

ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS DAS PROTEÍNAS SÉRICAS EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *TRYPANOSOMA CRUZI*

I — Amostras "Y" e Nicaragua

Ednir SALATA (1) e Humberto de Araujo RANGEL (2)

RESUMO

Os Autores procuraram verificar, em soro de lotes de camundongos, infectados com amostras de *T. cruzi* de diferentes patogenicidades, através da eletroforese em acetato de celulose, imunoeletroforese cruzada e imunofluorescência, se a resposta sérica desses animais apresentava diferenças significativas. Alterações nos níveis das proteínas totais e das frações séricas, mostraram ser independentes da amostra de *T. cruzi* inoculada. A análise, através da eletroforese em membranas de acetato de celulose, dos soros de ambos os lotes de camundongos infectados revelou alterações cíclicas das frações séricas. O consumo específico de três frações séricas foi evidenciado pela imunoeletroforese cruzada. Os perfis sorológicos traçados a partir dos resultados obtidos pela imunofluorescência indireta, não mostraram diferenças significativas entre os lotes. O conjunto das observações mostrou que, embora as amostras de *T. cruzi* utilizadas na presente investigação tenham comportamentos biológicos diferentes, a resposta sérica induzida pelas mesmas e avaliada através dos métodos empregados, não mostrou diferenças significativas.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de alterações quantitativas das proteínas séricas de diferentes hospedeiros infectados por hemoflagelados do gênero *Trypanosoma* tem sido relatada por diversos Autores. Tais alterações tem sido investigada tanto em pacientes chagásicos em fase crônica ou em aguda^{17,21}, quanto em camundongos experimentalmente infectados^{7,22}.

Entretanto, os Autores não se preocuparam em estabelecer correlação entre as características biológicas, das amostras de *T. cruzi* utilizadas e as alterações séricas encontradas. Desse modo, não temos informações se, durante a infecção por diferentes amostras, ocorre o mesmo padrão de alterações séricas. Para obtenção de tais informações, procuramos estudar comparativamente a resposta sérica de camundon-

gos de mesma linhagem e experimentalmente infectados, com amostras de *T. cruzi* de diferentes patogenicidades.

MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação experimental dos camundongos

Camundongos Swiss com 25 dias de idade foram inoculados intraperitonealmente com 0,2 ml de sangue de camundongos contendo número conhecido de tripomastigotas circulantes, estimado pelo método de Pizzi modificado por BRENER⁴ e diluído em salina 0,15 M estéril.

Utilizamos inóculos de 200 e 3000 tripomastigotas das amostras Y ou NIC de *T. cruzi*, respectivamente, dividindo nossos animais em dois lotes:

(1) Departamento de Parasitologia do I.B.B.M.A., — UNESP — Botucatu, S.P., Brasil — 18.600 — Caixa Postal, 101
(2) Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, S.P., Brasil
Trabalho apresentado, ao Instituto de Biologia da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre.

Lote Y — constituído de 225 camundongos inoculados com 200 tripomastigotas da amostra Y;

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

Seguimento da infecção

Diariamente registramos a mortalidade observada nos dois lotes de animais. Semanalmente, eram escolhidos ao acaso 15 animais de cada lote, para verificação de parasitemia e obtenção de soro.

A verificação de ocorrência de parasitemia foi realizada examinando-se ao microscópio óptico, entre lâmina e lamínula 22x22 mm, sob objetiva 40x, duas alíquotas de 5 mm³ de sangue colhido da cauda de cada camundongo. Formam-se, assim, 7250 campos microscópicos, 50 dos quais escolhidos ao acaso foram examinados. Os animais foram considerados negativos, quando não se encontrava pelo menos um tripanosoma em pelo menos um dos 50 campos examinados. O sangue colhido por punção cardíaca desses animais serviu para obtenção das misturas de soros que eram centrifugadas a 3500 r.p.m., durante 40 minutos, inativadas a 56°C por 30 minutos e armazenadas em Freezer a -20°C, até o momento de serem analisadas.

Análise das misturas de soros

As misturas de soros colhidas semanalmente foram analisadas quanto ao seu teor proteico pela reação com o biureto, utilizando-se uma curva padrão de proteínas traçada a partir de uma solução de soro albumina bovina previamente dosada pelo processo do microkjeldahl¹². As misturas de soro foram ainda analisadas por eletroforese em membranas de acetato de celulose, imuno-eletroforese cruzada e por imuno-fluorescência indireta.

Para a realização de imuno-eletroforese cruzada, preconizada por CLARKE⁸, utilizamos soro polivalente de coelho antiglobulina de camundongo diluído a 1/40 e como controle soros de animais normais e de animais inoculados com hemácias de carneiro, de idades correspondentes às idades dos camundongos infectados com *T. cruzi*, nas três primeiras semanas. Soro proveniente dos lotes de animais infectados e

dos controles foi utilizado puro e num volume de 10 microlitros.

A técnica da reação de imunofluorescência indireta preconizada por CAMARGO⁶, foi utilizada para a constatação da presença de anticorpos anti-*T. cruzi*.

RESULTADOS

1. Evolução da infecção experimental

A evolução da infecção nos grupos de 15 camundongos inoculados com amostra Y ou NIC e examinados semanalmente mostrou que praticamente a totalidade dos animais apresentou parasitemia ao final da 2.ª e 3.ª semanas após a inoculação (Fig. 1). Pode-se ainda verificar pela Fig. 1, que as porcentagens de animais com parasitemia persistente, nas semanas subsequentes, foram variáveis na dependência da amostra de *T. cruzi* inoculada.

Como se pode observar na Tabela I, a mortalidade decorrente da infecção foi mais acentuada no lote inoculado com a amostra Y que no inoculado com a NIC.

T A B E L A I

Número de animais mortos em diferentes semanas após a inoculação com as amostras Y ou NIC de *T. cruzi*

Semanas	Amostras	NIC	Y
1		2	0
2		0	0
3		4	53
4		0	25
5		0	3
6		8	3
7		1	2
8		0	1
9		0	0
10		0	—
11		0	—
12		0	—
13		0	—
14		0	—
Total		15	87

2. Proteínas séricas no decurso da infecção

Nos soros dos animais infectados com qualquer das amostras de *T. cruzi* utilizadas, o teor

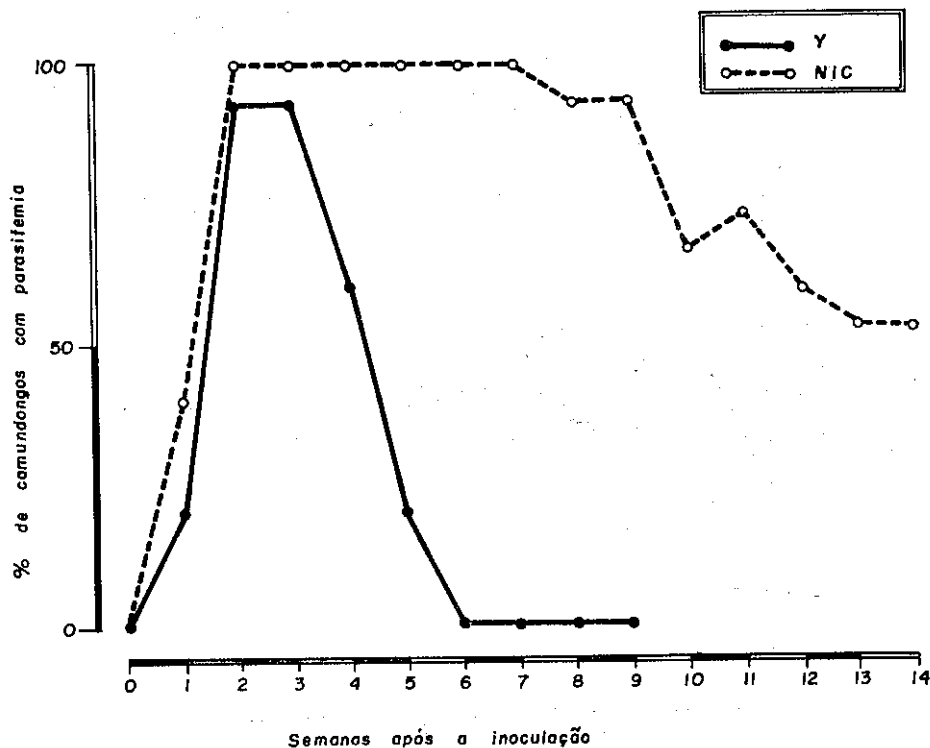


Fig. 1 — Porcentagem de animais com parasitemia, em amostras de 15 camundongos, em relação ao tempo de inoculação com as amostras Y ou NIC de *T. cruzi*

de proteínas totais e das diferentes frações detectadas pela eletroforese em membranas de acetato de celulose mostrou diferenças quantitativas no decurso da infecção. O teor de proteínas séricas totais aumentou durante a infecção em ambos os lotes, sobretudo a partir da 2.ª semana, perdurando durante todo o período de observação (Fig. 2).

Os níveis séricos da fração albumina praticamente dobraram em determinadas semanas, reduzindo-se a seguir a níveis mais baixos, não retornando entretanto ao nível normal (Fig. 2).

O teor das frações α , β e γ detectadas após a eletroforese em acetato de celulose, revelou, de modo geral, um aumento que ocorreu de modo cíclico, a intervalos de três semanas, em todas as frações (Figs. 3, 4 e 5).

Experiências de imunoeletroforese cruzada revelaram que, durante a infecção de camundongos pelo *T. cruzi*, seja com a amostra Y seja com a NIC, ocorre redução do nível de três componentes séricos, presentes nas regiões das albuminas, α e β globulinas (Figs. 6 e 7).

No decurso da infecção chagásica tais componentes, apresentam concentrações variáveis que entretanto se mantém até a 12.ª semana de infecção em níveis inferiores aos normais (Fig. 7).

Estes componentes não sofrem alterações apreciáveis no soro de animais inoculados com hemácias de carneiro (Fig. 8).

3. Produção de anticorpos no decurso da infecção

A evolução dos níveis de anticorpos detectados contra antígeno homólogo, pela imunofluorescência indireta, mostrou aumento a partir da 2.ª semana, não havendo diferença significativa entre os dois lotes de animais (Fig. 9).

DISCUSSÃO

O comportamento biológico de um parasita avaliado, em animais experimentalmente infectados, através da evolução da infecção, dos níveis de parasitemia, dos diferentes tropismos, das alterações teciduais e da mortalidade, é in-

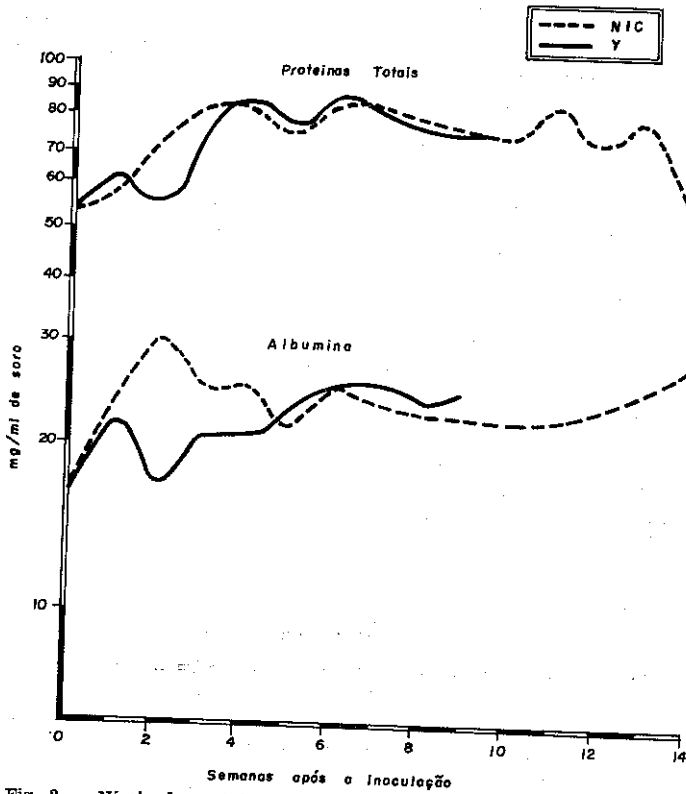


Fig. 2 — Níveis de proteínas séricas totais e de albumina, em mg/ml de soro, em grupos de 15 animais inoculados com as amostras Y ou NIC de *T. cruzi*, em relação ao tempo de inoculação

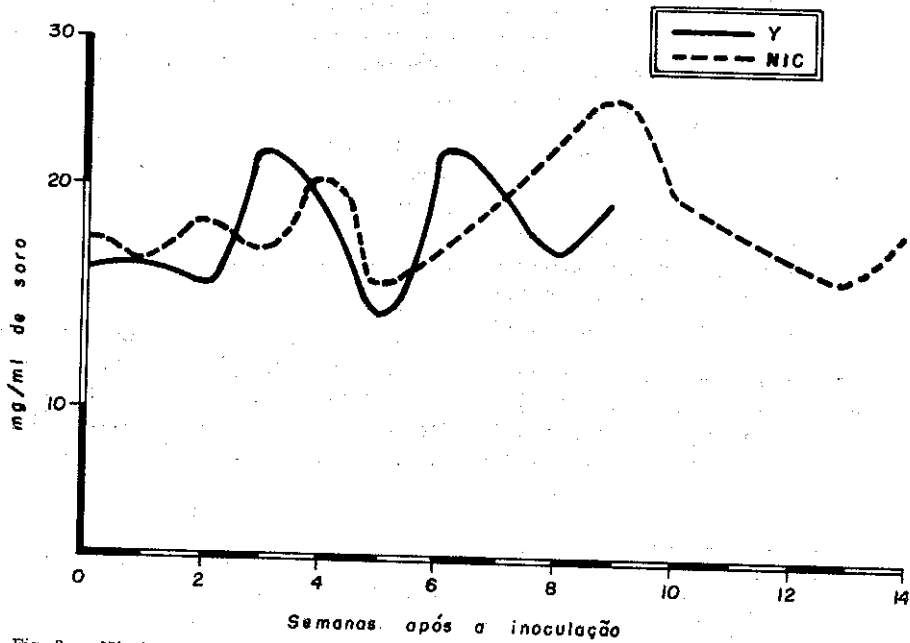


Fig. 3 — Níveis da fração α globulina, em mg/ml de soro, em grupos de 15 animais inoculados com as amostras Y ou NIC de *T. cruzi*, em relação ao tempo de inoculação

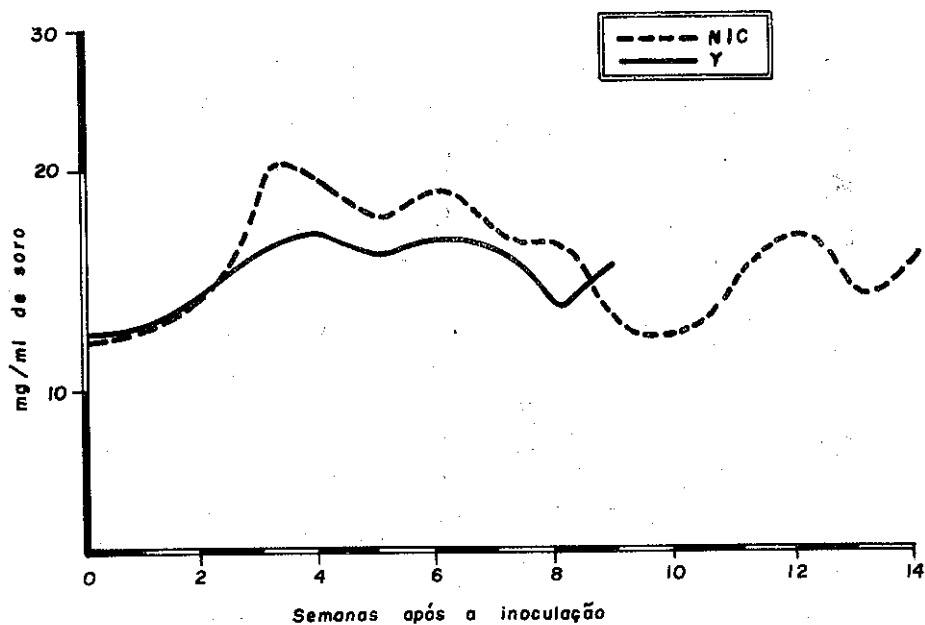


Fig. 4 — Níveis da fração β globulina, em mg/ml de soro, em grupos de 15 animais inoculados com as amostras Y ou NIC de *T. cruzi*, em relação ao tempo de inoculação

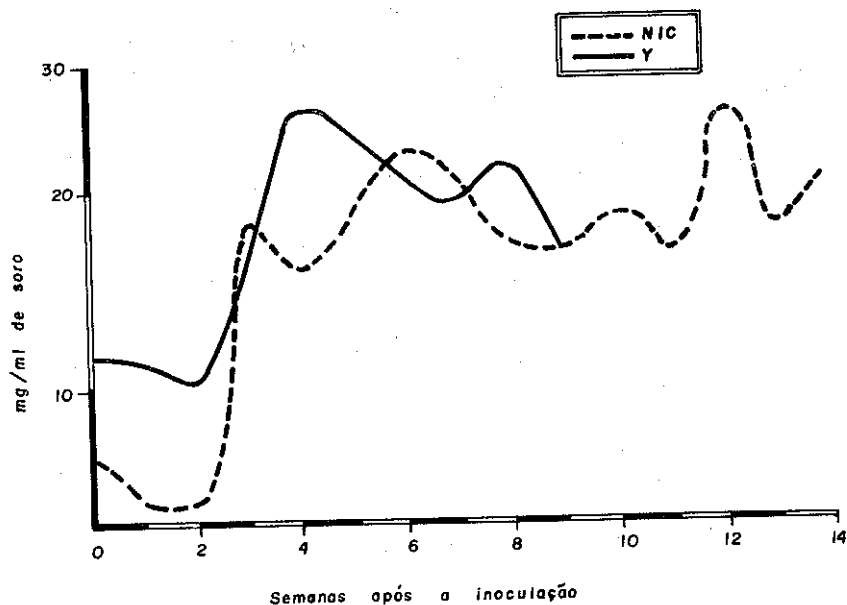


Fig. 5 — Níveis da fração γ globulina, em mg/ml de soro, em grupo de 15 animais inoculados com as amostras Y ou NIC de *T. cruzi*, em relação ao tempo de inoculação

fluenciado por fatores inerentes aos animais hospedeiros^{14,18}. Torna-se difícil, portanto, comparar resultados publicados por diferentes Autores sobre o comportamento de várias amostras de *T. cruzi*, mesmo quando esses estudos

são feitos com uma mesma raça de camundongos (Swiss, por exemplo) visto que vários estoques de uma raça mantidos em diferentes laboratórios podem, na realidade, representar populações geneticamente diferentes.

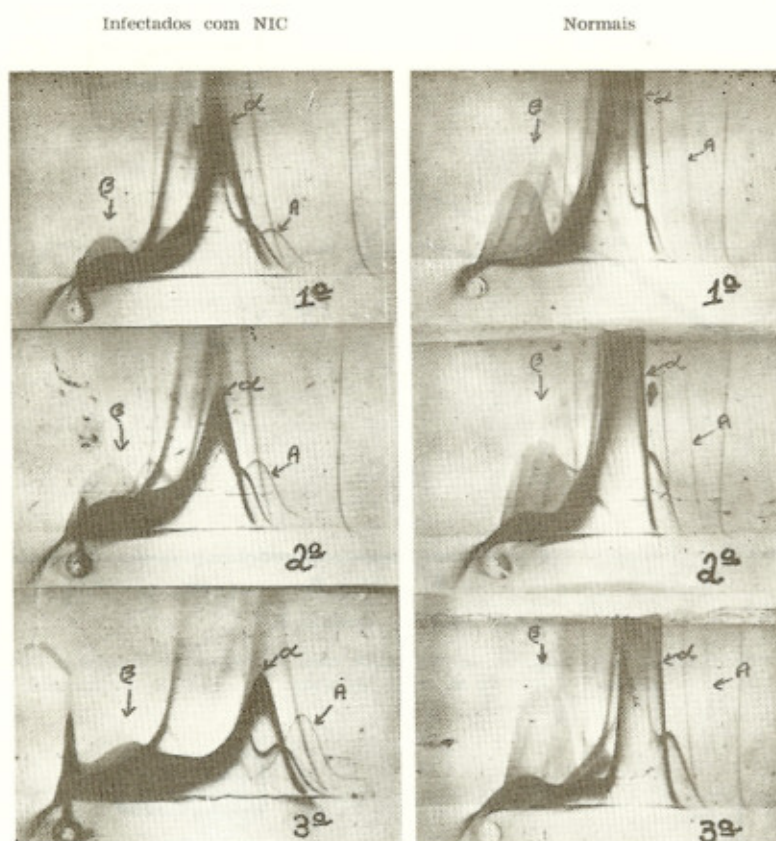


Fig. 6 — Padrão imunoeletroforético de soros de camundongos normais e infectados, de idades correspondentes a 1.ª, 2.ª e 3.ª semanas após a inoculação

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

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

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

A despeito da dose utilizada com a amostra Y ser bem menor que a da NIC, a mortalidade provocada pela amostra Y foi 6 vezes superior à provocada pela ino-

culação da NIC. Evidencia-se, assim uma maior patogenicidade da amostra Y em relação a NIC, entendendo-se por patogenicidade a capacidade de determinar lesões teciduais que possam determinar a morte do hospedeiro^{1,20}.

O decurso da infecção provocada pelas amostras Y ou NIC foi igualmente diferente. Duas verificações sucessivas, na 2.ª e na 3.ª semanas após a inoculação, em diferentes amostras de 15 animais, tomadas ao acaso de cada um dos lotes, mostraram que de 93 a 100% da população inoculada com as amostras Y ou NIC, respectivamente, estava efetivamente infectada. Contudo, a partir da 4.ª semana de observação, nota-se uma nítida diferença entre os lotes, no que se refere à porcentagem de animais com parasitemia. Enquanto nos animais inoculados com a amostra Y os tripanosomas desaparecem da circulação por volta da 6.ª semana, nos inoculados com a amostra NIC escassos tripomastigotas circulantes permaneceram por longos pe-

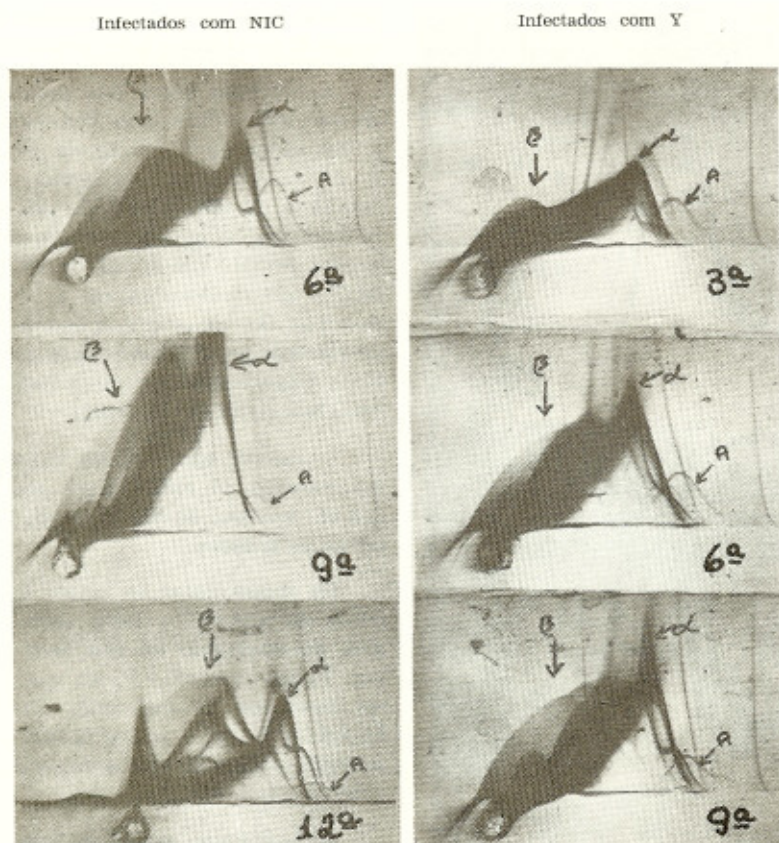


Fig. 7 — Padrão imunoeletroforético de soros de camundongos infectados com amostras NIC ou Y de *T. cruzi* em diferentes semanas após a inoculação

riodos na circulação (até 14.^a semana) em cerca de 53% dos animais.

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

Alterações nos níveis das proteínas ocorreram no decurso da infecção com as amostras Y ou NIC. Esses níveis se elevaram a partir da 1.^a semana após a inoculação, mantendo-

se relativamente alto até o final do período de observação de cada lote.

As curvas obtidas relacionando-se tempo de inoculação com níveis de proteínas apresentaram resultados concordantes nos soros de camundongos inoculados com uma ou outra amostra, salvo uma pequena diferença observada entre a 2.^a e 3.^a semana após a inoculação.

Tal diferença ocorre por conta da fração albumina, uma vez que esta se apresentou diminuída no mesmo período de observação, acompanhando a diminuição observada na curva de proteínas totais do lote de animais inoculados com a amostra Y.

A causa dessa diferença entre o comportamento dos animais inoculados com as amostras Y ou NIC no início da infecção não foi investigada, podendo-se entretanto, supor que neste

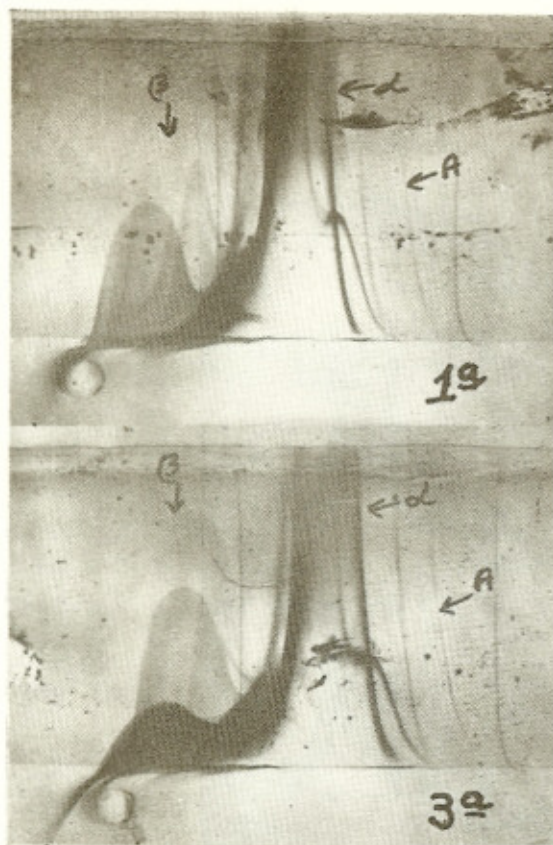


Fig. 8 — Padrão imunoelétrico de soros de camundongos, inoculados com hemácias de carneiro, de idades correspondentes a 1.ª e 3.ª semanas após a inoculação

período haja maior catabolismo de albumina em animais inoculados com a amostra Y.

A elevação geral das proteínas séricas pode ser atribuída a uma hemoconcentração e/ou a um aumento absoluto de algumas proteínas do soro. A hipótese da hemoconcentração, conseqüente de uma alteração nos mecanismos de reabsorção de água, encontra apoio nas observações de OLSEN & col.¹⁶ e de BICE & ZELEDON³ que demonstraram a presença de pseudocistos de amastigotas em tecido renal seja de animais naturalmente infectados, seja de animais experimentalmente infectados com algumas amostras de *T. cruzi*.

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

De modo geral os níveis de albumina dos soros de ambos os lotes estão acima do normal, ao contrário do que tem sido assinalado por vários Autores^{17,21}, no que se refere a seres humanos naturalmente infectados, ou por SENECA & col.²² e CAPBERN & col.⁷ no que respeita a camundongos experimentalmente infectados pelo *T. cruzi*.

No que tange aos seres humanos, os baixos níveis de albumina e de proteínas totais poderia ser conseqüência de uma dieta com deficiência crônica de proteínas. Esta dieta, segundo

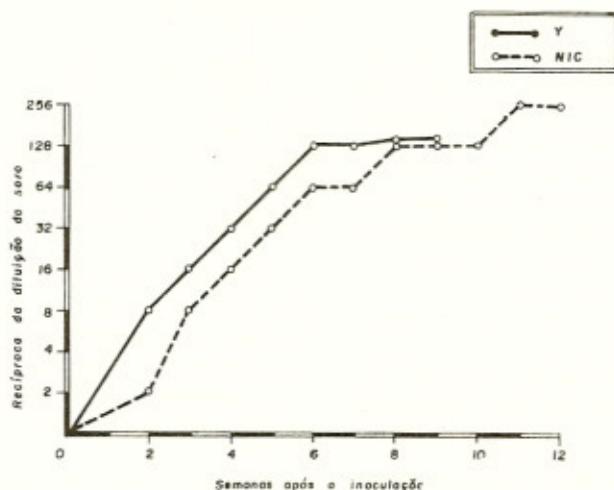


Fig. 9 — Evolução dos níveis de anticorpos anti *T. cruzi*, detectados pela reação de imunofluorescência indireta, em grupos de 15 camundongos inoculados com as amostras Y ou NIC de *T. cruzi*

GOOD & col.¹⁰, determina em camundongos experimentais uma redução de 21% das proteínas totais e 15% de albumina. No entanto, no que se refere aos dados obtidos em camundongos, não encontramos justificativa para a discordância entre nossos resultados e os dos Autores acima citados.

Apesar de termos encontrado elevação dos níveis de albumina, aparentemente a maior contribuição para o aumento dos níveis das proteínas totais provém das alterações observadas nas globulinas. A partir da 3.^a semana de observação, encontramos um discreto, porém significativo aumento nos níveis das frações α e β e acentuado aumento das frações γ globulinas, em soros de ambos os lotes de animais inoculados com *T. cruzi*.

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

É possível também que algumas das alterações dos níveis das globulinas sejam conseqüência da esplenomegalia ou das lesões provocadas pelo parasita, a exemplo do que ocorre na infestação pelo *S. mansoni*² ou na tripanossomíase africana¹³.

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

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

Por outro lado a mudança da fase intracelular para extracelular, acarretando lesões de

novas células, pode acarretar aumento de α globulinas como na infestação pelo *S. mansoni*².

As reduções dos níveis das globulinas podem ocorrer em conseqüência: 1 — Da fase intracelular quando, então, o material imunogênico torna-se inacessível aos linfócitos sensibilizados, cessando o estímulo da produção de novas moléculas de imunoglobulinas; 2 — Da neutralização, pelas imunoglobulinas específicas, dos antígenos liberados na circulação; 3 — De uma alteração no catabolismo das proteínas plasmáticas.

Segundo JENNINGS & col.¹¹, há um aumento do catabolismo das proteínas plasmáticas de camundongos infectados com *T. brucei*. Considerando-se que aparentemente tal fato também ocorre em camundongos infectados com *T. cruzi*, pois tem sido demonstrada *in vitro* atividade proteolítica em extrato bruto de formas epimastigotas de *T. cruzi* com ação sobre globulinas e albumina de soro humano¹⁹, teríamos possibilidade de incriminar também a 3.^a alternativa acima como responsável pelas reduções temporárias dos níveis das proteínas séricas.

Os resultados por nós obtidos na análise das frações β e γ globulinas estão em pleno acordo com dados apresentados por diferentes pesquisadores^{7,17,21} e ²².

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

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

Nos níveis séricos das frações que possuem mobilidade eletroforética correspondente as β globulinas, observamos no início da infecção chagásica, uma redução que ocorreu imediatamente após a conclusão do primeiro ciclo intracelular do parasita, isto é, após o aparecimento na circulação dos primeiros tripomastigotas originários do ciclo intracelular que se completa, segundo DVORAK & HYDE⁹ por volta de 6,5 dias após a infecção da célula hospedeira, *in vitro*. Como não foi detectada na ocasião a presença de anticorpos, podemos praticamente

excluir a possibilidade de que esta redução seja devida à absorção de imunoglobulinas específicas pelos antígenos liberados na circulação, a menos que existam anticorpos naturais específicos para determinantes internos do hemoflagelado. A hipótese mais provável é que a redução observada seja reflexo de consumo dessas proteínas ou pelo *T. cruzi* ou pelo aumento do catabolismo dessas proteínas. A normalização dos níveis das globulinas inicia-se entre a 2.^a e 3.^a semanas de observação, ocasião em que podem ser evidenciados anticorpos específicos para *T. cruzi*. Este fato, sugere fortemente que as flutuações nos níveis das imunoglobulinas estão em correlação com a produção de anticorpos para diferentes determinantes antigênicos do parasita ou o envolvimento de diferentes classes de imunoglobulinas.

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

Esta hipótese está de acordo com as observações de O'DALY¹⁵ e BRETANA & col.⁵, que demonstraram *in vitro* a presença de cinco proteínas em soro fetal de bovino, essenciais para a multiplicação e crescimento de *T. cruzi* em meio de cultura. Das cinco proteínas caracterizadas por estes Autores, três apresentam identidade com a fração V do soro de Cohn e migraram de modo idêntico na imunoeletroforese. Das duas proteínas restantes, uma migrou na região das α e a outra na região das β globulinas.

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

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

O conjunto de nossas observações nos mostra que, embora as amostras de *T. cruzi* utilizadas na presente investigação tenham comportamentos biológicos diferentes, a resposta séri-

ca avaliada pela dosagem de proteínas, pela eletroforese em acetato de celulose, pela imunoeletroforese cruzada e pela imunofluorescência indireta, não mostrou diferenças significativas.

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

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

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

SUMMARY

Quantitative alterations of sera proteins in mice infected with *Trypanosoma cruzi* I — "Y" and Nicaragua strains

Two different strains of *T. cruzi* (Y and Nicaragua) were compared by investigating the mortality rate, persistence of parasitemia and level of different serum proteins components of infected animals.

Results obtained showed that mice infection with Y strain presented higher mortality rates than those infected with Nicaragua strain. Chronic infection could be only established when 3000 parasites of Nicaragua strain or 200 of the Y strain were infected.

Although the infected number of parasites of the Y strain was 15 times smaller than that of Nicaragua, the mortality rate of the Y infected mice was at least 6 times higher.

Comparison of sera weekly obtained from groups of 15 animals didn't show remarkable differences on the level of different components. Crossed immunoelectrophoresis experiments indicated that 3 different sera components are consumed during infection with both strains. Such consumption was not observed when the sera of similar aged groups of either normal mice or of mice immunized with sheep red cells were examined.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, S. G. — Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no recôncavo baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da Doença de Chagas em nosso meio). Rev. Pat. Trop. 3: 65-121, 1974.
2. BELFREGE, S. — Plasma protein in the course of acute infections disease. Acta Med. Scand. 395: 169, 1963.
3. BICE, D. E. & ZELEDON, R. — Comparison of infectivity of strains of *T. cruzi* (Chagas, 1909). J. Parasit. 56: 663-670, 1970.
4. BRENER, Z. — Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da Doença de Chagas. [Tese]. Belo Horizonte, F.O.F.U.M.G., 1961.
5. BRETANA, A. & O'DALY, J. A. — Uptake of fetal proteins by *Trypanosoma cruzi* immunofluorescence and ultrastructural studies. Int. J. Parasit. 6: 379-386, 1976.
6. CAMARGO, M. E. — Introdução às técnicas de imunofluorescência. São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 1971. (Mimeografado).
7. CAPBERN, A.; MATTERN, P. & PAUTRIZEL, R. — Étude comparative du taux de protéines sériques au cours de trypanosomoses à *Trypanosoma gambiense* et à *Trypanosoma cruzi* chez la souris. Exp. Parasit. 35: 86-91, 1974.
8. CLARKE, H. G. M. — Two-dimensional (Laurell) immunoelectrophoresis for stimulation of antigen in relative units. In: WILLIAMS, C. A. T. A. & CHASE, M. W., ed. Methods in Immunology and Immunochemistry. London, Academic Press, 1971, V.3.
9. DVORAK, J. A. & HYDE, T. P. — *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells *in vitro*. I — Individual interactions at the cellular and subcellular levels. Exp. Parasit. 34: 268-283, 1973.
10. GOOD, R. A.; FERNANDES, G.; YUNIS, E. J.; COOPER, W. C.; JOSÉ, D. C.; KRAMER, T. R. & HANSEN, M. A. — Nutritional deficiency, immunologic function and disease. Amer. J. Path. 84: 599-614, 1976.
11. JENNINGS, F. W.; MURRAY, P. K.; MURRAY, M. & URGUHART, G. M. — Protein catabolism in trypanosomiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 67: 277, 1973.
12. KABAT, E. A. & MAYER, M. M. — *Immunoquímica Experimental*. 2.ª ed. México, Prensa Medica Mexicana, 1968, Cap. 13, p. 449-455.
13. LUMSDEN, W. H. R. — Estimation of serum IgM in the diagnosis of human trypanosomiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 60: 125, 1966.
14. MARR, J. S. & PIKE, E. H. — The protection of mice by "Corpus Christi" strain of *T. cruzi* when challenged with "Brasil strain". J. Parasit. 53: 657-659, 1967.
15. O'DALY, J. A. — Serum proteins promoting (³H) Thymidine uptake by *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas) *in vitro*. J. Protozool. 22: 550-555, 1975.
16. OLSEN, P. F.; SHOEMAKER, J. P.; TURNER, H. P. & HAYR, H. L. — Incidence of *Trypanosoma cruzi* (Chagas) in wild vectors and reservoirs in east — central Alabama. J. Parasit. 50: 599-603, 1964.
17. PINTO, C. & FALCÃO, P. — Eletroforese na Doença de Chagas. Rev. Brasil. Med. 15: 536-539, 1958.
18. PIZZI, T. & PRAZER, R. — Estabilización de la virulencia de una cepa de *T. cruzi* por pasaje seriado en ratones de constitución genética uniforme: analisis cuantitativo del curso de la infección. Biología 16/17: 3-12, 1952.
19. RANGEL, H. A.; REPKA, D. & COSTA, M. G. — Proteolytic activity of *T. cruzi* crude extracts. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 75: 1977 (no prelo).
20. REY, L. — Parasitologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1973, Cap. 8, p. 107.
21. SALUM, J.; LACAZ, P. S.; VORGES, C.; RASSI, A. & REZENDE, J. M. — Eletroforese das proteínas séricas na fase aguda da Doença de Chagas: comportamento evolutivo observado em 15 casos. Rev. Goiânia Med. 5: 13-21, 1959.
22. SENECA, H.; SANG, J. B. & TROC, O. K. — The electrophoretic pattern of the serum proteins in experimental haemoflagellate infections. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 52: 230-234, 1958.

Recebido para publicação em 13/8/1979.