outbred normal mice at the doses of  $10^3$ ,  $10^4$  and  $10^5$  parasites/mouse and the course of the infections followed up for 3

months. The parasitemia was usually low, with recurrent peaks, the animals evolving to chronicity, only one of them inducing high ratio of mortality. Patterns of parasitemia and mortality were essentially different for each stock studied; only one stock did show similar patterns to well known strains (Y and CL) commonly used in experimental work.

Parasites and lesions, although detected at the peak of parasitemia and restricted to heart were absent after three months. At this period the Igs profiles showed striking differences with respect to their distribution. Groups of mice that had been inoculated with one of the stocks were challenged with the Y or CL strains.

In some instances low parasitemias although patent were seen after the infecting dose.

Key words: *Trypanosoma cruzi*. Chagas' Disease. Stocks. Strains. IgG isotypes.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. José Florisval de Ornelas pelo encaminhamento dos pacientes da região de Montalvânia e ao Prof. Dr. Ivan Mota, ICB, USP e Centro de Imunologia da OMS pela realização dos testes de dupla-imunodifusão para detecção dos isotipos de IgG de camundongos. Agradecem também ao Dr. Benedito A. Peres do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pela realização dos testes de Imunofluorescência e Hemaglutinação passiva.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrahamsohn IA, Dias da Silva W. Antibody dependent cell mediated cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. Parasitology 75: 317-323, 1977.
2. Alcantara A, Brener Z. The *in vitro* interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. Acta Tropica 35: 209-219, 1978.
3. Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isolados no Recôncavo Baiano. (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de chagas em nosso meio). Revista de Patologia Tropical 3: 65-121, 1974.

4. Andrade SG. Tentative for grouping different Trypanosome strains in some types. Revista do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo 18: 140-141, 1976.
5. Brener Z. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. Tese Universidade de Minas Gerais, Brasil, 1961.
6. Camargo ME. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved cultured forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 8: 227-234, 1966.
7. Freitas JLP, Almeida JO. Nova técnica de fixação do complemento para moléstia de Chagas. Reação quantitativa com antígeno gelificado de culturas de *Trypanosoma cruzi*. Hospital 35: 787-800, 1949.
8. Hauschka TS. Sex of host as a factor in Chagas' disease. Journal of Parasitology 33: 399-404, 1947.
9. Kipnis TL, Calich VLG, Dias da Silva W. Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* in to macrophages. Parasitology 78: 89-98, 1979.
10. Krettli AU, Brener Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. The Journal of Immunology 116: 755-760, 1976.
11. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Far AL and Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biochemistry 193: 265-275, 1951.
12. Okabe K, Kipnis TL, Calich VLG, Dias da Silva W. Cell mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*: Antibody dependent cell mediated cytotoxicity to Trypomastigote bloodstream forms. Clinical Immunology and Immunopathology 16: 344-353, 1980.
13. Rassi A. Clínica: Fase Aguda. In Brener Z e Andrade Z (ed) *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, 1ª edição. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro p. 249-264, 1979.
14. Reed SG, Larson CL, Speer CA. Suppression of cell mediated immunity in experimental Chagas' disease. Zeitschrift Parasitenkunde 55: 11,17, 1977.
15. Sanchez GA, Krettli AU, Brener Z. In: Resumos da IX Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambú, Brasil p. 77, 1982.
16. Schlemper BR, Ávila BM, Coura JR e Brener Z. Course of infection and histopathological lesions in mice infected with seventeen *Trypanosoma* strains isolated from chronic patients. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 16: 23-30, 1983.
17. Scott MT, Moyes L. Specific IgG isotype restriction in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. In: Abstracts of the International Congress of Parasitology, Canadá, p. 49, 1982.