

AÇÃO BIOLÓGICA DOS ANTÍGENOS DO
Trypanosoma cruzi (Chagas - 1.909)

I - EFEITO SOBRE A FAGOCITOSE DO CARBONO CO
LOIDAL E A RESPOSTA IMUNE A HEMÁCIAS DE
CARNEIRO.

A. C. CORSINI

ANTONIO CARLOS CORSINI

AÇÃO BIOLÓGICA DOS ANTÍGENOS DO Trypanosoma cruzi
(CHAGAS - 1.909)

I - EFEITO SOBRE A FAGOCITOSE DO CARBONO COLOIDAL
E A RESPOSTA IMUNE A HEMÁCIAS DE CARNEIRO

Tese de Mestrado
Apresentada ao
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas - UNICAMP

Orientador :

Prof. Dr. Humberto de Araujo Rangel

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Campinas - São Paulo

1.975

*Assim andamos nós - do realismo para
o sonho e deste para aquele, na oscila
ção perpétua das dúvidas , sem que pos
sa diferenciar na obscura zona neutral
alongada a beira do desconhecido, o poe
ta que espiritualiza a realidade , do
naturalista que tateia o mistério.*

Euclides da Cunha

AGRADECIMENTOS

A muitas pessoas deveria apor o meu agradecimento formalizado ; seria contudo temerário tentar enumerar todas, pois que poderia ficar no anonimato aquele mais humilde - porém não menos importante - contribuinte deste trabalho. Este, não pertence a uma pessoa, a um Departamento, a uma Universidade ...

Eis porque sublinho apenas quatro : a Srt.^a Vera Helena Gobbo pelo artístico trabalho datilográfico ; Rafael Campos Bezerra não tanto pelo trabalho fotográfico, mas sobretudo pelo companheirismo de todas as horas ; e , particularmente , o Dr. Humberto de Araujo Rangel e Maria da Glória Felipe Corsini ; esta , pela paciência e diligência com que nos atende, e aquele, pelos ensinamentos ministrados não somente no laboratório ...

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho os meus agradecimentos.

Agradecemos o auxílio prestado ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia pelas seguintes Instituições :

- Universidade Estadual de Campinas*
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*
- Conselho Nacional de Pesquisas*
- Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal do Ensino Superior*
- Organização Mundial da Saúde (Divisão Imunologia)*
- Biblioteca Regional de Medicina.*

*O que foi , é o que há de ser ; e o
que se fez, isso se tornará a fazer:
nada há, pois, novo debaixo do sol.*

Eclesiastes - 1:9

Í N D I C E

PÁGINA

I	- INTRODUÇÃO	1
II	- MATERIAL E MÉTODOS	5
II.1	- Animais	5
II.2	- Carbono Coloidal	5
II.3	- Determinação do índice de fagocitose K ...	5
II.4	- Determinação do índice de fagocitose corri gido α	6
II.5	- Extrato bruto das formas de cultivo do <u>Trypanosoma cruzi</u> - EBTC	6
II.6	- Dosagem de proteínas	7
II.7	- Hemácias de carneiro - H.C.	7
II.8	- Imunização dos animais	7
II.9	- Determinação do título das aglutininas ...	7
II.10	- Determinação do número de células explêni cas formadoras de rosetas	8
II.11	- Técnicas Histológicas	9
III	- RESULTADOS	9
III.1	- Efeito do EBTC sobre a depuração sangui nea do carbono coloidal	9
III.2	- Efeito de diferentes doses do EBTC sobre a depuração sanguínea do carbono coloidal.	12
III.3	- Aspecto histológico do fígado e baço após a administração do EBTC	16
III.3.1	- Fígado	16
III.3.2	- Baço	16

III.4 - Efeito do EBTC sobre o título das aglutininas e o número de células esplênicas formadoras de rosetas	20
IV - DISCUSSÃO	23
V - CONCLUSÕES	32
VI - BIBLIOGRAFIA	33

I N T R O D U Ç Ã O

O estudo das infecções parasitárias tem, longa data, chamado a atenção dos pesquisadores para a prolongada persistência dos parasitas em locais acessíveis às mais diversas defesas orgânicas do hospedeiro, sem contudo haver uma eliminação dos mesmos (*Dineen - 1963 a ; Dineen - 1963 b ; Damian - 1964 ; Capron et al - 1968 ; Smithers et al - 1969 ; Capron - 1970*).

A resistência demonstrada pelos hospedeiros às reinfecções ou reinfestações por parasitas é igualmente conhecida de longa data e explicada entre outros mecanismos, através dos anticorpos circulantes que favorecem a eliminação dos novos agentes invasores (*Smithers et al - 1969 ; Capron - 1970*).

Assim sendo, uma suposta tolerância imunológica para explicar o prolongado parasitismo pode ser afastada, uma vez que a produção de anticorpos contra antígenos do parasita foi demonstrada através de inúmeras técnicas imunológicas por diversos autores (*Dineen - 1963 a ; Dineen - 1963 b ; Capron et al - 1968 ; Smithers et al - 1969 ; Desowitz - 1970*).

No entanto, é de se supor que nem todos os constituintes do parasita estejam participando na estimulação imunológica do hospedeiro, já que poderia haver a eliminação do mesmo pelos anticorpos produzidos, e fatalmente alterar o equilíbrio hospedeiro-parasita em prejuízo deste último (*Dineen - 1963 a ; Dineen - 1963 b ; Damian - 1964 ; Smithers et al - 1969 ; Capron - 1970 ; Soulsby - 1970*).

Este fato tem levado os pesquisadores a procurar identificar aqueles antígenos que permitem a convivência do parasita com o hospedeiro e os mecanismos através dos quais o parasita pode apresentá-los aos seus hospedeiros, intermediários ou definitivos (*Dineen - 1963 a ; Dineen - 1963 b ; Damian - 1964 ; Capron et al - 1968 ; Smithers et al - 1969 ; Capron - 1970*).

Os resultados destes trabalhos evidenciaram a existência de antígenos do parasita comuns aos do hospedeiro, que seriam adquiridos através de mutações ao acaso (*Damian - 1964*).

ou através da indução imposta pelo hospedeiro (*Capron et al* - 1969; *Capron* - 1970) ou simplesmente pela adsorção na superfície do parasita de antígenos do hospedeiro (*Smithers et al* - 1969).

Estes dados vieram demonstrar que é possível a camuflagem do parasita com antígenos do hospedeiro, passando este a encará-lo como "*próprio*", permitindo pois a sua sobrevivência apesar dos anticorpos líticos produzidos nas primeiras fases da interação hospedeiro-parasita e responsáveis pela eliminação dos novos invasores (*Capron et al* - 1968 ; *Smithers et al* - 1969; *Capron* - 1970).

Estes achados justificam as melhores associações naturais como sendo aquelas evoluindo para uma simbiose entre o hospedeiro e o parasita (*Capron et al* - 1968).

Estas observações verificadas nas helmintíases, embora não nas protozoonoses, podem ser também verdadeiras nestas infecções, permitindo a manutenção do binômio hospedeiro-parasita, já que pelo menos em três espécies : *Trypanosoma brucei* , *Trypanosoma congolense* e *Plasmodium knowlesi*, estão demonstradas variações antigênicas sem alteração visível da estrutura celular (*Brown* - 1969).

São conhecidas há mais de 50 anos a variação antigênica do "*tipo brucei*" (*Brown et Williamson* - 1962 ; *Brown* - 1969) em que se demonstra mediante provas de aglutinação, lise, proteção e precipitação, as diferenças entre as formas isoladas dos surtos parasitêmicos. Também foram demonstradas variações semelhantes no *Trypanosoma congolense* e na malária dos macacos (*Brown* - 1969).

Diferenças morfológicas e antigênicas também foram verificadas em outros tripanosomas africanos (*Trypanosoma congolense* , *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma rhodesiense*) onde se sugere um envoltório protetor nas formas tripomastigotas, inexistente nas formas epimastigotas do vetor (*Vickerman* - 1968).

Na tripanosomíase americana , os estudos sobre os antígenos do *Trypanosoma cruzi* , iniciados por *Guerreiro* e *Ma chado* tem sido orientados na maioria das vezes no sentido de estabelecer técnicas diagnósticas para a doença de *Chagas*, apesar de diversos autores chamarem a atenção para o papel desempe

nhado pelos antígenos do parasita na patogênese da doença (*Vianna* - 1911 ; *Torres* - 1917 ; *Okumura et al* - 1960 ; *Muniz* - 1962 ; *Pizzi* - 1963 ; *Repka* - 1973).

Assim sendo, as informações a respeito dos constituintes do *Trypanosoma cruzi* são escassos e seus efeitos sobre a patogenia da doença desconhecidos (*Repka* - 1973).

Objetivando um melhor conhecimento da relação hospedeiro-parasita na doença de *Chagas*, onde a prolongada persistência do parasita na intimidade dos tecidos do hospedeiro poderia sugerir variações antigênicas do *Trypanosoma cruzi* ocorrendo in vivo, e seguindo a orientação dos peritos da *Organização Mundial da Saúde* (*O.M.S.* - 1960 ; *O.M.S.* - 1962 ; *O.M.S.* - 1965) e de numerosos autores (*Soulsby* - 1963 - 1970 ; *Brown* - 1969 ; *Kagan* - 1967 ; *Tagliaferro* - 1969 ; *Capron* - 1970 ; *Desowitz* - 1970 ; *Repka* - 1973) , os quais insistem na necessidade do conhecimento dos antígenos dos parasitas e de suas ações sobre o hospedeiro para uma compreensão do equilíbrio existente entre os dois organismos; empreendemos o estudo de um extrato das formas de cultivo do parasita.

Desta maneira, propusemo-nos a estudar os efeitos de um extrato das formas de cultivo do *Trypanosoma cruzi* sobre a atividade fagocitária do *Sistema Mononuclear Fagocitário* (*S.M.F.*), denominação atualmente proposta por *Langevoort et al* (1970) para o sistema *Retículo-Endotelial* (*Aschoff* - 1924), e as suas relações com a resposta imunitária do camundongo.

O primeiro estudo se prende ao fato de haver intensa participação deste sistema na história natural da doença de *Chagas*, onde o macrófago aparece não somente como eliminador do parasita, mas também como célula onde ocorre a multiplicação do mesmo (*Chagas* - 1909 ; *Dias Emmanuel* - 1932 ; *Romãna*-1943 ; *Pizzi et al* - 1954 ; *Tagliaferro et Pizzi* - 1955 ; *Goble et Singer* - 1960 ; *Muniz* - 1962 ; *Tagliaferro* - 1969 ; *Kierszenbaum et al* - 1974).

Outrossim, são conhecidos pelos estudos de *Salaman et Wedderburn* - (1969) , *Salaman* - (1970) , *Greenwood et al* - (1971 a ; 1971 b) , *Goodwin et al* - (1972) , *Freeman et al* - (1974) , *Howard et Najarian* - (1974 a ; 1974 b) , *Peled et Haran-Ghera* - (1974) , *Murray et al* - (1974) , *Lima Pereira* - (1974) ,

efeitos imuno-supressivos em hospedeiros infectados por vírus, plas_{ma}módios ou tripanosomas ; de maneira que justifica-se verificar se na tripanosomíase americana, ocorrem fenômenos idênticos na res_{posta} imune a antígenos aparentemente não relacionados.

O nosso trabalho propõe-se portanto a estudar em camundongos, o efeito do extrato obtido das formas de cultivo do *Trypanosoma cruzi*, sobre o S.M.F. e a resposta imune des_{tes} animais a hemácias de carneiro.

II - MATERIAL E MÉTODOS

II.1 - Animais - Camundongos "Swiss", de 25 a 30 gr, criados em nosso Biotério.

II.2 - Carbano Coloidal - A preparação de carbono coloidal nos foi cedida pelo Dr. Guido Biozzi. Obtida da Gunter-Wagner, Hanover, identificada como preparação C_{11/1431} a, contém 64 mg/ml de carbono coloidal com partículas de 250 Å⁰ de tamanho, suspensas em gelatina de peixe a 1%.

II.3 - Determinação do índice de Fagocitose - K - O índice de fagocitose (K) foi determinado conforme indicação de Biozzi et al - (1954). Os animais foram inoculados endovenosamente com 8 mg de carbono coloidal para cada 100 gr de massa corporal, e sangrados a intervalos de 2, 5, 10, 15 e 20 minutos após a inoculação, por punção do plexo venoso retro-ocular, com pipeta calibrada a 0,25 ml.

As amostras de sangue foram diluídas em 2 ml de solução aquosa de carbonato de sódio a 1/1000 e as absorbâncias destas diluições, determinadas a 640 mμ de comprimento de onda em espectrofotômetro Colleman Jr., cubetas 12 x 75 mm.

O índice de fagocitose - K -, que expressa a velocidade de depuração do carbono coloidal, foi obtido determinando-se o coeficiente angular da reta traçada, colocando-se nas abcissas, em escala aritmética, os tempos de sangria; e em ordenadas, em escala logarítmica, as respectivas concentrações de carbono, ou simplesmente as absorbâncias das amostras.

A equação que rege o fenômeno, segundo Biozzi et al - (1954) estabelece

$$K = \frac{\log C_1 - \log C_2}{\Delta t}$$

onde :

$\log C_1$ = logarítmo decimal da concentração do carbono no tempo 1

$\log C_2$ = logarítmo decimal da concentração do carbono no tempo 2

Δt = intervalo de tempo decorrido entre t_1 e t_2 .

II.4 - Determinação do índice de Fagocitose corrigido - α -
O índice de fagocitose corrigido (α) foi obtido através da equação estabelecida por *Biozzi et al* - (1953)

$$\alpha = M_a / M_o \sqrt[3]{K}$$

onde :

M_a = massa do animal

M_o = somatõria das massas do fígado e do baço.

II.5 - Extrato bruto das formas de cultivo do *Trypanosoma cruzi* - EBTC - O extrato bruto das formas de cultivo do *T. cruzi* (EBTC), foi preparado segundo o método descrito por *Repka* - (1973).

Formas de cultivo do *T. cruzi*, cedida pelo Dr. Mário Camargo, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, mantidas em nosso laboratório em meio LIT, foram lavados três vezes em solução de NaCl 0,15 M. Aliquotas de 10 ml das suspensões contendo 56×10^6 tripanosomas/ml foram centrifugadas a 1700 g durante 15 minutos a 5° . O sedimento ressuspenso em 10 ml de uma solução aquosa de desoxicolato de sódio a 0,1%, recentemente preparada, foi incubada em banho de gelo durante 10 minutos.

A seguir, as suspensões foram dialisadas durante uma hora, com agitação constante em banho de gelo, contra um litro de solução de NaCl 0,15 M, reno-

vada após 30 minutos.

O material foi então centrifugado a 5° , 3020 g, durante 15 minutos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante rotulado *Extrato Bruto de Trypanosoma cruzi* (EBTC), distribuído em alíquotas de 5 ml e conservado a -20° .

II.6 - Dosagem de proteínas - A dosagem de proteínas no EBTC foi feita pela reação do Biureto, segundo *Weichselbaun* (1946).

II.7 - Hemácias de Carneiro - H.C. - Hemácias de carneiro recolhidas em solução de *Alsever*, foram lavadas 3 vezes em solução de NaCl 0,15 M e posteriormente ressuspensas na mesma solução de modo a obter 10^9 células/ml por determinação espectrofotométrica a 450 m μ de comprimento de onda, em aparelho *Collemann Jr.*, cubetas 12 x 75 mm.

Posteriormente foram preparadas diluições, também em solução de NaCl 0,15 M, contendo 10^8 células em 0,2 ml de solução, para inoculação endovenosa.

II.8 - Imunização dos animais - Animais tomados ao acaso, machos e fêmeas, foram colocados em caixas de plásticos, separados em animais do mesmo sexo e alimentados ad libitum.

Os animais receberam apenas uma dose do EBTC e/ou HC por via endovenosa (veia da cauda) e quer seja o EBTC ou as hemácias de carneiro, em volume constante de 0,2 ml.

II.9 - Determinação do título das aglutininas - Os animais foram sangrados por punção cardíaca sob anestesia pelo clorofórmio. Os soros foram separados e o "conjunto" dos soros dos animais do mesmo grupo experimental estocados em frascos a -20° .

O título das aglutininas foi determinado em lâmina escavada , com 0,3 ml da diluição dos soros em solução de NaCl 0,15 M e 0,3 ml de uma suspensão de hemácias contendo 2×10^8 glóbulos/ml também em solução de NaCl 0,15 M.

II.10 - Determinação do número de células esplênicas formadoras de rosetas - Determinou-se o número de cels formadoras de rosetas segundo a técnica de *Biozzi et al* (1966).

Cada grupo experimental constou de 10 animais. Procedeu-se a subdivisão dos grupos em dois subgrupos de cinco animais. Dos baços destes cinco animais fez-se um "conjunto" de células esplênicas no qual se determinou o número de células formadoras de rosetas. Os resultados foram expressos em número de cels formadoras de rosetas/1000 cels esplênicas (*Biozzi et al* - 1968).

II.11 - Técnicas Histológicas - Fragmentos do baço e do fígado dos animais foram fixados em formol 10% e processados segundo as técnicas histológicas habituais. As colorações foram feitas pelo hemalume - eosina.

III - RESULTADOS

III.1 - Efeito do EBTC sobre a depuração sanguínea do carbono coloidal - Com o objetivo de verificar a ação do EBTC sobre a depuração sanguínea do carbono coloidal, animais foram inoculados com 240 μg de proteína do EBTC em 0,2 ml e os índices K e α foram determinados após períodos variáveis de tempo.

Os resultados obtidos, indicados nas figuras 1 e 2, representam as médias de 5 animais, com os respectivos desvios padrões.

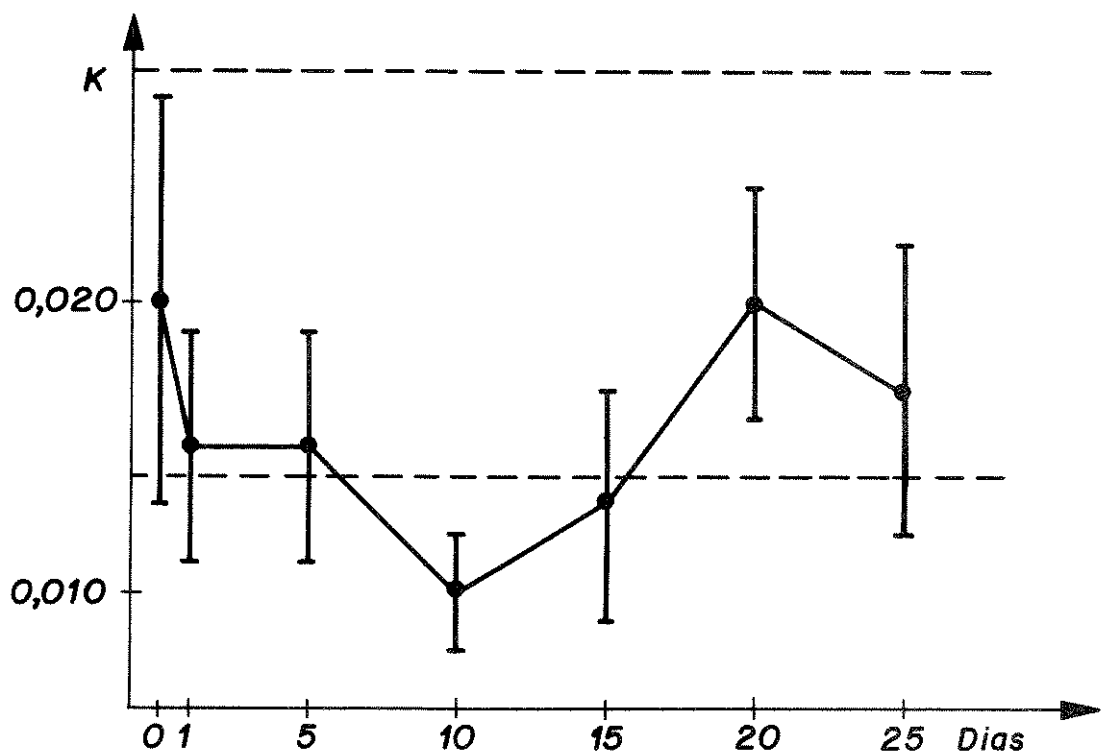


FIGURA 1 - Efeito do EBTC sobre a atividade fagocitária do SMF do camundongo. Em abcissas os dias decorrentes após a inoculação do EBTC e em ordenadas o índice K. O intervalo entre as linhas pontilhadas corresponde ao desvio padrão da média dos animais normais.

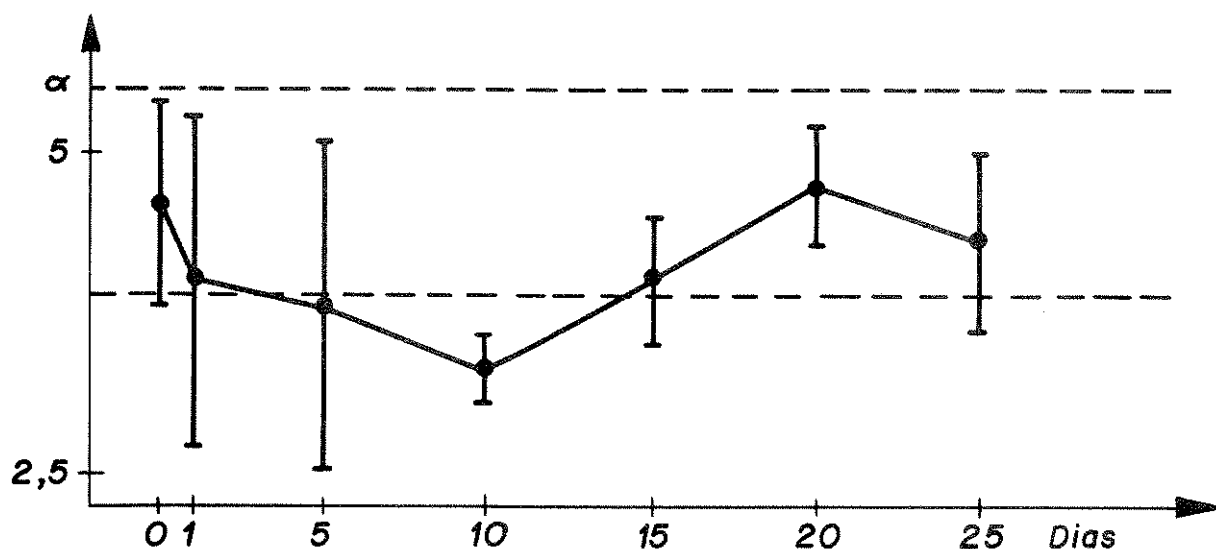


FIGURA 2 - Efeito do EBTC sobre a atividade fagocitária do SMF do camundongo. Em abscissas os dias decorrentes após a inoculação do EBTC e em ordenadas o índice α . O intervalo entre as linhas pontilhadas corresponde ao desvio padrão da média dos animais normais.

Nota-se que nas primeiras 24 horas após a inoculação do EBTC, ocorre uma diminuição da velocidade de depuração do carbono coloidal, a qual é máxima no 10º dia, normalizando-se a partir do 20º dia.

A verificação da massa dos órgãos, fígado e baço, determinada após a depuração total do carbono e logo em seguida ao sacrifício do animal pela anestesia por éter, revela uma hepatomegalia no 10º dia após a inoculação e uma esplenomegalia no 1º dia após a inoculação do EBTC (figuras 3 e 4).

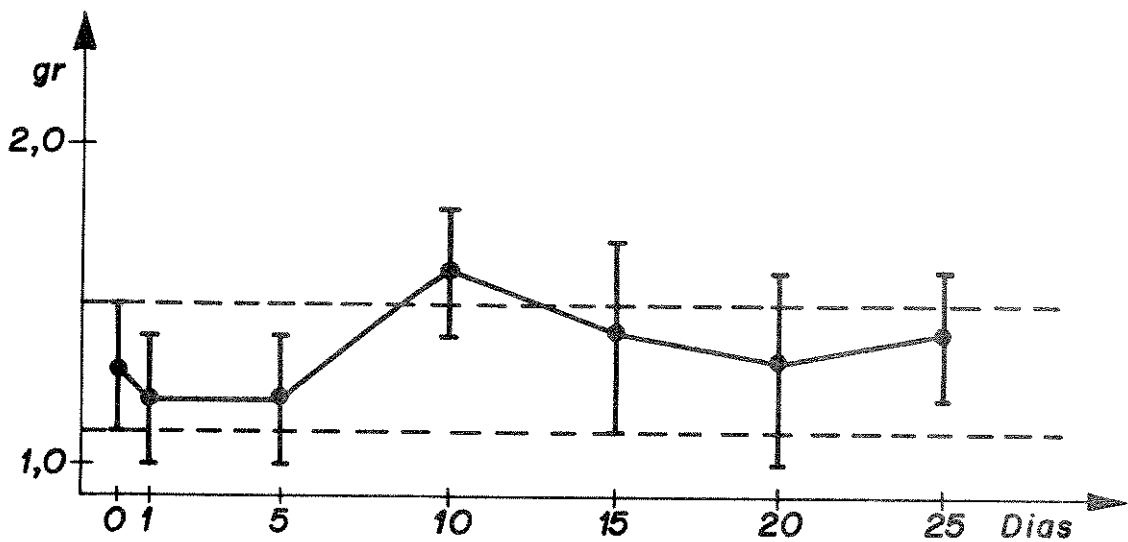


FIGURA 3 - Efeito do EBTC sobre a massa do fígado do camundongo. Em abcissas os dias decorrentes após inoculação e em ordenadas as massas dos órgãos em gramas. O intervalo entre as linhas pontilhadas corresponde ao desvio padrão da média dos animais normais.

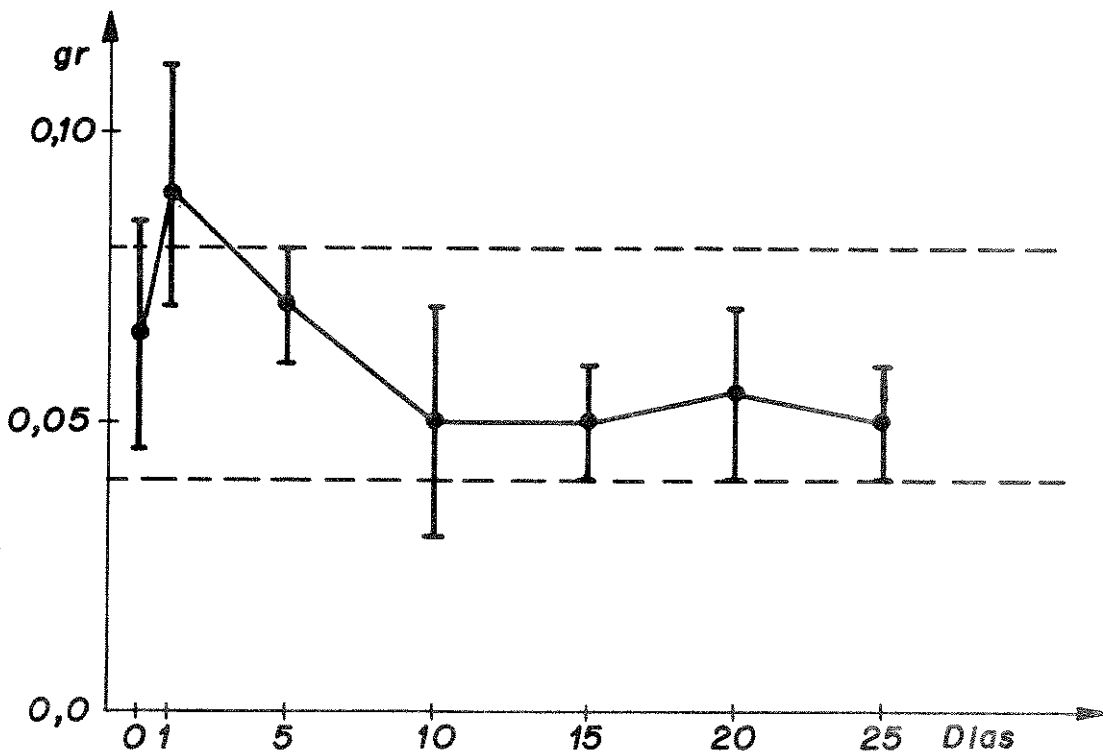


FIGURA 4 - Efeito do EBTC sobre a massa do baço do camundongo. Em abcissas os dias decorrentes após inoculação e em ordenadas as massas em gramas dos órgãos. O intervalo entre as linhas pontilhadas corresponde ao desvio padrão da média dos animais normais.

III.2 - Efeito de diferentes doses do EBTC sobre a depuração sanguínea do carbono coloidal - Obtidos estes resultados, procurou-se estudar o efeito de diferentes doses de proteína do EBTC sobre a depuração sanguínea do carbono coloidal. Grupos de 5 animais foram inoculados com doses crescentes de proteína do EBTC em 0,2 ml (30 μ g a 240 μ g) e procedeu-se a depuração no 2º e 10º dia após a inoculação. Os resultados, representando as médias de 5 animais com os respectivos desvios padrões, são apresentados nas figuras 5, 6, 7 e 8.

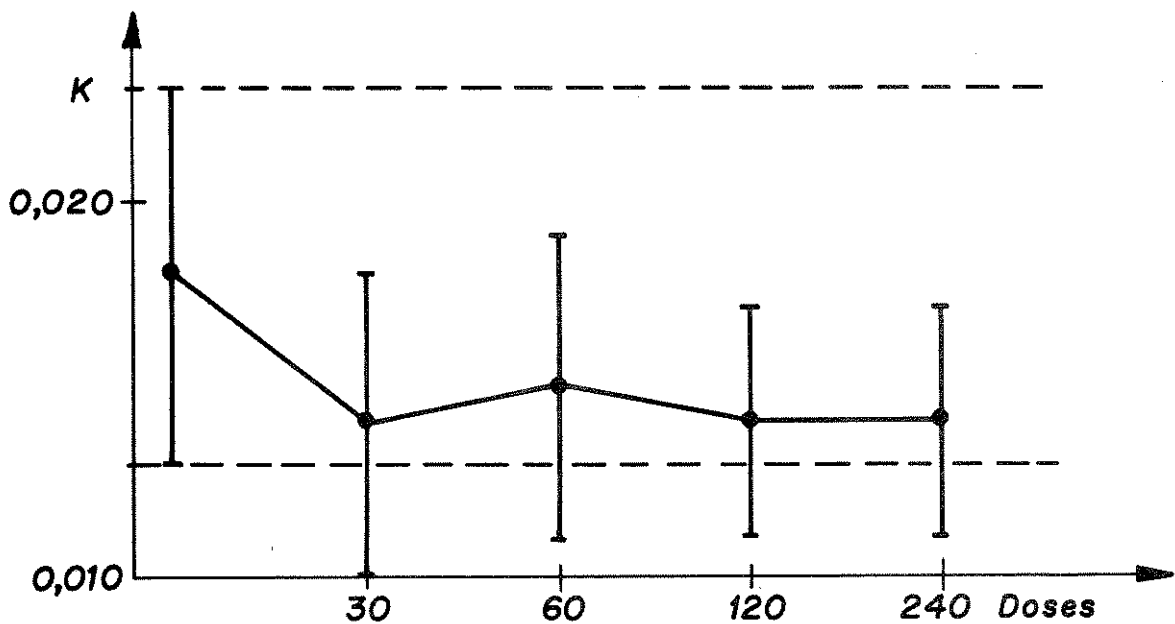


FIGURA 5 - Efeito de diferentes doses do EBTC sobre a atividade fagocitária do SMF do camundongo no 2º dia após inoculação. Em abcissas as diferentes doses e em ordenadas os índices K. O intervalo entre as linhas pontilhadas corresponde ao desvio padrão da média dos animais normais.

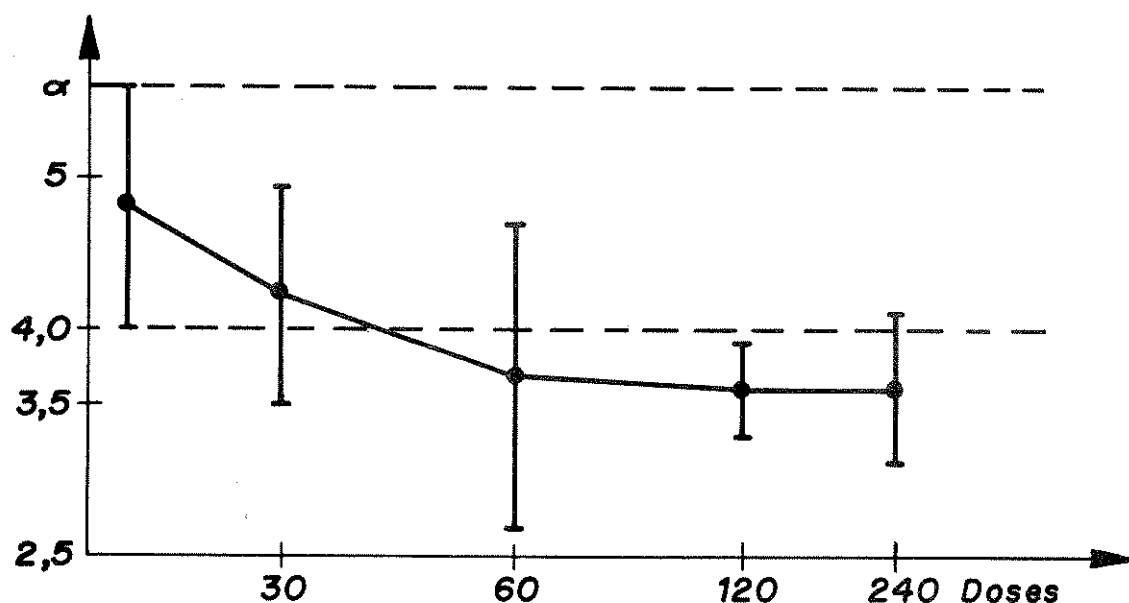


FIGURA 6 - Efeito de diferentes doses do EBTC sobre a atividade fagocitária do SMF do camundongo no 2º dia após inoculação. Em abcissas as diferentes doses e em ordẽnadas os índices α .

O intervalo entre as linhas pontilhadas corresponde ao desvio padrão da média dos animais normais.

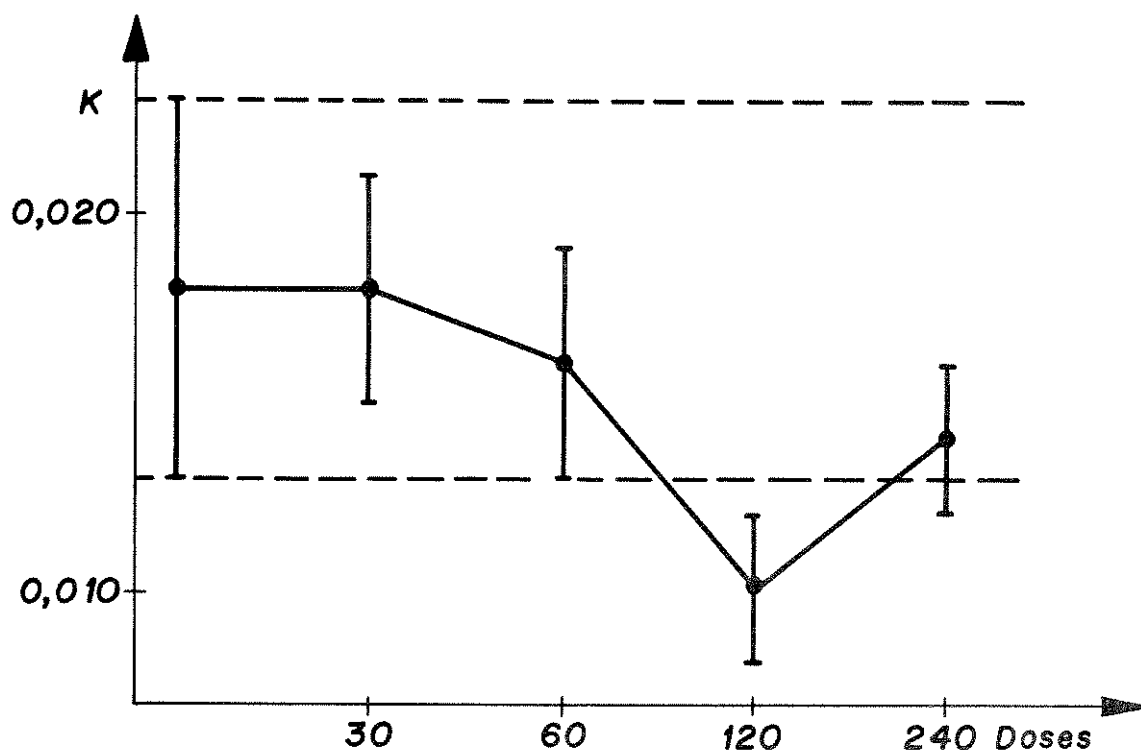


FIGURA 7 - Efeito de diferentes doses do EBTC sobre a atividade fagocitária do SMF do camundongo no 10º dia após inoculação. Em abcissas as diferentes doses e em ordẽnadas os índices K.

O intervalo entre as linhas pontilhadas corresponde ao desvio padrão da média dos animais normais.

ADENDO

Os resultados obtidos, foram submetidos à análise estatística, comparando-se as médias, através do teste τ . Obteve-se:

Fig.	Variável	Dose EBTC ug proteína	Dia	τ	
fig. 1	κ	240	10	4,0	$p < 1\%$
fig. 1	κ	240	15	2,25	$p < 5\%$
fig. 2	α	240	10	3,7	$p < 1\%$
fig. 6	α	60	2	3,0	$p < 5\%$
fig. 6	α	120	2	3,6	$p < 1\%$
fig. 6	α	240	2	3,4	$p < 1\%$
fig. 7	κ	120	10	2,16	$p < 5\%$
fig. 8	α	30	10	3,1	$p < 1\%$
fig. 8	α	60	10	3,1	$p < 1\%$
fig. 8	α	120	10	3,4	$p < 1\%$
fig. 8	α	240	10	2,94	$p < 5\%$
fig. 4	massa do baço	240	1	5,0	$p < 1\%$
fig. 3	massa do fígado	240	10	2,25	$p < 5\%$

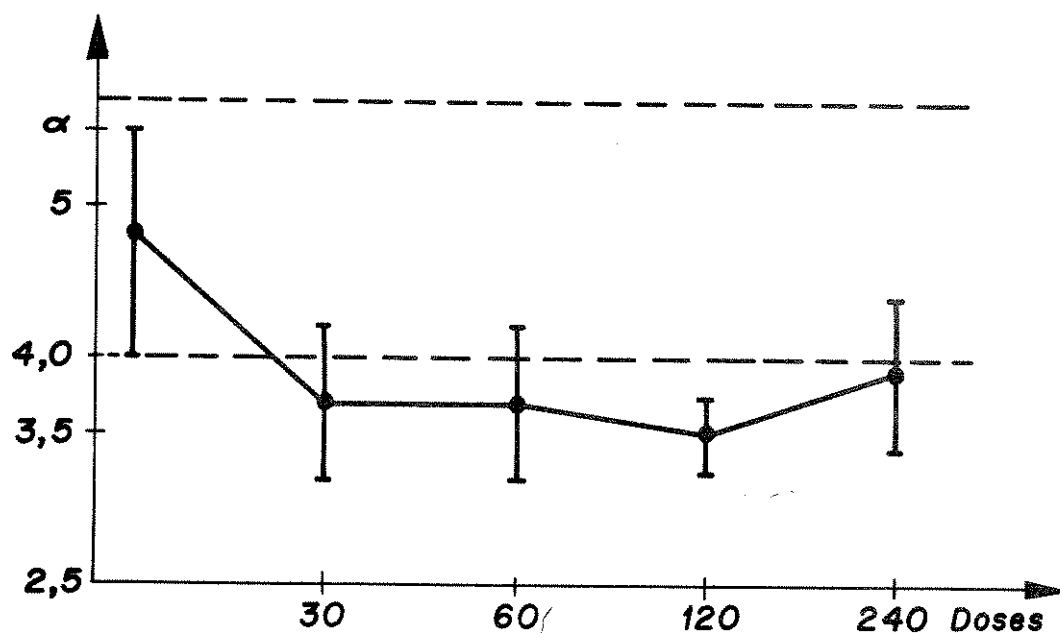


FIGURA 8 - Efeito de diferentes doses do EBTC sobre a atividade fagocitária do SMF do camundongo no 10º dia após inoculação. Em abcissas as diferentes doses e em ordenadas os índices α .

O intervalo entre as linhas pontilhadas corresponde ao desvio padrão da média dos animais normais.

Verifica-se nestes resultados que ocorre, no 2º dia após a inoculação, uma diminuição do índice α apenas às doses superiores a 30 μg (figura 6). Os mesmos índices, quando determinados no 10º dia após a inoculação, apresentam resultados diferentes, uma vez que o índice α está diminuído para todas as doses, enquanto que o índice de K apresenta-se diminuído apenas para as doses iguais ou superiores a 120 μg (figuras 7 e 8), mantendo-se dentro dos limites normais no 2º dia (figura 5).

Verificou-se também nestes animais a hepatomegalia, mais acentuada no 10º dia após a inoculação e sem grandes diferenças consoantes às doses empregadas. Tais resultados, com os respectivos desvios padrões das médias de no mínimo 5 animais, estão representados nas figuras 9 e 11 pela relação massa do animal/massa dos órgãos.

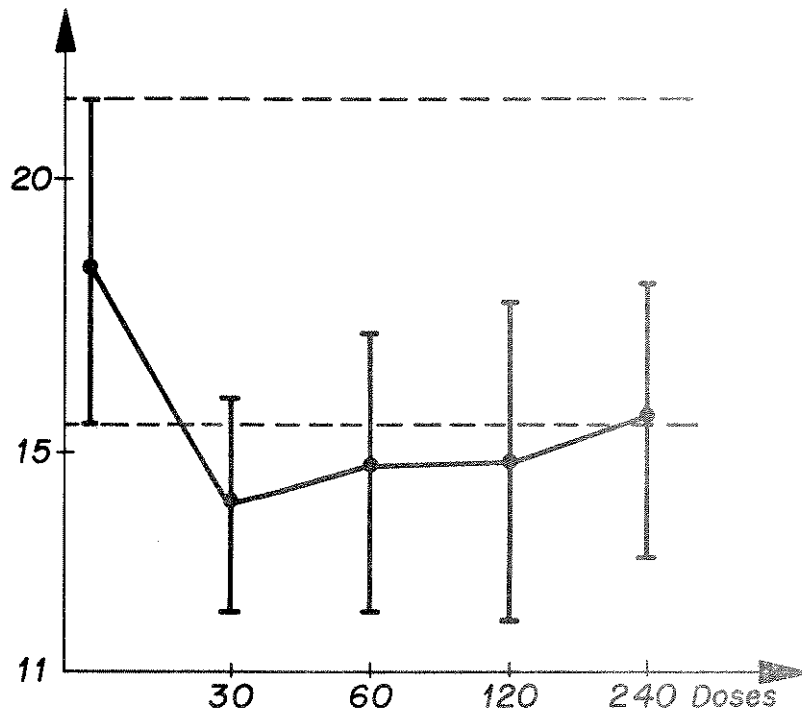


FIGURA 9 - Efeito de diferentes doses do EBTC sobre a relação massa do animal/massa dos órgãos (fígado e baço) no 2º dia após a inoculação. Em abscissas as diferentes doses e em ordenadas a relação citada. O intervalo entre as linhas pontilhadas corresponde ao desvio padrão da média dos animais normais.

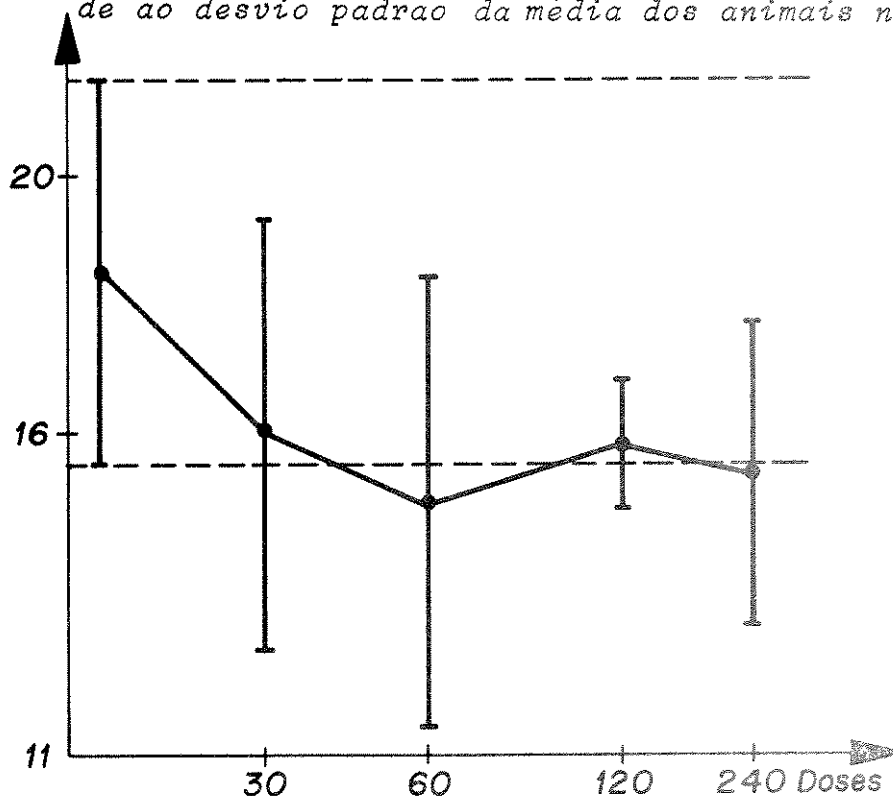


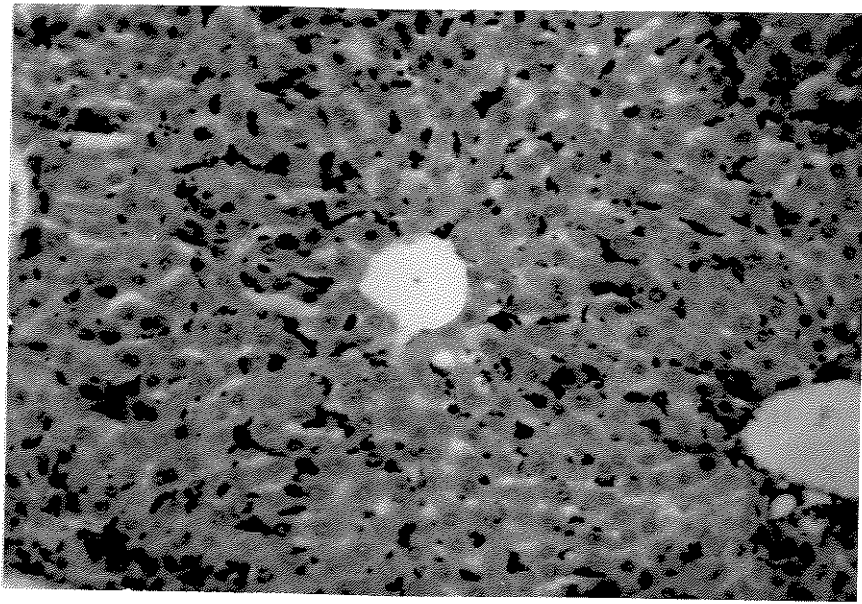
FIGURA 10 - Efeito de diferentes doses do EBTC sobre a relação massa do animal/massa dos órgãos (fígado e baço) no 10º dia após a inoculação. Em abscissas as diferentes doses e em ordenadas a relação citada. O intervalo entre as linhas pontilhadas corresponde ao desvio padrão da média dos animais normais.

III.3 - Aspecto histológico do fígado e baço após a administração do EBTC

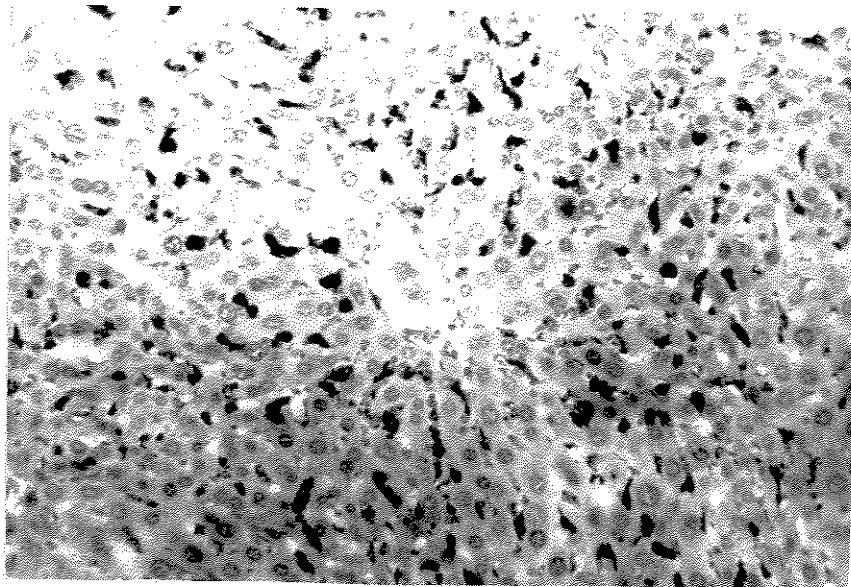
III.3.1 - Fígado - Nítida hiperplasia das células de *Kupffer* no 10º dia após a inoculação, a maioria com carbono; mantendo-se intacta toda arquitetura do órgão, sem comprometimento dos hepatócitos, veias centrolobulares e dos espaços porta. Este aspecto não varia perceptivelmente nos demais dias após inoculação do EBTC; nota-se no entanto maior número de macrófagos no 10º dia após inoculação (fotos 1 e 2).

III.3.2 - Baço - Acentuada hipertrofia dos nódulos linfáticos, devido a proliferação da coroa perinodular, envolvida na periferia por numerosas células possuindo carbono no citoplasma, sobretudo no mesmo dia após a inoculação.

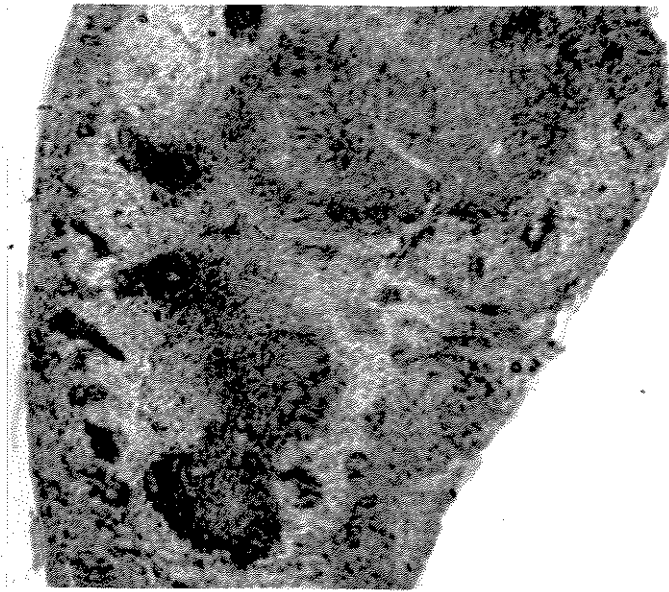
No 10º dia após a inoculação, persiste o aspecto anterior, porém com certa redução dos nódulos linfáticos e maior celularidade da polpa vermelha, que a coloração com azul de toluidina identifica como devida à plasmocitogênese (fotos 3, 4, 5, 6 e 7).



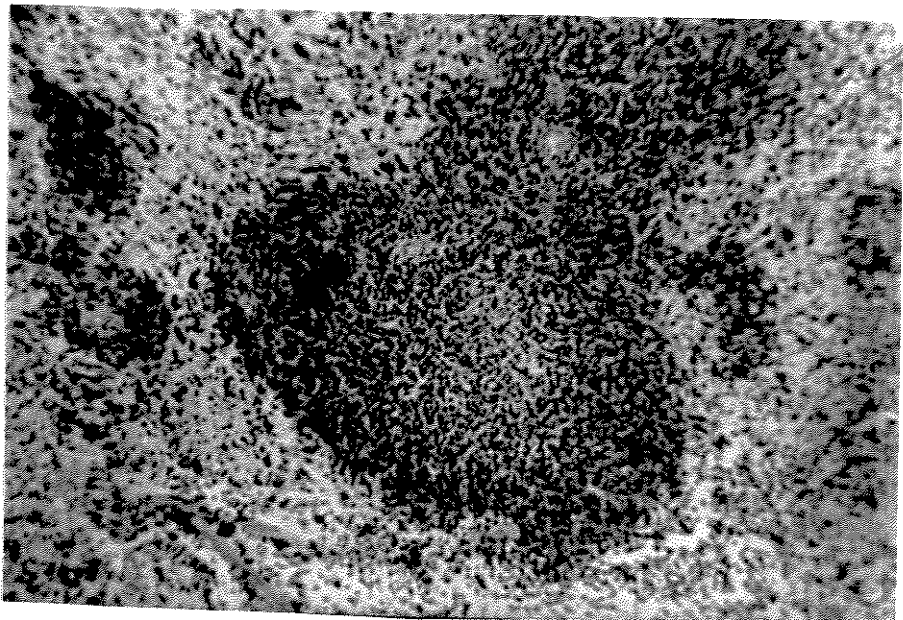
FOTOGRAFIA 1 - *Aspecto histológico do fígado do camundongo inoculado com EBTC (240 µg) no 19º dia após a inoculação.*
Aumento - 190 x



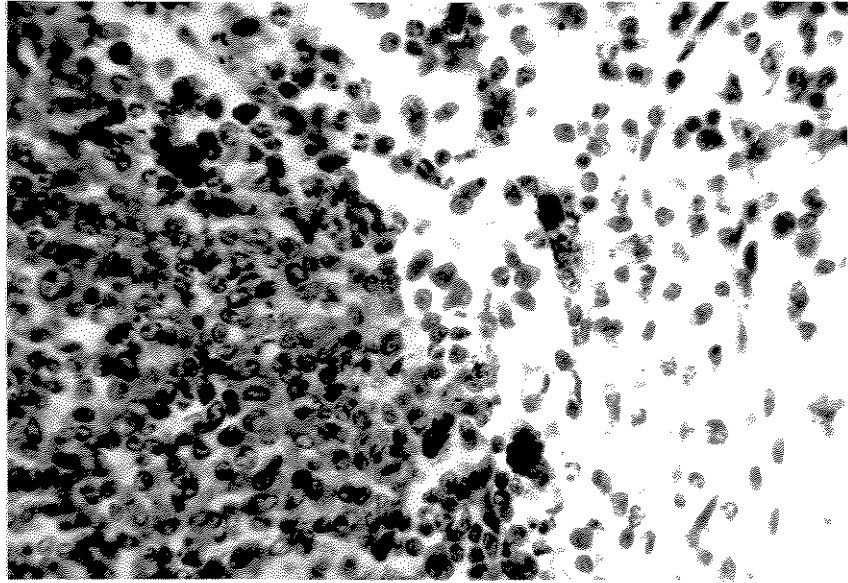
FOTOGRAFIA 2 - *Aspecto histológico do fígado do camundongo inoculado com EBTC (240 µg) no 109º dia após a inoculação.*
Aumento - 190 x



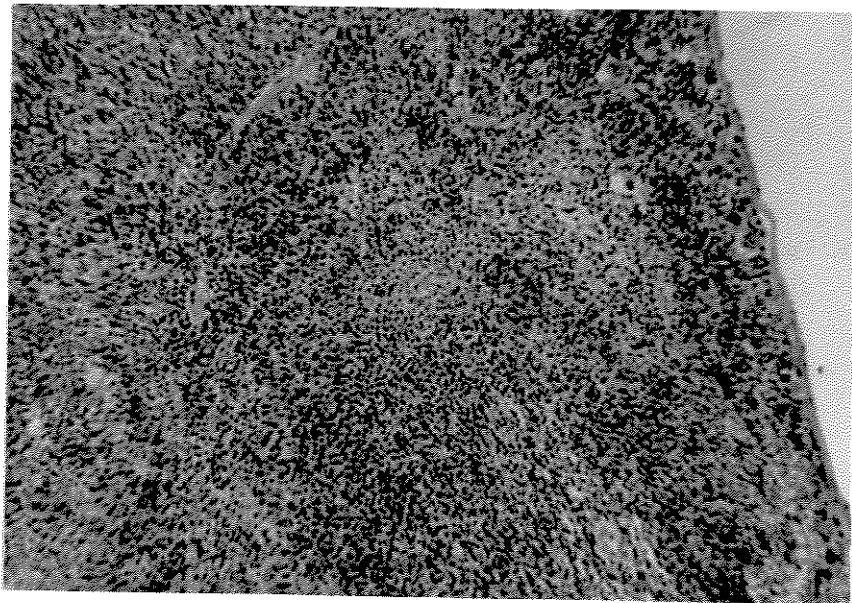
FOTOGRAFIA 3 - Aspecto histológico do baço do camundongo inoculado com EBTC (240 µg) no 19 dia após a inoculação.
Aumento - 50 x



FOTOGRAFIA 4 - Aspecto histológico do baço do camundongo inoculado com EBTC (240 µg) no 19 dia após a inoculação.
Aumento - 190 x



FOTOGRAFIA 5 - Aspecto histológico do baço do camundongo inoculado com EBTC (240 µg) no 19 dia após a inoculação.
Aumento - 700 x



FOTOGRAFIA 6 - Aspecto histológico do baço do camundongo inoculado com EBTC (240 µg) no 109 dia após a inoculação.
Aumento - 190 x

III.4 - Efeito do EBTC sobre o título das aglutininas e on?
de células esplênicas formadoras de rosetas - Veri
ficando o efeito do EBTC sobre a depuração da carbo
no coloidal, procurou-se estudar o efeito deste ex
trato sobre a produção de aglutininas e a formação
de rosetas por parte das células esplênicas, uma vez
que a fagocitose do antígeno, no caso as hemácias
de carneiro, poderia estar comprometida pela ação
do EBTC sobre o Sistema Mononuclear Fagocitário.

Para testar esta hipótese, animais foram in
culados com doses crescentes do EBTC, de 30 μ g a 240
 μ g de proteína, e receberam em seguida 10^8 hemácias
de carneiro também por via endovenosa.

No 7º dia após a inoculação, determinou-se o
título das aglutininas e a formação de rosetas pe
las células esplênicas. Os resultados são apresen
tados na tabela I e representam a média de 10 ani
mais para cada grupo experimental.

TABELA I - *Efeito do EBTC sobre a resposta imunitária do camun
dongo inoculado com H.C. uma hora após a inoculação do
extrato*

T R A T A M E N T O	DOSE DE EBTC μ g PROT	Nº DE ROSETAS/ 1000 Cels	TÍTULO AGLUTININAS
Injeção do EBTC segui- da 1 hora após da inje ção de 10^8 H.C.	240 120 60 30	1,3 3,3 5,6 11,2	1/128 1/64 1/64 1/64
<u>CONTROLE</u>			
a) inoculados apenas com 10^8 H.C.	0	8,3	1/64
b) inoculados apenas com EBTC	240	0,5	0
c) não inoculados	0	0,3	0

Como havíamos verificado que o máximo de de pressão da velocidade de depuração do carbono coloidal, ocorre no 10º dia após a inoculação do EBTC, procuramos verificar qual seria o efeito sobre a resposta imunitária do camundongo, se a imunização com H.C. fosse efetuada neste dia.

Os resultados são apresentados na tabela II e representam a média de 10 animais para cada grupo experimental.

TABELA II - Efeito do EBTC sobre a resposta imunitária do camundongo inoculado com H.C. 10 dias após a inoculação do extrato.

<i>T R A T A M E N T O</i>	<i>DOSE DE EBTC µg PROT</i>	<i>Nº DE ROSETAS/ 1000 Cels</i>	<i>TÍTULO AGLUTININAS</i>
Injeção do EBTC seguida 10 dias após da injeção de 10 ⁸ H.C.	240 120 60 30	35,8 19,8 13 9	1/64 1/64 1/32 1/64
<u>CONTROLE</u>			
a) inoculados apenas com 10 ⁸ H.C.	0	8,3	1/64
b) inoculados apenas com EBTC	240	0,5	0
c) não inoculados	0	0,3	0

A possibilidade da ação do EBTC ser sobre o macrófago do S.M.F., o qual estaria comprometido para realizar a fagocitose da hemácia de carneiro, foi testada invertendo-se a ordem de inoculação do antígeno, ou seja, inoculando-se anteriormente hemácias de carneiro e posteriormente o EBTC. Da mesma forma, determinou-se o título das aglutininas e a formação de rosetas pelas células esplênicas 7 dias após. Os resultados são afixados na tabela III representando a média de 10 animais para cada grupo experimental.

TABELA III - Efeito do EBTC sobre a resposta imunitária do ca
mundongo inoculado antes ou após com 10^8 H.C.

<i>T R A T A M E N T O</i>	<i>Nº ROSETAS/1000 Cels</i>	<i>TÍTULO DE AGLUTININAS</i>
Injeção do EBTC seguida 1 hora após da injeção de 10^8 H.C.	10,3	1/32
Injeção de 10^8 H.C. se guida 1 hora após da in jeção de 240 µg de EBTC	19,8	1/32
<u>CONTROLE</u>		
a) inoculados apenas com EBTC	0,8	0
b) inoculados apenas com 10^8 H.C.	19,3	1/64

D I S C U S S Ã O

O efeito do EBTC sobre a depuração sanguínea do carbono coloidal, estudado com a dose de 240 μ g de proteína do EBTC, nos diferentes dias após a inoculação, revelou no 10º dia, uma diminuição dos Índices K e α , à metade dos valores da média dos animais normais. Estes valores se normalizaram a partir do 20º dia.

O emprego de diferentes doses do EBTC não altera os valores do Índice K, permanecendo o mesmo dentro dos limites normais, quando determinado no 2º dia após a inoculação. No entanto com relação ao Índice α , verificou-se que o mesmo está diminuído para as doses superiores a 30 μ g de proteína do EBTC.

A determinação destes mesmos Índices no 10º dia após a inoculação, revela uma diminuição de K às doses superiores a 120 μ g e de α à todas as doses empregadas.

Da análise destes resultados verificamos que o efeito do EBTC sobre a atividade fagocitária do S.M.F., quando determinado pelo Índice K, fez-se no 10º dia após a inoculação, onde se nota inclusive o menor desvio padrão da média dos valores do Índice granulopéxico.

Porém, ao se estudar a atividade fagocitária do S.M.F. por mg de tecido hepatoesplênico, através do Índice α , verificou-se que o mesmo está diminuído nas doses superiores a 30 μ g já no 2º dia após a inoculação do EBTC.

A determinação da massa do fígado e do baço, revela uma esplenomegalia no 1º dia após a inoculação e uma hepatomegalia no 10º dia, independentemente da dose empregada.

Estes achados explicam a alteração da relação massa do animal/massa dos órgãos, determinada com diferentes doses do EBTC, no 2º dia e 10º dia após a inoculação do extrato.

O estudo histológico do baço mostra nítida hipertrofia dos nódulos linfáticos, com a proliferação da coroa perinodular, aspecto este verificado no 1º dia após a inoculação.

Trabalhos anteriores , utilizando diferentes cepas de *T. cruzi* , (*Tagliaferro et Pizzi* - 1955 ; *Rêgo* - 1959 ; *Muniz* - 1962 ; *Pizzi* - 1963 ; *Andrade et al* - 1967 ; *Lima Pereira* - 1974) , revelaram aspectos idênticos , referindo-se ao aumento dos nódulos linfáticos e ao estado de repleção sanguínea dos seios venosos, permitindo o destaque dos nódulos demarcados pela coroa perinodular. *Rêgo* (1959) utiliza também um extrato obtido das formas de cultivo, descrevendo as mesmas alterações histológicas.

Os mesmos autores, descreveram na polpa vermelha uma diminuição acentuada dos cordões linfáticos , correspondendo a uma linforrexia, e à infiltração difusa de neutrófilos com tendência à localização subcapsular e justatrabecular.

Estes achados evidenciam o estado reacional do órgão à inoculação do extrato. No 10º dia , no entanto , observou-se a diminuição dos nódulos linfáticos já não salientada pela repleção sanguínea dos seios venosos , e ao aumento da polpa vermelha devida a um certo grau de plasmocitogênese.

O estudo histológico do fígado revelou uma hiperplasia das células de *Kupffer* sobretudo no 10º dia, coincidindo com o aumento da massa do órgão.

Da mesma forma, *Rêgo* (1959) inoculando extrato das formas de cultivo descreveu a hiperplasia das células sinusoidais, referindo-se inicialmente a elementos linfóides , a células reticulares primitivas ativadas e a acúmulos de plasmoblastos ; posteriormente ao 5º dia existe evidência apenas daquelas células com o desaparecimento destas últimas.

Stiffel (1958 a ; 1958 b) e *Stiffel et al* (1970) estudando a cinética da fagocitose do S.M.F. estabelecem que a redução da atividade fagocitária pode ser obtida de duas maneiras : a) pelo bloqueio do S.M.F., entendido como a saturação dos macrófagos com grandes doses de coloide ou b) pelo fenômeno da competição coloidal, entendido como a diminuição da fagocitose de um dado coloide pela presença na circulação de um coloide competidor.

Em nosso modelo experimental, com exceção das experiências em que o EBTC e o carbono coloidal foram inocula

dos no intervalo de uma hora, a depuração sanguínea do carbono foi realizada no mínimo 24 horas após a inoculação do extrato.

Este fato leva-nos a excluir a hipótese da com petição entre o EBTC e o carbono coloidal.

Assim sendo, a hipótese mais provável para ex plicar a diminuição dos índices granulopêxicos é a do bloqueio do S.M.F. pelo extrato, com as características de : a) ter seu efeito retardado, uma vez que manifestou-se no 10º dia após a inoculação com doses superiores a 120 µg e b) quando expressado pelo índice α , manifestar-se já a partir do 2º dia com doses superiores a 30 µg, e no 10º dia mesmo às doses de 30 µg.

Estes achados diferem das observações feitas no estudo do bloqueio do S.M.F. por coloides como o próprio car bono coloidal ou óxido de ferro.

Nestes casos caracteriza-se um bloqueio ime diato e de curta duração, seguido de uma hiperplasia do S.M.F., acompanhada do aumento dos índices K (*Stiffel et al* - 1970).

Com relação ao EBTC caracterizamos um bloqueio retardado coincidindo com o ápice da hiperplasia do S.M.F. Estes dados leva-nos a admitir :

- a) embora haja um aumento do número de fagóci tos, observado particularmente no fígado (células de *Kupffer*), tais cél ulas apresen tam-se modificadas em sua capacidade de fa gocitar partículas estranhas a níveis nor mais ;
- b) o fator do EBTC responsável pelo efeito de press or sobre o fagócito deve ser ativo em baixíssimas concentrações, visto que, a ino cula ção de 60 µg do EBTC - contendo dife rentes substâncias em concentrações variá veis - foi capaz de provocar um efeito men surável no 2º dia após a inoculação.

Habitualmente , ao aumento do número de fagócitos corresponde um aumento do índice K e uma maior produção de anticorpos (*Halpern et al* - 1958 b; *Halpern* - 1959; *Thorbecke et Benacerraf* - 1962 ; *Stiffel* - 1958 a; *Stiffel et al* - 1970).

Este fato , induziu-nos a estudar a relação existente entre a diminuição do índice K e a produção das aglutininas contra hemácias de carneiro e a formação de rosetas pelas células esplênicas do camundongo da mesma maneira que *Stiffel et al* (1968).

A produção de aglutininas contra hemácias de carneiro não foi afetada pela inoculação prévia de diferentes doses do EBTC.

Resultados semelhantes foram obtidos por *Biozzi et al* (1963 b), que não encontraram correlação entre o aumento ou diminuição do índice de fagocitose , provocado pela inoculação de lípidos, e a produção das aglutininas contra hemácias de carneiro.

A demonstração da existência de lípidos no EBTC (*Corsini et al* - 1972 ; *Repka* - 1973) permite levantar a hipótese de que sejam estes componentes do EBTC , os responsáveis pela depressão da atividade fagocitária.

No entanto, se não houve diferenças na produção de aglutininas, a formação de rosetas pelas células esplênicas apresenta nítida depressão, evidenciada sobretudo com 240 µg de proteína do EBTC, desde que o extrato seja inoculado anteriormente ao antígeno e no mesmo dia.

De fato, a inoculação do extrato , meia hora antes das hemácias de carneiro, provoca nas doses de 60 µg - 120 µg - 240 µg, uma diminuição, dose dependente, do número de células formadoras de rosetas.

Considerando que a resposta imune a determinados antígenos ditos T dependentes, como é o caso das H.C. , envolve a participação de três elementos do sistema linfo-reticular - o macrófago, o linfócito T e o linfócito B - (*Fischman et Adler* - 1963 ; *Nossal et al* - 1963 ; *Askonas et Rhodes* - 1965 ; *Argyris* - 1967 ; *Claman et al* - 1966 ; *Askonas et Jarøsková* - 1970 ; *Brody* - 1970 ; *Unanue et Cerottini* - 1970 ; *Playfair*

- 1971 ; *Unanue* - 1972 ; *Davie et Paul* - 1974) a diminuição do número de rosetas poderia ser explicada por : a) competição antigênica entre o extrato e as H.C. pelos elementos envolvidos na resposta imune e/ou b) pela depleção a nível dos linfócitos T e/ou B.

A verificação que a administração das H.C. uma hora antes da inoculação do EBTC, não altera o número das células formadoras de rosetas fala em favor da hipótese da competição antigênica por um dos elementos envolvidos na resposta, provavelmente o macrófago, embora não se possa excluir a competição e/ou depleção a nível de T ou B.

A rarefação da polpa vermelha do baço verificada após a inoculação do EBTC, fala a favor de uma possível depleção a nível dos elementos linfóides embora não possamos identificá-los como T ou B. Fenômenos idênticos verificaram *Tagliaferro et Pizzi* - (1955) e *Lima Pereira* - (1974), ambos trabalhando com infecções experimentais de camundongos, referindo-se este último à diminuição do título aglutinante e das células formadoras de placas contra H.C.

Assim sendo, concluímos que a competição entre o EBTC e as H.C. pelos macrófagos é pelo menos um dos fatores responsáveis pela diminuição das células formadoras de rosetas.

Esta competição entre o EBTC e as H.C. a nível do macrófago corresponderia a um bloqueio do S.M.F. pelo extrato, alterando a fagocitose do antígeno, um dos passos importantes na resposta imune (*Rowley* - 1962 ; *Frei et al* - 1965).

O bloqueio do S.M.F. e a conseqüente diminuição da resposta imunitária a antígenos particulados foi bem caracterizada por *Sabet et al* - (1969), *Sabet et Friedman* (1969) e *Cruchaud* - (1968) empregando H.C. e carbono coloidal como bloqueador. Achados idênticos foram obtidos por *Perkins* (1970) o qual caracteriza como *Fischman et Adler* (1970) e *Rice et Fischman* (1974) populações diferentes de macrófagos relacionados com a resposta imunitária.

Considerando que a fagocitose poderia ser dividida em três etapas : a captação, a ingestão propriamente di

ta e a digestão do antígeno (*Rabinovitch* - 1970), qualquer estudo do bloqueio do S.M.F. deverá levar em conta que a simples diminuição da velocidade de depuração das partículas sanguíneas, não corresponde necessariamente a um comprometimento das funções digestivas do macrófago (*Wiener et Bandieri* - 1974).

Assim, mesmo a marcação das H.C. com Cr^{51} poderia fornecer apenas dados da cinética da depuração se não fosse estudada a capacidade digestiva dos macrófagos, após a inoculação do agente bloqueador, pela técnica de degradação dos antígenos marcados pelo I^{131} , preconizada por *Biozzi et al* (1958 b ; 1959).

Este fato evidencia-se pelos resultados obtidos quando os animais inoculados com EBTC receberam as H.C. no 10º dia, correspondendo ao mínimo valor de K e α , apresentando no entanto um aumento do número de células formadoras de rosetas devido à hiperplasia do S.M.F. causada pelo EBTC, a exemplo do que ocorre com a inoculação do BCG (*Howard et al* - 1959), *Corynebacterium parvum* (*Neveu et al* - 1964 ; *Halpern et al* - 1964) e endotoxinas bacterianas (*Biozzi et al* - 1955 ; *Benacerraf et Sebestyen* - 1957).

Estes fatos evidenciam a separação no fagócito das funções de captação, ingestão e digestão das partículas oferecidas à fagocitose, levando apenas à uma diminuição da velocidade de depuração das partículas de carbono coloidal, mantendo íntegras as funções de digestão do antígeno particulado. A diminuição da fagocitose do carbono coloidal ocorreria por um comprometimento dos receptores de membrana do fagócito.

A negatização da reação tuberculínica em crianças tuberculosas durante o sarampo, ocorrendo inclusive um agravamento posterior da doença tuberculosa, verificado por *von Pirquet* em 1908, fez supor a existência de uma imuno-supressão durante as infecções por microorganismos.

Tais fatos no entanto foram ignorados, assim também como os de *Bloomfield e Matier* em 1919, até os achados de *Old et al* em 1960, os quais notaram uma diminuição na produção de hemolisinas às hemácias de carneiro em camundongos infectados com o vírus leucemogênico de *Friend (FV)* (*Salaman* - 1970).

Salaman (1970) refere-se à imuno-supressão causada por vírus, estudando sobretudo a resposta imunitária do camundongo infectado com FV, às hemácias de carneiro, quando en tão nota diminuição das células formadoras de placas, no baço dos animais infectados, apesar da esplenomegalia apresentada por eles.

Salaman et Wedderburn (1969), baseados na teoria de *Dalldorf*, revista e ampliada por *Burkitt* em 1968, a qual correlaciona a alta incidência do linfoma de *Burkitt* e a infecção malárica crônica, estudou a produção de células formadoras de placas em camundongos inoculados com *Plasmodium berghei yoelii*. Constatou que a administração de antígeno no 10º dia após a ino culação dos esporozoários, exatamente no pico da parasitemia, diminui a produção de hemolisina e de células formadoras de pla cas a hemácias de carneiro.

Estes achados foram posteriormente confirma dos por *Barker* (1971) e *Greenwood et al* (1971 a ; 1971 b), os quais acrescentaram que a resposta a antígenos não particulados como soroalbumina humana (SAH) e hemocianina (HMC) não se encon tra diminuída; diferentemente da resposta às hemácias de carneiro e dos complexos de gamaglobulina humana (GGH) agregados pelo calor.

Estes dados nos parecem importantes, uma vez que a fagocitose de antígenos particulados é grandemente dimi nuída pelo bloqueio do S.M.F. (*Stiffel et al* - 1970).

Este fato pode explicar os achados de *Salaman* (1970) o qual salienta que a imuno-supressão causada pelo vírus FV somente pode ser verificada se o mesmo for inoculado anteri ormente às hemácias de carneiro; pois que a administração con comitante do vírus e do antígeno diminui apenas levemente a pro dução de placas, e não há praticamente alteração quando o vírus é inoculado posteriormente ao antígeno.

O fenômeno de imuno-supressão durante a tri panosomíase africana, foi estudado por *Goodwin et al* em 1972, empregando *Trypanosoma brucei* e coelhos, verificando-se neste modelo uma diminuição do título aglutinante.

Idêntico fenômeno é descrito nas fases iniciais da esquistossomose mansônica experimental do camundongo, estudado por *Da Mota Santos et al* (1973).

Com relação ao *T. cruzi*, *Emmanuel Dias* em 1932, chama a atenção para o bloqueio do S.M.F. exercido pelo parasita e *Denison* em 1943 verificou a diminuição do título lítico anti-*T. cruzi* nos soros dos animais cujo S.M.F. tenha sido bloqueado pelo azul tripan. *Andrade et al* (1967) descrevem maior parasitemia nos animais cujo S.M.F. tenha sido bloqueado pelo carbono coloidal.

Lima Pereira (1974) caracterizou durante a infecção chagásica de camundongos albinos "*Swiss*", inoculados com a cepa Y do *T. cruzi*, uma imuno-supressão verificada a nível das aglutininas e das células formadoras de placas contra hemácias de carneiro.

Desta maneira verificamos que fenômenos de imuno-supressão podem ser notados nas mais diversas parasitoses, inclusive na tripanosomíase chagásica, embora seus mecanismos permaneçam obscuros.

Assim, *Murray et al* (1974) trabalhando com o *T. brucei* concluíram pela atuação a nível de linfócito T e *Freeman et al* (1974) concluíram pela atuação a nível dos linfócitos B, ao passo que *Greenwood et al* (1971 b) invocaram a diminuição da possibilidade de contato do antígeno com as células imunologicamente competentes como a responsável pela imuno-supressão em seu modelo experimental.

Nossos achados referem-se a uma diminuição do número de células formadoras de rosetas quando da aplicação simultânea do EBTC e das H.C., aquele procedendo a estas, fenômeno este que poderia ser explicado por uma competição ao nível do macrófago, por um fenômeno idêntico àquele verificado por *Salaman* (1970).

Embora não tenha havido qualquer alteração do título aglutinante concluimos pela existência de uma imuno-supressão a H.C., corroborando a opinião de *Pross et Eidinger* (1974) os quais insistem na necessidade do emprego de diversas técnicas para a evidenciação do fenômeno da competição antigênica.

Esta competição pelo macrófago, embora o bloqueio do S.M.F. pelo EBTC não tenha sido evidenciado através da técnica de depuração sanguínea do carbono coloidal, pode ser perfeitamente o denominador comum entre as diferentes parasitoses e responsável em parte pelos fenômenos imuno-supressivos verificados nessas situações.

O emprego do EBTC embora com o inconveniente da não caracterização da fração ou das frações responsáveis pela imuno-supressão, traz no entanto a possibilidade do emprego de doses precisas do antígeno, impossível de determinação nos casos de parasitoses experimentais, onde a taxa de multiplicação do parasita pode ser diferente nos diversos animais experimentados, além de permitir o fracionamento do extrato para a caracterização de cada uma de suas frações e seu papel biológico.

C O N C L U S Õ E S

- 1 - O EBTC interfere com a depuração sanguínea do carbono coloidal, diminuindo os índices K e α , sobretudo no 10º dia após a inoculação do extrato.
- 2 - Os animais inoculados com o EBTC e em seguida com H.C. apresentam uma diminuição do número de células esplênicas formadoras de rosetas.
- 3 - A inoculação das H.C. no 10º dia após a inoculação do EBTC apresenta um aumento do número de células formadoras de rosetas correspondendo a um efeito adjuvante do extrato.
- 4 - Não há diferença nos títulos aglutinantes entre os diferentes grupos experimentais.
- 5 - Um dos prováveis mecanismos para explicar a imuno-supressão evidenciada, seria um bloqueio exercido a nível do S.M.F., pelo extrato.

B I B L I O G R A F I A

- [1] *ANDRADE S.G. ; ARAUJO DA SILVA A. ; ANDRADE ZILTON A.*
Bloqueio e estimulação do SRE na Doença de Chagas (Es
tudo experimental em camundongos) . Gaz. Med. Bahia
67 (1) - 19 - 30 - Jan/Abr - 1967.

- [2] *ARGYRIS B.F.* - Role of macrophages in antibody produc
tion. Immune response to sheep red blood cells. J.
Imm 99 - nº 4 - 1967.

- [3] *ASKONAS B.A. ; JORŮSKOVÁ L.* - Antigen in macrophage
and antibody induction. In : Mononuclear Phagocytes
Ed. by R. van Furth - Blackwell Scientific Publicat
ions - 1970.

- [4] *ASKONAS B.A. ; RHODES J.M.* - Immunogenicity of antigen
containing ribonucleic acid preparations from macrop
hages. Nature 205 - 1965.

- [5] *BARKER C.R.* - Experimental malaria - Effects upon the
immune response to different antigens - The Journal of
Infectious Diseases - 123 - nº 1 - 1971.

- [6] *BENACERRAF B. ; SEBESTYEN M.M.* - Effect of bacterial
endotoxins on the reticulo-endothelial system. Fed.
Proc. 16 - 1957.

- [7] *BIOZZI G. ; BENACERRAF B. ; HALPERN B.N.* - Quantitat
ive study of the granulopectic activity of the retic
ulo-endothelial system. II - A study of the kinetics
of the granulopectic activity of the RES in relation
to the doses of carbon injected. Relationship between
the weight of the organs and their activity . Brit.
J. Exptl. Pathol - 441 - 457 - 1953.

- [8] *BIOZZI G. ; BENACERRAF B. and HALPERN B.N.* - The effect of Salmonella typhi and its endotoxins on the phagocytic activity of the reticulo-endothelial system in mice. Brit. J. Exptl Pathol - 1955.
- [9] *BIOZZI G. ; BENACERRAF B. ; STIFFEL C. et HALPERN B.N.* Étude quantitative de l'activité granulopexique du système réticulo-endothélial chez la Souris - Séance du 13 mars 1954. C. R. Soc. Biol. 1954.
- [10] *BIOZZI G. ; HALPERN B.N. ; STIFFEL C. ; MOUTON D.* - Quantitative study of the metabolic activity of the Küpffer cells on a heat-denatured serum albumin labeled with I^{131} . Brit. J. Exptl Pathol - 39 - 1958 b.
- [11] *BIOZZI G. ; STIFFEL C. ; HELPERN B.N. ; MOUTON D.* - Étude de la fonction métabolique des cellules de Küpfer. Rev. Franç. et Clin. & Biol. 4 - 1959.
- [12] *BIOZZI G. ; STIFFEL C. ; MOUTON D.* - Stimulation et depression de la fonction phagocytaire du système réticulo-endothélial par des émulsion des lipides. Relation avec quelques phénomènes immunologiques. Rev. Franc. et Clin. & Biol. 8 - 1963 b.
- [13] *BIOZZI G. ; STIFFEL C. ; MOUTON D. ; BOUTHILLIER Y. and DECREUSEFOND C.* - A kinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice immunized intravenously with sheep erythrocytes. Imm - 14 - 7 - 1968.
- [14] *BIOZZI G. ; STIFFEL C. ; MOUTON D. ; LIACOPOULOS BRIOT M. ; DECREUSEFOND C. et BOUTHILLIER Y.* - Étude du phénomène de l'immuno-cito-adherence au cours de l'immunisation. Ann. Inst. Pasteur n° 4242 - Tomo 110 - pp. 7 - 32 - 1966.
- [15] *BRODY T.* - Identification of two cell populations required for mouse immunocompetence. The J. of Imm - 105 n° 1 - 1970.

- [16] *BROWN K.N.* - Nature and variations of parasite antigens. Bol. Ofic. Sanit. Panamer. 66 - 1969.
- [17] *BROWN K.N. and WILLIAMSON J.* - Antigens of Brucei Trypanosomes. Nature - June 30 - 194 - 1962.
- [18] *CAPRON A.R.* - L'Antigene parasitaire. Structure et fonction. The Journal of Parasitology vol 56 (4). Section II. Part 3. Second International Congress of Parasitology - 1970.
- [19] *CAPRON A.R. ; BIGUET J. ; VERNES A. et AFCHAIN D.* - Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. Path. Biol. 16 1968.
- [20] *CHAGAS C.* - Nova Tripanosomíase Humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotripanum Cruzi n.ge., n.sp. , agente etiológico de nova entidade mórvida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz - Tomo I - Fascículo I - 1909.
- [21] *CLAMAN H.N. ; CHAPERON E.A. and TRIPLETT R.F.* - Immuno competence of transfered thymus - marrow cell combination. J. Imm - 97 - 1966.
- [22] *CORSINI A.C. ; REPKA D. e RANGEL H.A.* - Estudo sobre a imunogenicidade dos lípidos de T. cruzi. Ciência e Cultura 24 - nº 6 - Junho 1972 - Suplemento XXV Reunião Anual SBPC.
- [23] *CRUCHAUD A.* - The effect of reticulo-endothelial blockade on antibody formation and Immunologic tolerance. Lab. Invest. 19 - nº 1 - 1968.
- [24] *DAMIAN R.T.* - Molecular mimicry : Antigen sharing by parasite and host and its consequences. The American Naturalist - vol XCVIII nº 900 - 129 - 149.

- [25] *DA MOTA SANTOS T.A. ; GAZZINELLI G.; DIAS DA SILVA W; PELLEGRINO J. - Esquistossomose mansônica experimental no camundongo : aspectos imunológicos da interação parasita-hospedeiro. Ciência e Cultura vol 25 - pg 165 - nº 6 - Junho 1973 - Suplemento XXV Reunião Anual SBPC.*
- [26] *DAVIE J.M. ; PAUL W.E. - Role of lymphocytes in the humoral immune response. I - Proliferation of B lymphocytes in thymus deprived mice. The J. of Imm 113 - Nº 5 - November - 1974.*
- [27] *DENISON N. - Experimental studies on Trypanosoma Cruzi infection and reticulo-endothelial blockade in rats. An. J. Hyg. 38 - (2) - 1943.*
- [28] *DESOWITZ R.S. - Antiparasitic mechanisms in parasite infections. The Journal of Parasitology - vol 56 -II International Congress of Parasitology - 1970.*
- [29] *DIAS EMMANUEL - Le Trypanosoma Cruzi et ses rapports avec le système réticulo-endothélial. Compt.Rend.Soc. Biol. 110 - (18) - 1932.*
- [30] *DINEEN J.K. - Immunological aspects of Parasitism . Nature - 197 : 268 - 269 - 1963 a.*
- [31] *DINEEN J.K. - Antigenic relationship between host and parasite. Nature - 197 : 471 - 472 - 1963 b.*
- [32] *FISCHMAN M. and ADLER F.L. - Antibody formation in vitro - Immunopathology 3rd/Intern. Symp. P.Grabar and P.A. Mischer eds. Schwabe - Basel 1963.*
- [33] *FISCHMAN M. ; ADLER F.C. - Heterogeneity of macrophage functions in relation to the immune response. In: Mononuclear Phagocytes. Ed. by R. van Furth. Blackwell Scientific Publication - 1970.*

- [34] *FREEMAN J. ; HUDSON K.M. ; LONGSTAFFE J.A. and TERRY R.J.* - Immunodepression in Trypanosome infection. Parasitology - 67 - XXXIII - 1974.
- [35] *FREI P.C. ; BENACERRAF B. ; THORBECKE G.J.* - Phagocytosis of the antigen, a crucial step in the induction of the primary response. *Proc. Nac. Acad. Sciences - USA* 53 - 1965.
- [36] *GOBLE F.C. ; SINGER I.* - The reticulo-endothelial system in experimental malaria and Trypanosomiasis. *Ann. N. New York Acad. Sc.* 88 (1) - 1960.
- [37] *GOODWIN L.G. ; GREEN D.G. ; GUY M.W. and WOLLER A.* - Immunosuppression during Trypanosomiasis - *Br.J. Exptl Path* - 53 - 40 - 1972.
- [38] *GREENWOOD B.M. ; BROWN J.C. ; DE JESUS D.G. ; HOLBOROW E.J.* - Immunosuppression in murine malaria. I - Effect on reticulo-endothelial and germinal centre function. *Clin. Exp. Imm* 9 - 345 - 354 - 1971 a.
- [39] *GREENWOOD B.M. ; PLAYFAIR J.H.L. and TORRIGIANI G.* - Immunosuppression in murine malaria - I - General characteristics . *Clin. Exptl Imm* - 8 - 1971 b.
- [40] *HALPERN B.N.* - The role and function of reticulo-endothelial system in immunological process - *J. Pharm. Pharmacol* - 11 - 1959.
- [41] *HALPERN B.N. ; BIOZZI G. ; STIFFEL C. ; MOUTON D.* - Correlation entre l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial, et la production d'anticorps bactériens. *C. R. Soc. Biol.* 152 - 1958 b.
- [42] *HALPERN B.N. ; PRÉVOT A.R. ; BIOZZI G. ; STIFFEL C. ; MOUTON D. ; MORARD J.C. ; BOUTHILLIER Y. ; DECREUSEFOND C.* - Stimulation de l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial provoquée par Corynebacterium parvum - *J. Reticulo-Endoth. Soc.* I - 1964.

- [43] *HOWARD J.G. ; BIOZZI G. ; HALPERN B.N. ; STIFFEL C. ; MOUTON D.* - The effect of Mycobacterium tuberculosis (BCG) infection on the resistance of mice to Bacterial endotoxins and Salmonella enteritidis infection. Brit J. Exptl Pathol - 40 - 1959.

- [44] *HOWARD R.J. and NAJARIAN J.S.* - Cytomegalovirus-induced immune suppression. I - Humoral immunity. Clin. Exptl Imm - 18 - nº 1 - 1974 a.

- [45] *HOWARD R.J. and NAJARIAN J.S.* - Cytomegalovirus-induced immune suppression. II - Cellular immunity. Clin. Exptl Imm - 18 - nº 1 - 1974 b.

- [46] *KAGAN I.G.* - Characterization of parasite antigens . PAHO Advisory Comm. Med. Res. 150 - 25 - 36 - 1967.

- [47] *KIERSZENBAUN F. ; KNECHT E. ; BUDZKO D.B. ; PIZZIMENTI M.C.* - Phagocytosis : A defense mechanism against infection with Trypanosoma Cruzi. The J. of Imm 112 - nº 5 - 1974.

- [48] *LANGEVOORT H.L. ; COHN Z.A. ; HIRSCH J.G. ; HUMPHREY J.H. ; SPECTOR W.G. ; FURTH R. van* - The nomenclature of mononuclear phagocytic cells - Proposal for a new classification. In : Mononuclear Phagocytes - Ed. by R. van Furth - Blackwell Scientific Publications-1970.

- [49] *LIMA PEREIRA F.E.* - Imunosupressão durante a fase aguda da infecção de camundongos albinos pelo T. cruzi (cepa Y). Resumos do II Simpósio de Imunologia e Imunologia das Doenças Parasitárias da Sociedade Brasileira de Imunologia - Rio de Janeiro - Dezembro 1974 .

- [50] *MUNIZ J.* - Imunidade na Doença de Chagas (Trypanosomiasis Americana). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 60 (1)-103 147 - 1962.

- [51] *MURRAY P.K. ; URQUHART G.M. ; MURRAY M. and JENNINGS F.W.* - The response of mice infected with T. Brucei to the administration of sheep erythrocytes. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. - 67 - 267 - 1974.

- [52] *NEVEU T. ; BRANELLEC A. ; BIOZZI G.* - Propriétés adjuvantes de Corynebacterium parvum sur la production d'anticorps et sur l'induction de l'hypersensibilité retardée envers les protéines conjuguées. Ann. Inst. Pasteur 106 - 1964.

- [53] *NOSSAL G.J.V. ; CUNNINGHAM A. ; MITCHELL G.F.; MILLER J.F.A.P.* - Cell to cell interaction in the immune response - III - Chromosomal marker analysis of single antibody - forming cells in reconstituted , irradiated and thymectomized mice. J. Exp. Med. 128 - 1963.

- [54] *OKUMURA M. ; BRITO T. de ; SILVA L.H.P. da ; SILVA A. C. da and CORRÊA NETO A.* - The pathology of experimental Chagas' Disease in mice : I - Digestive tract changes, with a reference to necrotizing arteritis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo - 2 : 17 - 28 - 1960.

- [55] *ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD* - Informes Técnicos - 1960, 202. Enfermedad de Chagas - Informes de un grupo de Estudio. Série de Informes Técnicos nº 202.

- [56] *ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD* - Informes Técnicos - 1962, 247. Comité de Expertos en Tripanosomiasis - Série de Informes Técnicos nº 247.

- [57] *ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD* - Immunología y enfermedades parasitarias. Informe de un Comité de Experts de la O.M.S. - Organización Mundial de la Salud - Serv. Inf. Tecn. 315 - 1965.

- [58] *PELED A. and HARAN - GHERA N.* - The cellular basis of immunosuppression caused by the radiation leukaemia viruses. Imm - 16 - nº 2 - 1974.

- [59] *PERKINS E.H.* - Digestion of antigen by peritoneal macrophages. In : Mononuclear Phagocytes. Ed. by R. van Furth - Blackwell Scientific Publications - 1970.
- [60] *PIZZI T.* - Aspectos celulares de la inmunidad en la enfermedad de Chagas. Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas - vol IV - 1963.
- [61] *PIZZI T. ; MAFALDA R. and KNIERIM F.* - Immunology of Chagas'Disease. Rivista di Parassitologia - vol XV - nº 4 - Ottobre - 1954.
- [62] *PLAYFAIR J.H.L.* - Cell cooperation in the immune response. Clin. Exp. Imm - 8 - 839 - 856 - 1971.
- [63] *PROSS H.F. and EIDINGER D.* - Antigenic Competition : A review of nonspecific antigen - induced suppression. Adv. Imm - 18 - 1974.
- [64] *RABINOVITCH M.* - Phagocytic recognition. In : Mononuclear Phagocytes. Ed. by R. van Furth - Blackwell Scientific Publications - 1970.
- [65] *RÊGO S.F. de M.* - Estudo das lesões provocadas pelo "Trypanosoma cruzi", Chagas, 1909, no baço e no fígado do camundongo branco ("Mus musculus"), com diversos graus de resistência. J. Bras. Med. 1 - (5) : 559 - 674 - 1959.
- [66] *REPKA D.* - Contribuição ao estudo imunoquímico das formas de cultivo do Trypanosoma cruzi. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP - 1973.
- [67] *RICE S.G. and FISCHMAN* - Functional and morphological heterogeneity among rabbit peritoneal macrophages Cellular Immunology 11 - Numbers 1 - 3 - March 30 1974.

- [68] *ROMAÑA C.* - Contribuição ao conhecimento da patogenia da Trypanosomose Americana - Memórias do Inst. Oswaldo Cruz - Tomo 39 - Fascículo 3 - Dezembro 1943.
- [69] *ROWLEY D.* - Phagocytosis - Advances in Immunology , 2 - 1962.
- [70] *SABET L.H. ; FRIEDMAN H.* - Effect of RES "Blockade" on antibody formation.II - Citokinetics of the secondary haemolysin response and suppressed immunological memory in mice treated with carbon particles. Imm 17 - 1969.
- [71] *SABET T. ; NEWLIN C. ; FRIEDMAN H.* - Effect of RES "Blockade" on antibody formation. I - Suppressed cellular and humoral haemolysin responses in mice injected with carbon particles. Imm 16 - 4 - 1969.
- [72] *SALAMAN M.H.* - Immunosuppressive effects in infection Proc. R. Soc. Med. 63 - 1970.
- [73] *SALAMAN M.H. ; WEDDERBURN N.* - The immunodepressive effect of a murine Plasmodium and its interaction with murine oncogenic virus. J. Gen. Microbiol. 59 - 383 391 - 1969.
- [74] *SMITHERS S.R. ; TERRY R.J. and HOCKLEY D.J.* - Host antigens in schistosomiasis. Proc. Roy. Soc. B. 171 - 1969.
- [75] *SOULSBY E.J.L.* - Cell mediated immunity in Parasitic Infections - The Journal of Parasitology - 56 (4)-534 547 - 1970.
- [76] *SOULSBY E.J.L.* - The nature and origin of functional antigens in helminth infections. Ann. Acad. Sci. 113 : 492 - 509 - 1963.

- [77] *STIFFEL C.* - Étude de la fonction phagocytaire du SRE
Journal de Physiologie (Paris) 50 - 911 - 949 - 1958 a.
- [78] *STIFFEL C.* - Facteurs physiologiques qui influencent
l'activité phagocytaire du système réticulo-endothéli
al. J. Physiologie 50 - 1087 - 1016 - 1958 b.
- [79] *STIFFEL C. ; GUERCIO P. ; MOUTON D.* - Relation entre
la phagocytose des hématies de mouton ou de rat et le
taux des anticorps naturels ou immuns chez la souris.
Path & Biol. 16 - 1968.
- [80] *STIFFEL C. ; MOUTON D. ; BIOZZI G.* - Kinectis of the
phagocytic function of the reticulo-endothelial macro
phages in vivo. In : Mononuclear Phagocytes. Ed. by
Ralph van Furth - Blackwell Scientific Publications -
1970.
- [81] *TAGLIAFERRO W.H.* - Un examen retrospectivo de los as
pectos inmunologicos de las infecciones parasitarias.
Bol. Ofic. Sanit. Panamer. 66 - 1969.
- [82] *TAGLIAFERRO W.H. and PIZZI T.* - Connective tissue reac
tions in normal and immunized mice to a reticulo-
tropic strain of Trypanosoma Cruzi. J. Infect. Dis .
96 - nº 3 - 1955.
- [83] *THORBECKE G.J. ; BENACERRAF B.* - The reticulo-endothe
lial system and Immunological phenomena. Progr. Allergy
6 - 1962.
- [84] *TORRES M.* - Estudo do miocárdio na moléstia de Chagas
(forma aguda). I : Alterações da fibra muscular car
díaca. Mem. Inst. Oswaldo Cruz - 9 : 114 - 134 - 1917.
- [85] *UNANUE E.R.* - Role of macrophages in antigenic stimu
lation. Adv. Imm 15 - 1972.

- [86] *UNANUE E.R. ; CEROTTINI J.C.* - The function of macrophages in the immune response. Seminars in Hematology 7 - nº 2 - 1970.

- [87] *VIANNA G.* - Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Moléstia de Carlos Chagas". (Esquizotripanoze humana ou tiroidite parasitária) . Mem. Inst. Oswaldo Cruz - 3 : 276 - 293 - 1911.

- [88] *VICKERMAN K.* - Cyclical changes in surface structure in pathogenic Trypanosomes - Abstracts of Tropical Medicine and Malaria - pg. 304 - 308 - 1968.

- [89] *WEICHSELBAUM T.E.* - An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. Am. J. Clin. Path. 10 : 40 - 1946.

- [90] *WIENER E. and BANDIERI A.* - Differences in antigen handling by peritoneal macrophages from the Biozzi high and low responder lines of mice. European J. of Imm 4 - (7) - 1974.