

MONAMARIS MARQUES BORGES

Este exemplar corresponde à redação final do Tese
defendida pela aluna Monamaris Marques Borges,
e aprovada pela Comissão julgadora.

Campinas, 20 de dezembro de 1985-

Judith Kardos

ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE DE *Calomys callosus* (RODENTIA-CRICE
TIDAE) A HEMACIAS DE CARNEIRO E *Trypanosoma cruzi*.

Tese de Mestrado apresentada ao
Departamento de Microbiologia e
Imunologia do Instituto de Ciên
cias Biológicas da Universidade
Estadual de Campinas (UNICAMP),
São Paulo.

Orientador: Dra. JUDITH KARDOS KLOTZEL

1985

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

MONAMARIS MARQUES BORGES

Este exemplar corresponde à redação final de tese defendida pela aluna Monamaris Marques Borges, e aprovada pela comissão julgadora.

Campinas, 20 de dezembro de 1985-

Judith Kardos

ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE DE *Calomys callosus* (RODENTIA-CRICE
TIDAE) A HEMACIAS DE CARNEIRO E *Trypanosoma cruzi*.

Tese de Mestrado apresentada ao
Departamento de Microbiologia e
Imunologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade
Estadual de Campinas (UNICAMP),
São Paulo.

Orientador: Dra. JUDITH KARDOS KLOTZEL

1985

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus

país e manos.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos:

Ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO, o qual através do PIDE V, Proc. nº 40.3617/82 concedeu o suporte financeiro desta pesquisa.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO, a qual concedeu-me bolsa de estudos neste período.

Ao INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO, em nome do Prof. Dr. CARLOS DA SILVA LACAZ, o qual autorizou-me a utilizar o laboratório de Protozoologia, local onde foi desenvolvido todo o trabalho.

Ao INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, pela oportunidade de realizar este curso.

À Dra. TEREZA L. KIPNIS do Instituto de Ciência Biomédicas da USP, por alguns animais concedidos.

Ao Dr. PAULO ROBERTO CURI pelo auxílio e consulta na elaboração dos trabalhos estatísticos.

À Dra. DALVA MELLO S. BARBOSA por ter-me iniciado, estimulado e incentivado ao trabalho científico e pela grande amizade.

À Dra. JUDITH KARDOS KLOTZEL pela enorme boa vontade na orientação do planejamento e execução deste trabalho e acima de tudo pelo carinho e amizade a mim dispensados.

Ao Desenhista do Inst. de Med. Tropical ALMIR ROBSON FERREIRA pela enorme colaboração na confecção dos desenhos.

A todos os pesquisadores, técnicos e funcionários do Laboratório pelo convívio e auxílio prestado durante todo o trabalho.

As estagiárias CLÁUDIA BARLETTA e STELLA MARIA BRANQUINHO pela valiosa colaboração e amizade.

Aos professores desta Banca Examinadora pelas críticas e sugestões apresentadas.

À WILMA GARCIA DE S. LOURENÇO pelo trabalho de datilografia.

ÍNDICE

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - A importância da doença de Chagas e dos reser- vatórios	1
1.2 - Reservatórios: Sua importância na manutenção e sobrevivência do <i>T. cruzi</i>	4
1.3 - <i>Calomys</i> : Infecção natural, experimental e resis- tência	8
1.4 - Imunologia da Doença de Chagas	11
1.4.1 - Resistência natural	11
1.4.2 - Mecanismos imunes envolvidos na infec- ção	14
1.4.2.a - Imunidade humoral	16
1.4.2.b - Imunidade celular	23
1.5 - Modelos experimentais em Doença de Chagas	30
1.6 - Objetivo do Trabalho	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1 - Animais	36
2.2 - Tratamento com Ciclofosfamida (CI)	37
2.3 - Suspensão de hemácias de carneiro	37
2.4 - Anticorpos	37
2.5 - Titulação dos anticorpos	38
2.5.1 - Anticorpos anti-hemácias de carneiro...	38

2.5.2 - Anticorpos anti- <i>T. cruzi</i>	38
2.6 - Parasitas: Obtenção e contagem	39
2.7 - Infecção	40
2.8 - Obtenção do soro imune	40
2.9 - Grupos experimentais	40
2.9.1 - Efeito de diferentes doses de CI na res <u>posta</u> humoral para hemácias de carneiro (HC)	40
2.9.2 - Duração do efeito da Ciclofosfamida ...	41
2.9.3 - Ação de duas doses de CI sobre o siste <u>ma</u> imune	42
2.9.4 - Efeito de diferentes doses de CI 20,100 e 200 mg/kg na produção de anticorpos e controle da parasitemia	42
2.9.5 - Efeito de duas doses de 20 mg/kg CI na resposta imune humoral, controle da pa <u>ra</u> sitemia e mortalidade	43
2.9.6 - Efeito de duas doses de 200 mg/kg CI so <u>bre</u> a resposta imune humoral, controle da parasitemia e mortalidade	43
2.9.7 - Transferência Passiva de soro imune ...	43
3. RESULTADOS	45

ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL A HEMÁCIAS DE CARNEIRO

3.1 - Efeito de diferentes doses de Ciclofosfamida

(CI) na resposta imune humoral para hemácias de carneiro (HC)	45
3.2 - Efeito de duas doses de Ciclofosfamida sobre o sistema imune dos animais	46
3.3 - Duração do efeito da Ciclofosfamida	47
3.4 - Influência da resposta humoral alterada pela Ciclofosfamida, no controle da parasitemia e mortalidade dos animais inoculados com <i>T. cruzi</i>	49
3.4.1 - Efeito de diferentes doses de CI (20, 100 e 200 mg) na produção de anticorpos e controle da parasitemia	49
3.4.2 - Efeito de duas doses de 20 mg CI na resposta imune humoral, controle da parasitemia e mortalidade	51
3.4.3 - Efeito de duas doses de 200 mg CI sobre a resposta imune humoral, controle da parasitemia e mortalidade	52
3.5 - Transferência passiva de soro imune	55
4. DISCUSSÃO	75
5. RESUMO E CONCLUSÕES	84
6. BIBLIOGRAFIA	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 - A IMPORTÂNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS E DOS RESERVATÓRIOS.

A Doença de Chagas é uma parasitose exclusiva do continente americano, não tendo sido mencionado infecção humana, de animais domésticos ou silvestres em outros continentes Ásia, África e Oceania, apesar da presença de algumas espécies de triatomíneos.

O *Trypanosoma cruzi* seu agente etiológico constitui um dos mais graves problemas de saúde pública na América do Sul devido a sua ampla distribuição geográfica, alta mortalidade nas regiões endêmicas e grande dificuldade em se estabelecer um tratamento específico.

Dados da Organização Mundial da Saúde (WHO) (1977) mostram que 35 milhões de pessoas na América do Sul estão expostas à doença e destas pelo menos 12 milhões são infectadas. No Brasil acredita-se que 6 milhões de pessoas são acometidas pela Doença de Chagas, devido principalmente à grande precariedade de vida agravado pelos problemas de estruturas sócio econômicas e pela ignorância gerada pela falta de esclarecimento às populações

nas áreas endêmicas. Estes fatores fazem com que a Doença de Chagas esteja intimamente ligada ao subdesenvoluvimento.

Acredita-se que a Doença de Chagas era de início uma enzootia de animais silvestres mantida entre estes por triatomíneos também silvestres.

A infecção era mantida em ecossistemas com biótopos naturais constituídos por buracos na terra, rouchas, árvores ou ninhos em diversos locais que servem de abrigos para animais.

Nestes diferentes biótopos circulam pelo menos 8 ordens zoológicas de animais (Marsupialia, Edentada, Chiroptera, Carnívora, Lagomorfa, Rodentia, Primata e Artiodactyla) e mais de 50 espécies de triatomíneos (BARRETO, 1964 e PESSOA e MARTINS, 1977).

É nestes focos naturais onde se processa certamente o mais importante ciclo para a sobrevivência do *T. cruzi*.

Nesta zoonose a presença do *T. cruzi* independe da presença ou ausência humana, passando esta a ter influência quando se introduz no ambiente natural, provocando desequilíbrio dos focos silvestres e formando abrigo e fonte alimentar para os triatomíneos no ambiente doméstico.

O encontro de mamíferos silvestres naturalmente infectados tem sido mencionado em uma extensa área

que compreende desde os Estados Unidos até a Argentina.

Intensas investigações quanto ao papel desempenhado por estes reservatórios na epidemiologia da Doença de Chagas tem sido realizados (CHAGAS, 1918; ESPINOSA, 1955; DIAS VASQUES, 1960; BARRETO, 1964b; 1965, 1967; DEANE, 1964; MARINKELLE, 1966; ZELEDON et al., 1970; SILVA et al., 1975).

O encontro de flagelados idênticos ou muito semelhantes ao parasito humano tem acentuado a necessidade de investigações mais profundas sobre a influência dos reservatórios na manutenção do ciclo silvestre deste parasita.

BARRETO (1967) comenta que a estabilidade dos focos naturais representados por mamíferos e triatomíneos silvestres é condição essencial para que o *T. cruzi* sobreviva e permaneça neste ambiente. Esta estabilidade pode desaparecer naturalmente ou por interferência humana devido aos grandes desequilíbrios ecológicos, ou alterações provocadas por este, tais como: colonização e construção de estradas, derrubadas de matas para exploração agropecuária e agriculturas, construções de usinas, etc.

Todas estas atividades dão origem a situações que facilitam a aproximação de reservatórios e triatomíneos silvestres do ambiente humano, favorecendo ainda mais a domicialização da doença, permitindo o inter-

relacionamento do ciclo mantido na natureza e o domiciliar.

O mecanismo normal e natural de circulação do *T. cruzi* passa a ser modificado, e o quanto estas modificações interferem nas populações de parasitas ainda é questionável.

Alguns trabalhos em animais de laboratório tais como camundongos e ratos mostram que cepas de origem silvestre apresentam virulência menos acentuada em relação às cepas humanas. (LEME & COLLARES, 1962; NUSSENZWEIG et al., 1963; BARRETO et al., 1964; FERRIOLLI & BARRETO, 1965; KIPNIS et al., 1983).

O que está envolvido neste fenômeno é assunto pouco esclarecido.

Outro ponto a ser considerado são os mecanismos de equilíbrio estabelecidos entre o parasita e seus hospedeiros, principalmente a nível celular uma vez que esta interação é a responsável pela sobrevivência deste parasita e a causa de danos no hospedeiro vertebrado.

1.2 - RESERVATÓRIOS: SUA IMPORTÂNCIA NA MANUTENÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DO *Trypanosoma cruzi*.

Coube a CARLOS CHAGAS (1912) o reconhecimento da importância do estudo dos reservatórios silves

tres do *T. cruzi*, quando este encontrou o tatu *Dasy-
pus novencinctus* naturalmente parasitado.

Mais tarde em 1924, o mesmo autor reconheceu como *T. cruzi* o parasita encontrado no macaco *Saimiri
sciureus* por ABE-ATHAR em 1922 no Pará, local onde
não havia sido descrito nenhum caso de Doença de Chagas
até então.

A partir destas publicações acreditou-se
que a Doença de Chagas era exclusiva de animais silvestes
tres, tornando-se posteriormente uma zoonose.

O interesse nas pesquisas dos reservató-
rios passou a interessar a vários autores e como resul-
tado um grande número de animais tem sido descrito com
infecção natural.

DEANE (1964) e BARRETO (1965) discutem a
importância destes animais na sobrevivência do parasita
quando questionaram se todos os animais encontrados na
turalmente parasitados seriam reservatórios do *T. cruzi*
ou somente aqueles cujos parasitas são virulentos, sen-
do os demais morfologicamente semelhantes ao *T. cruzi*
("cruzi-like"). Quais deles seriam a maior fonte de in-
fecção humana, devido a seus hábitos, índice de infecção
e o seu relacionamento com triatomíneos e o homem?

Seriam as cepas de *T. cruzi* originárias de
animais silvestres e descritas às vezes como avirulentas
para animais de laboratório, virulentas para o homem?

Todas estas questões ainda não estão bem esclarecidas.

De modo geral se diz que os animais silvestres encontrados naturalmente parasitados não apresentam sintomas da doença, dando a impressão de que os tripanosomas não são patogênicos para o hospedeiro.

Há muito o que ser esclarecido quanto às relações parasita hospedeiro nos animais silvestres.

Estas relações são controvertidas; o que ocorre para que determinadas cepas de origem silvestre isoladas de gambá, morcegos e roedores não infectem bem várias espécies de animais de laboratório tais como camundongos, cobaias, cão, ou infectem apenas uma destas espécies, obtendo-se infecções leves e passageiras sendo possível a partir deste animal transferir a infecção para outros animais?

Estes dados foram encontrados por CLARK & DUNN (1932) e DIAS (1935) os quais isolaram cepas de gambá que inocularam em camundongos, ratos, cobaias e cães, sendo que o primeiro autor conseguiu infecção apenas em camundongos e a partir deste transferiu infecção para camundongos e cães e o segundo obteve infecção aparente em rato, e a partir deste infectou cobaia, camundongos e cães.

BARRETO et al. (1965) comentam que as cepas isoladas por eles, seja de gambá ou roedores, diferem

na capacidade de infectar ratos e camundongos. Algumas têm preferência por ratos, outros por camundongos enquanto outras infectam indiferentemente ratos e camundongos.

NUSSENZWEIG, DEANE & KLOETZEL (1962,1963a,b) compararam a constituição antigênica de diferentes cepas de *T. cruzi* isoladas de diferentes animais, com cepas humanas, encontrando antígenos comuns entre algumas delas. Qual seria o significado destes antígenos no contato com o hospedeiro?

Vários animais têm sido descritos como reservatórios do *T. cruzi*, entre eles grande número de roedores.

A primeira observação de um roedor naturalmente infectado foi feita por VILELA (citado por Chagas 1931) o qual encontrou uma cotia naturalmente parasitada.

Mas foi CLARK & DUNN (1932) que publicaram o primeiro caso de infecção natural de roedores descrevendo a infecção do *Sciurus granatensis morulus*.

Desde então cerca de 50 roedores das várias famílias tem sido encontrados infectados na América.

Os índices gerais de infecções encontrados são muito variáveis, dependendo da região. RIBEIRO (1971) registrou em São Paulo 12,3% para o total de roedores examinados, variando os índices específicos entre

12-18%, enquanto MELLO (1980a) obteve dados inferiores a 0,1%. PIFANO (1969 e 1973) na Venezuela encontrou índices mais altos de 15,8% a 40%, sendo que o *Oryzomys concolor* apresentou 100% de infecção.

Estes dados mostram que pelo menos em alguns locais os roedores silvestres contribuem para a manutenção do caráter enzoótico da Doença de Chagas.

1.3 - *Calomys*: INFECÇÃO NATURAL, EXPERIMENTAL E RESISTÊNCIA.

No Brasil aproximadamente 19 espécies de roedores silvestres foram encontrados naturalmente infectados pelo *T. cruzi* (BARRETO et al., 1979).

Destas espécies algumas pertencem à família cricetidae.

Entre os cricetídeos descritos naturalmente parasitados com maior frequência no Brasil citam-se os gêneros: *Akodon*, *Nectomys*, *Zigodontomys* e *Calomys* o qual é objeto de nossos estudos.

O gênero *Calomys* (Ex-*Hesperomys*) é autóctone da região sul-americana.

Este gênero é de porte semelhante ao camundongo e segundo HERSHKOVITZ (1969) compreende 4 espécies: *sorellus*, *lepidus*, *laucha* e *callosus*. Para este autor a quinta espécie descrita por MASSOIA & FORNES (1965)

como *musculinus* é sinônimo de *laucha* e as espécies *tener* e *expulsos* mencionadas por MOOGEN (1952) são sinônimos de *callosus*.

Na Argentina BASSO et al. (1977) e MORRETI et al. (1980) descreveram as espécies *musculinus* e *laucha* como reservatório do *T. cruzi* e no Brasil RIBEIRO (1973) e MELLO & TEIXEIRA (1977) descreveram a espécie *callosus*.

O *Calomys callosus* apresenta ampla distribuição geográfica, sendo mencionado o seu encontro na Argentina, Bolívia, Paraguai; no Brasil nas regiões centro-oeste, nordeste e sul (MOOGEN, 1952; MASSOIA & FORNES, 1965; HERSHKOVITZ, 1962; MELLO, 1969; MELLO e MOOGEN, 1979).

Em estudos populacionais sobre este roedor realizados por MASSOIA & FORNES (1965) na Argentina e por MELLO (1977a, 1980b) no cerrado do Brasil central, este animal mostrou-se abundante ao contrário dos dados encontrados no nordeste, onde apesar da ampla distribuição, este não representa a espécie de roedor mais abundante (KARIMI et al., 1976).

Do ponto de vista médico, este roedor foi reconhecido como reservatório do vírus da febre hemorrágica (MASSOIA & FORNES, 1965; JOHNSON et al., 1975), do *T. cruzi* (RIBEIRO, 1973 e MELLO & TEIXEIRA, 1977; MELLO 1981 e 1982), e *Yersinia pestis* (ALMEIDA, 1973).

Os aspectos biológicos do *C. callosus* foi assunto estudado por PETTER e col. (1967), JUSTINE & JOHNSON (1970) e MELLO (1977b, 1978), sendo todos estes autores unânimes em afirmar ser este roedor de fácil adaptação ao cativeiro com alta produtividade, reprodução durante todo o ano e de fácil manuseio.

A importância do *C. callosus* como modelo experimental foi reconhecida em 1969 por JUSTINE et al. e em 1975 por JOHNSON et al., quando estes autores usaram-no como modelo experimental na infecção pelo vírus machupo, sugerindo ser este um modelo para infecção crônica com vírus.

No Brasil BORDA (1972) usou-o como modelo experimental na infecção por *Schistosoma mansoni*, enquanto MELLO (1979/80) estudou sua susceptibilidade a *S. mansoni*, *Plasmodium berghei*, *Leishmania mexicana*, apresentando relativa resistência a alguns destes patógenos.

Trabalhos mais recentes têm sido realizados usando-o como modelo experimental para Doença de Chagas.

MELLO & TEIXEIRA (1977), MELLO, VALIN & TEIXEIRA (1979), BORGES & MELLO (1980) e MELLO & BORGES (1981) acompanharam sua infecção experimental por cepas silvestres de *T. cruzi* de diversas origens: gambá, roedores, triatomíneos observando que apesar dos níveis de parasitemia serem mais altos nos *C. callosus* comparados aos

camundongos, os tripanosomas mostraram-se mais virulentos para estes últimos. Ao contrário se a infecção for com cepa humana, estes animais mostram parasitemia e parasitismo tissular menor em relação aos camundongos.

BORGES et al. (1982) acompanharam a infecção destes animais por tripanosomas de origem humana (Y e Berenice) mostrando que existe uma aparente resistência, com baixa parasitemia, raros infiltrados inflamatórios no músculo esquelético e ausência de ninhos de amastigotas. Além disto, mostraram que a cepa Y, a qual em camundongos se comporta como reticulotrópica (BRENER, 1965; MELLO & BRENER, 1978), neste roedor era miotrópica em concordância com os dados mostrados em ratos por LEME & COLARES (1962) e SOGAYAR (1981).

Isto nos sugere que a agressividade do parasita é variável podendo estar relacionada com uma complexa interação de resposta humoral e celular dos hospedeiros no controle da infecção.

1.4 - IMUNOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS

1.4.1 - RESISTÊNCIA NATURAL

Aves, répteis e anfíbios são refratários ao *T. cruzi*. DIAS (1933), verificou que quando répteis e anfíbios são inoculados com

tripomastigotas sanguícolas, os parasitas desaparecem do local de inoculação, não sendo encontrados livres na circulação. Se estes animais eram sacrificados após 7 dias não era possível o encontro de amastigotas no tecido.

RÚBIO (1956) trabalhando com soro de sapo, rã e galinha, observou que a ação deste soro sobre os metacíclicos é de lise.

Inoculando aves decomplementadas observou-se que os parasitas permanecem 24 horas na circulação enquanto que nos animais normais após 1 minuto estes desaparecem. A bursectomia ou o tratamento com corticóide não foi capaz de modificar a susceptibilidade destes animais à infecção (KIERSZENBAUM et al. (1976). NERY GUIMARÃES (1972) e NERY-GUIMARÃES & LAGES (1972) mostraram que não havia sinais de infecção em aves provenientes de embriões infectados, sugerindo uma resistência nata para estes animais.

A resistência das aves parece estar relacionada com a capacidade de lise dos soros normais sobre os tripomastigotas como observado por NERY-GUIMARÃES (1972).

KIERSZENBAUM et al. (1976) mostraram que a lise com soros de aves "in vitro" é resultado da ativação de C3 e não envolve C1, 2, 4, anticorpo ou íons Ca^{+} , mas depende de íons Mg^{+} , evidenciando ser a ativação da via

alternativa do complemento a responsável pela lise dos tripomastigotas no soro de aves.

Há grande evidência de que em mamíferos a resistência natural contra a infecção por *T. cruzi* é variável entre espécies e indivíduos de uma mesma espécie.

A ação lítica de soros normais tais como humano, cobaia, carneiro, rato e hamster sobre formas epimastigotas e não sobre tripomastigotas e amastigotas tem sido descrita (MUNIZ & BURRIELLO, 1945; RUBIO, 1956), o mesmo não ocorre se é usado soro de camundongo. Trabalhos mais recentes mostraram ser esta lise devida à capacidade dos epimastigotas ativarem diretamente a via alternativa do complemento (NOGUEIRA et al., 1975). Nos pequenos vertebrados (sapo, rã e outros répteis) há sugestões de que o mecanismo de defesa mais eficientes é a fagocitose pelos macrófagos (DIAS, 1933 e RUBIO, 1956).

Ratos são descritos como resistentes à infecção por *T. cruzi*, desenvolvendo infecções menos graves quando comparado a camundongos inoculados com a mesma cepa (PIZZI, 1953). Esta resistência não parece envolver o haplótipo H-2, uma vez que ratos F 344 e Lew com haplótipos próximos diferem na suscetibilidade, sendo o F 334 considerado sem resistência com alta parasitemia e mortalidade em relação ao Lew. (RIVERA - VANDER PAS et al., 1983)

Existem também entre os camundongos diferenças individuais e de linhagens quanto a esta infecção havendo toda uma gama, desde os resistentes, B10, Balb/c, CBA/B10.BR, DBA/1, SJL, Ab/H, até os suscetíveis, A, A.BY, C3H.SW, DBA/2, AKR, C3H, Ab/L, DBA/2 (revisão KRCO & DAVID, 1981).

1.4.2 - MECANISMOS IMUNES ENVOLVIDOS NA INFECÇÃO

O *T. cruzi* é altamente imunogênico tanto para o homem como para vários animais.

Embora a maneira como o hospedeiro controla a infecção não esteja esclarecida, vários autores acreditam que estes mecanismos sejam resultados da resposta imune suscitada pelo parasita. (KIERSZENBAUM & HOWARD, 1976; KRETTLI et al., 1976; HANSON, 1977; CORSINI et al., 1980, 1981a,b)

A resposta imune adquirida parece ser importante na resistência ao *T. cruzi*, uma vez que o tratamento dos animais com imunossupressores (SENECA & ROCKENBACK, 1952; KUMAR et al., 1970; BRENER et al., 1971), irradiação, esplenectomia (TRISCHMANN et al., 1978) ou a depleção dos linfócitos T (BURGESS & HANSON, 1980), modificam a resposta do hospedeiro interferindo na parasi

temia e mortalidade.

Vários animais de laboratório tais como macaco, cão, gato, coelho, cobaia, rato e camundongo se infectam experimentalmente com *T. cruzi*; esta capacidade de infecção difere entre eles.

Dentre os fatores responsáveis por esta diversidade de resposta podemos citar as características próprias do parasita determinando graus de agressividades variáveis em função da capacidade de resposta do hospedeiro, e fatores inerentes ao próprio hospedeiro.

Os animais jovens têm demonstrado menor resistência que os adultos. A constituição genética do hospedeiro que influencia o curso da infecção experimental foi correlacionado em certos casos com a maior ou menor capacidade de desenvolver anticorpos específicos. (PIZZI et al., 1954; KIERSZENBAUM & HOWARD, 1976; CORSI NI, 1980, 1980b)

Camundongos CFI foi um dos modelos experimentais explorados no estudo sobre infectividade, virulência, influência da dose e via de inoculação, como demonstram MARSDEN (1967a, 1967b, 1969) e ROSEMBERG et al. (1969).

Ratos, cobaias, coelhos e cão também tem mostrado diferenças quanto à resistência para infecções por *T. cruzi*, como demonstra LEME & COLARES (1962), SO GAYAR (1981), MAYER et al. (1954), TEIXEIRA et al. (1974,

1975 e 1983), ANDRADE & ANDRADE (1980).

TRISCHMANN et al.(1978), estudando as bases genéticas desta resistência em camundongos observaram que esta não está ligada ao complexo de histocompatibilidade principal (H - 2); o mesmo foi descrito por WRIGHTSMAN et al.(1982) onde estes autores também inferem que o locus H - 2 não tem efeito sobre o nível de parasitemia sendo esta regulada por vários genes. Estes genes provavelmente interferem na sobrevivência dos animais.

Os mecanismos que regulam a infecção por *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado envolvem fenômenos biológicos que resultam da interação de mecanismos de imunidade humoral e celular.

1.4.2.A - IMUNIDADE HUMORAL

Um fator importante na defesa do hospedeiro é o anticorpo.

O animal infectado desenvolve anticorpos contra o *T. cruzi* que nas primeiras semanas (fase agu-da) foi identificado como IgM, apresentando nesta fase sua maior concentração. Seu aumento ocorre paralelamente com o aumento da parasitemia declinando na fase crô-nica. Os níveis de IgG são mais altos na fase crônica mas podem também ser detectados nas primeiras semanas,

permanecendo estáveis durante toda a fase crônica (VANTTUONE et al., 1973; CAMARGO & AMATO NETO, 1974; CERISOLA, 1977; HANSON, 1977; CANÇADO et al., 1979).

TEIXEIRA & SANTOS-BUCH (1974), descreveram também na fase crônica um ligeiro aumento de IgA.

Por ser um agente altamente imunogênico, o *T. cruzi* estimula os linfócitos B imunocompetentes a produzir altos níveis de anticorpos que têm propriedades de precipitação e aglutinação frente a epimastigota e tripomastigotas e que podem ser evidenciados por reações de imunofluorescência.

O papel destes anticorpos na resistência à infecção pelo *T. cruzi*, não está bem esclarecido, havendo indícios de que ele participe na limitação da infecção aguda.

A participação dos anticorpos na proteção da doença de Chagas foi evidenciada quando após pré-incubação de tripanosomas com soro imune antes da infecção, estes produziram parasitemias e mortalidade menores do que as obtidas por parasitas normais (PIZZI et al., 1954; KRETTLI & BRENER, 1976; SANCHEZ & GONZALES-KAPPA, 1983).

KRETTLI & BRENER (1976) observaram que existe diferença em relação às cepas Y e CL quando incubadas com soros imunes. Os soros imunes anti-cepas Y e

anti-cepa CL aglutinam tripomastigotas Y mas não os das cepas CL.

Os parasitas da cepa CL parecem ter mecanismos de evasão dos anticorpos ainda não completamente elucidados.

KLOETZEL et al. (1977), demonstraram a presença de imunoglobulinas na superfície de formas tripomastigotas e a ocorrência de "Capping" por parasita da cepa F.

Após uma infecção não ocorre reagudização espontânea com novos aumentos dos níveis de parasitas. Reinoculações do hospedeiro na fase crônica geralmente não promovem novos surtos de parasitemia.

O controle da infecção envolve provavelmente a interação de mecanismos humorais e celulares uma vez que a interferência com estes mecanismos por drogas ou irradiação é capaz de permitir uma exacerbação da infecção de indivíduos já infectados (KRETTLI & LIMA PEREIRA, 1981).

A participação dos anticorpos na imunidade adquirida tem mostrado ser de grande importância. A transferência passiva de soro de animais na fase crônica para os normais antes da infecção tem mostrado conferir significativa proteção.

CULBERTSON & KOLODNY (1938), trabalhando com ratos e KAGAN & NORMAN (1961, 1962), KRETTLI et al.

(1976) e McHARDY (1977) usando camundongos obtiveram proteção significativa dos animais tratados previamente com soro imune antes da infecção.

A transferência passiva da imunidade humoral varia conforme a cepa do parasita utilizada para inocular os animais. KRETTLI et al. (1976) conseguiram proteção em animais que receberam soro imune homólogo ou heterólogo anti cepas Y e CL, quando inocularam parasitas da cepa Y, porém esta proteção não ocorreu contra os parasitas da cepa CL.

O mesmo foi descrito em camundongos, por McHARDY (1977) que observou proteção contra cepa Y, porém apenas discreta proteção contra cepa Tulahuén, quando da transferência passiva de soro imune.

Mas existem algumas controvérsias na literatura, alguns autores não obtiveram o mesmo sucesso, mesmo usando diferentes esquemas de imunização e antígenos, além de soros imunes de diferentes espécies de animais (cobaias, camundongos e ratos). PIZZI (1961), HAUSCHKA et al. (1950), VOLLER & SHAW (1965), KRETTLI (1979), explicam estes insucessos provavelmente devido a variações de acordo com a cepa do parasita, além da classe e concentração de anticorpos presentes no soro imune. Segundo esta última autora os resultados insatisfatórios com a cepa CL são devidos à capacidade de evasão da resposta imune destes parasitas.

Mais um dado que contribui para a afirmação de que a resposta humoral é importante no controle desta infecção foi o obtido por KIERSZENBAUM & HOWARD (1976) os quais trabalharam com camundongos Biozzi, seleção I. Há duas linhagens destes camundongos, uma com alta capacidade de produzir anticorpos (H/Se) e outra com baixa capacidade (L/Se). Quando estes animais foram infectados com *T. cruzi* os bons produtores de anticorpos mostraram-se mais resistentes, com parasitemia e mortalidade reduzidas em relação aos maus produtores de anticorpos.

Por outro lado o soro imune dos bons produtores de anticorpos foi capaz de tornar mais resistentes os maus produtores de anticorpos.

HANSON (1977), mostrou que a queda do nível de parasitas coincide com o aumento de IgG e que o soro da fase aguda é incapaz de conferir proteção à infecção por *T. cruzi*. Quanto ao estudo das classes de imunoglobulinas envolvidas nesta proteção CASTELO BRANCO (1978) e TAKEHARA et al. (1981), demonstraram no camundongo ser mediada pela IgG, sendo que a última autora descreveu a subclasse IgG 2b como de importância fundamental.

KRETTLI & BRENER (1982) e STEFANI et al. (1983) sugerem que os anticorpos responsáveis pela proteção são os anticorpos responsáveis pela lise mediada

por complemento.

A importância da imunidade humoral foi enfatizada por TRISCHMANN & BLOOM (1980) e SCOTT (1981) através da transferência de células de baço de animais imunes para os normais antes da infecção, obtendo uma relativa proteção. A depleção dos linfócitos B desta população de células transferidas, reduziu a capacidade protetora destas.

RODRIGUES et al. (1981) mostraram também que ratos tratados com repetidas injeções de soro anti-u aumentam a suscetibilidade à infecção.

O exato mecanismo pelo qual os anticoros exercem sua ação protetora não está claro.

Tem sido sugerido que os anticorpos podem mediar a ativação do sistema complemento pela via alternativa ou clássica (BUDZKO et al., 1975; KRETTLI et al., 1977; KRETTLI et al., 1979), através da opsonização, resultando em lise.

A importância da lise dependente de anticorpo é mediada pelo complemento é contraditória.

BUDZKO et al. (1975), observaram que a depleção de C3 pelo veneno de cobra causou exacerbação da infecção em camundongos, com aumento de parasitemia e mortalidade, sugerindo que o C3 pode ser importante no controle da infecção na fase aguda.

Ao contrário KRETTLI et al. (1979), trabau

lhando com camundongo deficiente de C5 e DALMASSO & JARVINE (1980), usando cobaia deficiente em C4 não notaram diferenças na suscetibilidade destes animais à infecção por *T. cruzi*.

Atualmente há dados mostrando que os anticorpos podem participar na defesa do hospedeiro através da citotoxicidade mediada por célula dependente de antígeno (ADCC) pela destruição dos tripomastigotas "*in vitro*" (OKABE et al., 1980), o que poderia ocorrer "*in vivo*".

Além disso há sugestões de que os anticorpos responsáveis pela ADCC são os mesmos que promovem a lise mediada pelo complemento (MARTINS et al., 1982). Monócitos fagocitam e lisam os parasitas recobertos com anticorpos anti-*T. cruzi* (MADEIRA et al., 1979; OKABE et al., 1980). A interiorização pode ser feita via receptor para Fc presentes nestas células (NOGUEIRA et al., 1980).

Segundo NOGUEIRA (1982) a opsonização dos tripomastigotas com IgG de soro chagásico não altera a evolução dos parasitas em macrófagos, apenas aumenta sua capacidade de fagocitá-los.

A destruição de amastigotas intracelulares de *T. cruzi* é intensificada na presença de anticorpos anti-*T. cruzi*, desde que o macrófago tenha sido ativado por linfocina.

As evidências descritas acima mostram que

a imunidade humoral participa da resistência à infecção por *T. cruzi* e esta participação depende de peculiaridades dos parasitas em circulação, variando com as cepas.

Os mecanismos com os quais os parasitas conseguem sobreviver num organismo imune são vários.

Se existe variação antigênica como no caso do *T. brucei* não foi demonstrado.

A possibilidade de incorporação de proteínas do hospedeiro na superfície dos tripomastigotas tornando-os elementos "próprio" foi sugerido por ANDRADE (1978).

Outro mecanismo de escape que pode atuar *in vivo* é o "capping" pelo parasita.

A própria localização intracelular do parasita, e no caso do macrófago, o seu escape do vacúolo fagocítico para o citoplasma NOGUEIRA & COHN (1976), MILDER & KLOETZEL (1980) também constituem mecanismos de escape.

1.4.2.B - IMUNIDADE CELULAR

O elemento primário na resposta celular é o linfócito T que se torna imunocompetente durante a infecção.

TALIAFERRO & PIZZI (1955) foram alguns dos primeiros pesquisadores a sugerirem que células do sis-

tema fagocitário ou linfóides são importantes na resistência do hospedeiro ao *T. cruzi*.

Atualmente sabemos que as células T são responsáveis pela imunidade celular e os mecanismos pelos quais elas atuam são tidos como de ação direta sobre o parasita e célula hospedeiro através da citotoxicidade, além de secreção e liberação de produtos que atuam diretamente sobre o parasita e células hospedeira. As células T secretam produtos que ativam monócitos e macrófagos a fagocitarem e destruir os parasitas intracelulares.

Evidências da participação da resposta celular na resistência adquirida pelo hospedeiro tem sido observada tanto no homem como em modelos experimentais infectados com *T. cruzi*. Estes dados foram confirmados por várias reações *in vitro*.

A resposta celular além de participar dos mecanismos de resistência do organismo, podem também lesá-lo (TEIXEIRA & SANTOS-BUCH, 1974; BRAY, 1977).

Evidências da participação da resposta celular *in vivo* são as reações inflamatórias encontradas na porta de entrada do parasita no organismo hospedeiro (TORRES, 1930; ROMANA, 1944; TEIXEIRA et al., 1975) e as reações de hipersensibilidade do tipo tardio mediada por células demonstrada tanto no homem (MAYER & PIFANO, 1941; AMATO NETO et al., 1964; TEIXEIRA & SANTOS-BUCH,

1975) como em animais (GONZALES-CAPPA et al., 1968; SEAH et al., 1974; TEIXEIRA & SANTOS-BUCH, 1975). Estes últimos autores mostraram que os animais (cobaia, macaco, coelho) apresentavam reações de hipersensibilidade tardia e no caso dos coelhos esta atividade estava correlacionada com os testes *in vitro* e foram transferidas para recipientes normais por células linfóides imunes.

ROWLAND & KUHN (1978) não conseguiram demonstrar em camundongos imunidade mediada por células através de reação de hipersensibilidade ou transformação blástica de linfócitos *in vitro*.

Indicação da presença de imunidade celular na infecção chagásica foi demonstrado *in vitro* através da inibição da migração de macrófagos ou linfócitos sensibilizados e pela transformação blástica na presença de antígeno específico.

SEAH (1970) observou a inibição de migração de macrófagos quando célula do exudato peritonial de camundongos imunes foram incubados com antígenos de parasita.

YANOVSKY & ALBADO (1972) e LELCHUK et al. (1974) observaram que há inibição da migração de leucócitos de pacientes chagásicos na presença de antígeno de *T. cruzi*.

O mesmo foi descrito por TEIXEIRA & SANTOS-BUCH

(1975) com leucócitos de coelhos chagásicos crônicos.

Ao contrário REIS et al. (1976) e RIBEIRO DOS SANTOS & HUDSON (1980), conseguiram reações positivas com leucócitos de camundongos crônicos.

Outra demonstração de imunidade celular *in vitro* foi descrita por TSCHUDI et al. (1972) que obtiveram a transformação blástica com linfócitos de pacientes chagásicos crônicos em presença de antígeno específico. O mesmo fenômeno foi descrito por TEIXEIRA & SANTOS-BUCH (1975) sobre o estímulo de tripomastigotas de tecido.

A participação das células T na resistência do *T. cruzi* tem sido acentuada pelos trabalhos em camundongos deficientes de célula T, congenicamente ou experimentalmente sendo que estes animais apresentam maior suscetibilidade a infecção (ROBERSON et al., 1973; TRISCHMANN et al., 1978; KIERSZENBAUM & PIENKOWSKI, 1979; BURGESS & HANSON, 1980).

A participação da imunidade celular permanece questionável uma vez que estes dados não discriminam se a célula T tem papel citotóxico ou auxiliam a célula B na produção de anticorpo. A timectomia neonatal tem apenas retardado o aparecimento dos anticorpos anti *T. cruzi*, havendo aumento de parasitemia e mortalidade, o mesmo acontecendo com o tratamento com soro anti-timócito (ROBERSON et al., 1973; HANSON, 1977).

A transferência de linfócitos sensibilizados para animais normais é outro dado que demonstra a participação das células T na resistência à infecção por *T. cruzi*.

Esta observação foi feita por ROBERSON & HANSON (1974) e SANTOS (1973) que transferiram passivamente células do baço de ratos imunes para animais normais antes da infecção, conferindo-lhes razoável proteção.

O mesmo foi descrito por KUHN & DURUM (1975) em trabalhos com camundongos, obtendo um aumento sensível da sobrevida, quando transferiram células do baço de animais na fase aguda da infecção. Também em coelhos a transferência de células mononucleares de animais de fase crônica para animais normais antes da infecção conferiu proteção aos mesmos (TEIXEIRA & SANTOS-BUCH, 1975).

A presença de infiltrados celulares nas reações inflamatórias de tecidos parasitados por *T. cruzi* sugerem a manifestação de resposta celular.

Em termos de atividade citotóxica direta tem sido observado atividade citotóxica contra célula dos hospedeiros parasitados ou células cobertas com antígenos de *T. cruzi* (KUHN et al., 1977; RIBEIRO DOS SANTOS et al., 1980a).

A importância da célula T como célula efee

tora no mecanismo de resistência do hospedeiro tem sido bastante questionada.

SANTOS-BUCH & TEIXEIRA (1974), RIBEIRO DOS SANTOS et al. (1980b) além de outros, mostram que células T de coelho infectado e de paciente chagásico têm ação citotóxica sobre células normais do coração, ação provavelmente devido à presença de antígenos comuns entre o parasita e as células cardíacas.

RIBEIRO DOS SANTOS et al. (1979) também descreveram que soro de chagásico crônico reconhece neurônios.

Anticorpos monoclonais obtidos contra membrana de gânglios nervosos (WOOD et al., 1982) reagem com determinantes antigênicos de *T. cruzi*.

RIBEIRO DOS SANTOS & HUDSON (1980a) descreveram também a presença de linfócitos T citotóxicos contra células cardíacas.

O significado destas reações cruzadas entre antígenos do parasita e células normais do hospedeiro pode ser devido à existência de epítomos comuns. Porém, podem existir populações de células T que reconhecem antígenos do próprio hospedeiro. Isto se daria, através do ataque das células, recobertas por antígeno do parasita. A destruição destas implicaria na alteração de sua constituição, permitindo a formação de um clone de células T, com a capacidade de "autoimunida

de" (RIBEIRO DOS SANTOS, 1977).

Além dos linfócitos T, os macrófagos são células efectoras importantes na imunidade celular.

O mecanismo de ação dos macrófagos no controle da infecção por *T. cruzi*, tanto se dá processando os antígenos e cooperando com linfócitos como atuando diretamente como célula efetora.

Existem dados que mostram a importância da cooperação de macrófagos e linfócitos T imunes através da participação de linfocinas (NOGUEIRA et al., 1978) onde macrófagos normais na presença de linfocinas (produzidas através do cultivo de célula do baço de camundongos imunes sensibilizados com antígenos de *T. cruzi*) adquirem atividade tripanocida, atividade esta associada com a capacidade de produzir peróxido de hidrogênio (NATHAN et al., 1979).

A participação direta desta célula é vista quando macrófagos de camundongo são destruídos através da injeção de sílica, observando-se um aumento da suscetibilidade dos animais (KIERSZENBAUM et al., 1974; TRISCHMAN et al., 1978).

A participação de anticorpo não parece interferir no processo de fagocitose por macrófagos normais pois o uso de tripanosoma de camundongos irradiados e o bloqueio de receptores Fc dos macrófagos com IgG antimacrófago não impediu a fagocitose (NOGUEIRA & COHN,

1976; ALCANTARA & BRENER, 1978).

A presença de anticorpo apenas facilita a ingestão dos parasitas por macrófagos normais. Ao contrário com macrófagos ativados a opsonização facilita a destruição dos parasitas (NOGUEIRA et al., 1980).

A maior ou menor capacidade de reconhecimento dos parasitas pelos macrófagos normais tem sido descrita como função da cepa utilizada (ALCANTARA & BRENER, 1978; KIPNIS et al., 1979).

Um dos mecanismos que permitiu a sobrevivência do *T. cruzi* é o fato deste após ser fagocitado conseguir escapar dos fagossomas e multiplicar-se no citoplasma dos macrófagos (NOGUEIRA & COHN, 1976; MILDER et al., 1977; MILDER & KLOETZEL, 1980).

Macrófagos ativados especificamente ou não, mostram-se mais capazes de impedir o desenvolvimento do *T. cruzi* em relação a macrófagos normais (HOFF, 1975; NOGUEIRA et al., 1977).

1.5 - MODELOS EXPERIMENTAIS EM DOENÇA DE CHAGAS

Vários animais de laboratório são usados como modelo experimental em Doença de Chagas, na tentativa de esclarecer os mecanismos imunes envolvidos no controle desta infecção.

Estes animais diferem na sua resistência uma vez que apresentam variações na suscetibilidade às diferentes cepas de *T. cruzi* utilizadas.

Os animais usados mais frequentemente são os camundongos e cães descritos como mais sensíveis, ao contrário dos coelhos, ratos e cobaias que se mostram mais resistentes.

Dentre estes animais o modelo murino tem sido um dos mais explorados quanto aos mecanismos imunes envolvidos no controle da fase aguda. Conforme já mencionamos anteriormente, a participação da imunidade humoral através da transferência passiva de soro imune ou de células do baço de animal imune para animais normais (KRETTLI et al., 1976; McHARDY, 1980; TRISCHMANN & BLOOM, 1980; TAKEHARA et al., 1981), e o envolvimento dos mecanismos de cooperação celular através da manipulação do sistema imune com drogas imunossupressoras ou irradiação além do uso de linhagens isogênicas (BRENER & CHIARI, 1971; HANSON, 1977) e o envolvimento genético através da participação do haplótipo H - 2 são explorados neste modelo (TRISCHMAN et al., 1978; WRIGHTSMAN et al., 1982).

Os animais crônicos desta espécie são raramente apresentam lesões semelhantes às humanas.

Como modelo crônico, os cães segundo alguns autores (PELEGRINO, 1946; ANSELMINI et al., 1966;

ANDRADE & ANDRADE, 1980), mostram cardiopatias muito semelhantes à humana quando sobrevivem à infecção. Os cães jovens são considerados mais suscetíveis à infecção em relação aos adultos (VILELA, 1924; MARSDEN & HAGSTROM, 1968).

Os ratos, coelhos, cobaias e macacos sobrevivem à fase aguda da infecção, mostrando parasitemias discretas e prolongadas além de mortalidade tardia, quando então não se encontram mais parasitas circulantes e as alterações de tecidos já se mostram discretas (BRUMPT, 1913; CULBERTSON et al., 1938; MARSDEN et al., 1970; FRANCO, 1972; SANTOS-BUCH & TEIXEIRA, 1974; TEIXEIRA et al., 1975).

Em todos estes animais principalmente ratos e coelhos o envolvimento dos mecanismos humorais e celulares são também explorados.

Os coelhos foram sugeridos como um bom modelo para o estudo da patogenia da Doença de Chagas (TEIXEIRA et al., 1975).

Os fatores que modulam a relação parasita hospedeiro são apenas parcialmente conhecidos.

A cepa do parasita é sem dúvida um dos principais fatores que determinam o decurso da infecção, além da natureza do hospedeiro.

Não devemos no entanto esquecer que existe na natureza uma grande variedade de outros animais

que são reservatórios do parasita, com mecanismos imunológicos aparentemente mais eficiente devido ao prolongado contato com o parasita e que são pouco estudados como modelo experimental, podendo trazer contribuições para o conhecimento desta infecção e do seu ciclo natural nos ecotópos silvestres.

Os gambás são reservatórios do *T. cruzi* (DEANE, 1957; DEANE, 1958) e tem sido introduzido como modelo experimental, tendo ligeira infecção com baixa parasitemia, além disto os flagelados isolados destes animais apresentam baixa virulência (DEANE et al., 1983).

Um dado interessante mostrado por DEANE et al. (1984) foi o encontro do ciclo extracelular do *T. cruzi* em glândulas anais deste animal criado em laboratório e infectado experimentalmente.

Além deste reservatório os roedores silvestres também têm sido introduzidos como modelo experimental deste protozoário.

O *C. callus* é um destes animais, que está sendo criado em cativeiro e tem mostrado aparente resistência às infecções por cepas humanas e silvestres em infecções experimentais (MELLO et al., 1979; BORGES et al., 1980), como comentado anteriormente.

1.6 - OBJETIVO DO TRABALHO

Os reservatórios de *T. cruzi* são pouco explorados como modelo experimental.

O *C. callosus* representa um destes reservatórios.

Os trabalhos experimentais anteriores sobre Doença de Chagas mostram que o animal possui uma aparente resistência à infecção por cepas humanas e silvestres deste protozoários quando comparado aos camundongos Swiss.

Este estudo foi elaborado com a finalidade de tentar esclarecer se mecanismos imunológicos estão envolvidos na relativa resistência à infecção do *Calomys*.

De início como nada se conhece sobre o sistema imune deste animal e sabendo através da literatura sobre outros modelos experimentais, que a ciclofosfamida é capaz de atuar sobre populações de célula T e B, dependendo do esquema de dose utilizada, resolvemos:

1. Fazer um estudo sobre a ação e modulação de diferentes doses de ciclofosfamida sobre o sistema imune humoral deste animal, ação esta medida pela capacidade de produzir anticorpos contra hemácias de carneiro, para estabelecer um esquema de tratamento capaz de nos dar um modelo imunológico com resposta humoral facilitada e com imunossupressão.

2. Estudar os fenômenos imunes humorais envolvidos no controle da infecção por *T. cruzi* usando como dado básico o mesmo esquema de tratamento com ciclofosfamida utilizado para resposta contra hemácias de carneiro.

A participação destes fenômenos imunes humorais será avaliada através da contagem do número de parasitas circulantes, estudo da cinética de anticorpos e mortalidade dos animais inoculados com *T. cruzi* e tratados ou não com diferentes doses de ciclofosfamida.

3. Verificar a ação protetora dos soros hiperimunes específicos, contra inóculo do parasita em animais imunossuprimidos.

4. Comparar a ação de imunossupressão sobre a cepa Y (de origem humana) e as cepas M226 e Costalimai (de origem silvestre).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - ANIMAIS

1 - *C. callosus*

Foram utilizados animais de uma colônia mantida no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Esta colônia foi iniciada com alguns animais provenientes de uma linhagem estabelecida a partir de animais silvestres capturados pela Dra. M.D. MELLO próximo a Brasília e denominada de Canabrava.

Os animais de ambos sexos, com idade entre 30-40 dias e peso variando entre 18 e 24 g.

2 - CAMUNDONGOS

Usamos camundongos Biozzi (seleção I) bons (H/Se) e maus (L/Se) respondedores de anticorpos para hemácias de carneiro mantidos no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - F.M.U.S.P.

O peso dos animais de ambos os sexos, que serviram como controle nas experiências com hemácias de carneiro, estava entre 25 - 40 g e a idade entre 3 a 6 meses.

2.2 - TRATAMENTO COM CICLOFOSFAMIDA (CI)

Ciclofosfamida CI (Enduxan-Pravaz) foi dissolvida no momento do uso em água bidestilada estéril e inoculada via intraperitoneal (i.p.) nos *C. callosus* nas concentrações de 20, 100, 200 ou 400 mg/kg de peso, no dia -1 ou +5 após o estímulo antigênico conforme protocolo dependendo da experiência (TURK et al., 1982; LOC et al., 1981; DUTHU et al., 1980).

2.3 - SUSPENSÃO DE HEMÁCIAS DE CARNEIRO

A suspensão de hemácias de carneiro (HC) mantida em solução Alsever foi lavada em tampão fosfato 0,15 M pH 7,2 e a concentração ajustada por contagem em câmara de Neubauer para 25×10^8 /ml sendo inoculado i.p. 5×10^8 /animal nos dias 0, +5 ou +10 dependendo da experiência.

2.4 - ANTICORPOS

O sangue foi colhido individualmente com pipeta Pasteur pelo plexo retro-orbital nos dias 0, 5, 9, 14, 20, 27 e 37 dias após o estímulo específico. Deixado à temperatura ambiente para coagular sendo os soros anti-hemácias ou anti-*T. cruzi* congelados a -70°C até o momento de uso.

2.5 - TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS

Os anticorpos anti-hemácias de carneiro ou anti-*T. cruzi* foram determinados pela aglutinação direta com antígeno específico.

2.5.1 - ANTICORPOS ANTI-HEMÁCIAS DE CARNEIRO

A titulação procedeu-se em microplacas sendo colocado 25 µl de soro diluído seriadamente em tampão fosfato 0,1% de gelatina e o mesmo volume de hemácias de carneiro diluídas em tampão fosfato 0,1% de gelatina, na concentração de 10^8 hemácias/ml, contagem procedida em câmara de Neubauer.

As placas foram deixadas por 2 horas à temperatura ambiente quando então procedeu-se à leitura.

2.5.2 - ANTICORPOS ANTI-*T. cruzi*

Para titular estes anticorpos foram usados como antígeno tripomastigotas sanguícolas da cepa Y, colhidos no 7º dia da infecção de camundongos imunossuprimidos com 200 mg de CI/Kg.

O sangue infectado foi colhido através de punção cardíaca e transferido para frasco com pérolas de vidro para desfibrinar.

Em seguida foi centrifugado 1 minuto a 2000 x g e deixado 15 minutos em banho-maria 37°C para separação dos parasitas colhidos no plasma.

A concentração dos parasitas foi ajustada para 4×10^6 tripomastigotas/ml em câmara de Neubauer.

A reação foi feita em lâmina usando 20 μ l de soro diluído em salina com o mesmo volume de tripomastigotas na concentração acima referida.

As lâminas foram deixadas em câmara úmida por 40 minutos e a leitura feita em microscópio óptico.

Considerou-se como positiva a maior diluição onde se formavam grumos com no mínimo 3 parasitas.

2.6 - PARASITAS : OBTENÇÃO E CONTAGEM

Três cepas de parasitas foram utilizadas. A cepa Y de origem humana (SILVA e NUSSENZWEIG, 1953) M 226 de *C. callosus* (MELLO et al., 1979) e Costalimai de triatomíneo silvestre (MELLO & BORGES, 1981).

Os parasitas foram mantidos por passagens seriadas em *C. callosus* imunossuprimidos com CI 200 mg/kg.

O sangue obtido por punção cardíaca em citrato 3,8% e a contagem procedida pelo método de BRENER (1962).

O número de parasitas ajustados para 2×10^4 /ml.

2.7 - INFECÇÃO

O *C. callosus* tratados ou não com CI foram inoculados via intraperitoneal (i.p.) com 4×10^3 parasitas obtida como descrito no item 2.6.

A parasitemia foi acompanhada por 30 dias para as cepas Y e 60 dias para as cepas silvestres.

O número de parasitas circulantes foi determinado pelo exame de sangue colhido da cauda dos animais 3 vezes por semana e o número determinado de acordo com BRENER (1962).

2.8 - OBTENÇÃO DO SORO IMUNE

O soro imune para transferência passiva foi obtido de *C. callosus* inoculados com 10^5 parasitas/animal da cepa Y, recebendo reinóculo com a mesma dose após 30 dias e sangrados 7 dias após a segunda dose, sendo então estocados a -70°C até o momento de uso.

2.9 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

2.9.1 - EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE CI NA RESPOSTA HUMORAL PARA HEMÁCIAS DE CARNEIRO (HC)

Grupos de *C. callosus* receberam diferentes

doses desta droga (20, 100, 200 ou 400 mg/kg) administrada dia -1 sendo o estímulo com HC dado dia 0.

Grupos não tratados consistindo de *C. callosus* e camundongos Biozzi H/Se e L/Se os quais foram usados como controle em todas as experiências com HC, recebendo apenas HC na mesma dose.

Os animais foram sangrados individualmente pelo plexo retro-orbital como já descrito, para obtenção de anticorpos específicos nos dias indicados.

A cinética de anticorpos foi acompanhada por 37 dias conforme descrito anteriormente, através da titulação dos mesmos pela aglutinação direta com hemácias de carneiro.

2.9.2 - AÇÃO DE DUAS DOSES DE CI SOBRE O SISTEMA IMUNE.

Para avaliar a manutenção do efeito da CI por tempo mais prolongado grupos de *C. callosus* foram tratados com 20 ou 200 mg de CI/kg no dia -1 ou nos dias -1 e +5 sendo estimulados com HC dia 0 conforme mencionado anteriormente, praticando-se a hemaglutinação individualmente conforme mencionado.

2.9.3 - DURAÇÃO DO EFEITO DA CICLOFOSFAMIDA

O tempo de ação da droga sobre o sistema imune dos animais foi avaliado usando animais imunossuprimidos com 20 e 200 mg CI/kg no dia -1 e estimulados nos dias 0, +5 ou +10 com HC.

A obtenção dos anticorpos específicos e o estudo da cinética dos mesmos procedeu-se como já descrito.

INFLUÊNCIA DA RESPOSTA HUMORAL, ALTERADA POR CICLOFOSFAMIDA, EM CONTROLE DA PARASITEMIA.

2.9.4 - EFEITO DE 20 e 200 MG/KG CI NA RESPOSTA HUMORAL PARA *T. cruzi* E NÍVEIS PARASITÊMICOS.

Para avaliar se o tratamento com as doses acima produz o mesmo efeito descrito para HC nos animais, diversos grupos de *C. callosus* foram tratados com a droga dia -1, recebendo o estímulo com *T. cruzi* no dia 0, nas doses já mencionadas.

A cinética de aparecimento dos anticorpos e o controle da parasitemia foram analisados conforme referido anteriormente. Sendo feitos grupos separados e concomitantes para cada experiência.

2.9.5 - EFEITO DE DUAS DOSES DE 20 MG/KG CI NA RESPOSTA IMUNE HUMORAL, CONTROLE DA PARASITEMIA E MORTALIDADE.

Animais foram tratados com 20 mg/CI dia -1 ou -1 e +5 e inoculados com *T. cruzi* dia 0.

O efeito de baixa dose de CI no controle da infecção foi avaliado como já descrito através do acompanhamento da produção de anticorpos evolução de parasitemia e mortalidade, sendo a última observada por 30 dias.

2.9.6 - EFEITO DE DUAS DOSES DE 200 MG/KG CI SOBRE A RESPOSTA IMUNE HUMORAL, CONTROLE DA PARASITEMIA E MORTALIDADE.

A cinética de anticorpos foi acompanhada apenas para os animais inoculados com a cepa Y, conforme descrito em 2.5.2.

Na parasitemia e mortalidade este efeito foi avaliado em animais tratados inoculados com a cepa Y, M226 e Costalimai de acordo com o protocolo já descrito.

O controle de mortalidade consistiu de animais não infectados que receberam dose única (dia -1) e duas doses de CI (dias -1 e +5), sem infecção.

2.9.7 - TRANSFERÊNCIA PASSIVA DE SORO IMUNE

O soro imune obtido contra a cepa Y de *T. cruzi*. foi segundo item 2.8.

O grupo experimental constituiu-se de *Calo*mys nas condições padronizada, imunossuprimidos com 200 mg/kg CI no dia -1. No dia 0 os animais receberam 0,3 ml de soro imune (i.p.), 3 horas antes da infecção com 4000 Y/animal.

Os controles consistiram de animais imunos suprimidos ou não, que receberam soro normal antes da infecção e grupos apenas infectados.

A parasitemia foi acompanhada de acordo com o método já descrito.

_____ //

Cada grupo experimental apresenta o resultado de no mínimo 2 grupos de 10 animais.

2.10 - MÉTODO ESTATÍSTICO

Devido à grande variação individual entre os animais para título de anticorpos e nível de parasitemia, optou-se pela análise não paramétrica dos dados.

Como medidas que caracterizam a distribuição dos dados em cada grupo nos diversos dias de medida, foram calculados a mediana (Md), o posto médio ($\overline{Ri}$) e os percentis P_{25} e P_{75} . Nos gráficos, as barras superiores representam P_{25} e P_{75} , ou seja, dois pontos equidistantes da mediana, e que substituem na prática, o desvio padrão.

As comparações entre os grupos em cada um dos dias de medida nos diversos experimentos foi realizada utilizando-se a prova de KRUSKAL-WALLIS para mais de duas amostras independentes (HOLLANDER & WOLFE, 1973).

Foi calculada a estatística H com distribuição de Qui-Quadrado com $K-1$ graus de liberdade, onde K é o número de grupos comparados.

A hipótese de nulidade testada foi H_0 : não existe diferença entre os grupos. Esta hipótese foi rejeitada (caso onde existe diferença entre os grupos) quando o nível de significância associado à estatística H sob H_0 foi $p < 0,05$.

Quando $0,05 < p < 0,10$ foi referida tendência à diferença.

No caso de ser rejeitada H_0 ($p < 0,05$) foram calculadas as diferenças mínimas significativas para o contraste entre as medidas dos psotos dos grupos, o que possibilitou a classificação dos grupos.

A comparação entre os diversos momentos de medida dentro de cada um dos grupos foi feita graficamente, pois como o mesmo animal é medido em diferentes momentos existe uma estrutura de dependência entre as medidas, o que torna difícil a análise estatística destes dados.

Esta análise se complica ainda mais quando se constata que alguns animais morrem ao longo do experimento.

A comparação entre as proporções de mortalidade nos diversos grupos foi efetuada utilizando-se o teste de Qui-Quadrado para as proporções de positividade em tabelas binomiais, onde m é igual ao número de grupos (FLEISS, 1973).

3. RESULTADOS

ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL A HEMÁCIAS DE CARNEIRO.

3.1 - EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE CICLOFOSFAMIDA (CI) SOBRE A RESPOSTA IMUNE HUMORAL PARA HEMÁCIAS DE CARNEIRO (HC).

Os resultados do efeito de diferentes doses de CI sobre a resposta humoral dos animais estimulados com hemácias de carneiro (HC), estão expostos na FIG. 1A e 1B.

Observa-se na FIG. 1A que naqueles tratados com baixa dose de CI (20 e 100 mg/kg) houve uma tendência ao aumento de anticorpos, sendo esta mais acentuada no 5º dia após o estímulo. Neste dia os animais que receberam 20 mg mostraram títulos de anticorpos superiores aos tratados com 100 mg ($p < 0,001$) sendo que a análise estatística não indicou outras diferenças significativas, porém graficamente há tendência evidente de aumento dos anticorpos em relação ao grupo controle como pode se ver na Fig. 1B.

Esta tendência, a facilitação de resposta humoral começou a desaparecer no 9º dia, e no 20º dia estes grupos não diferiam do grupo controle, estando os níveis de anticorpos praticamente muito

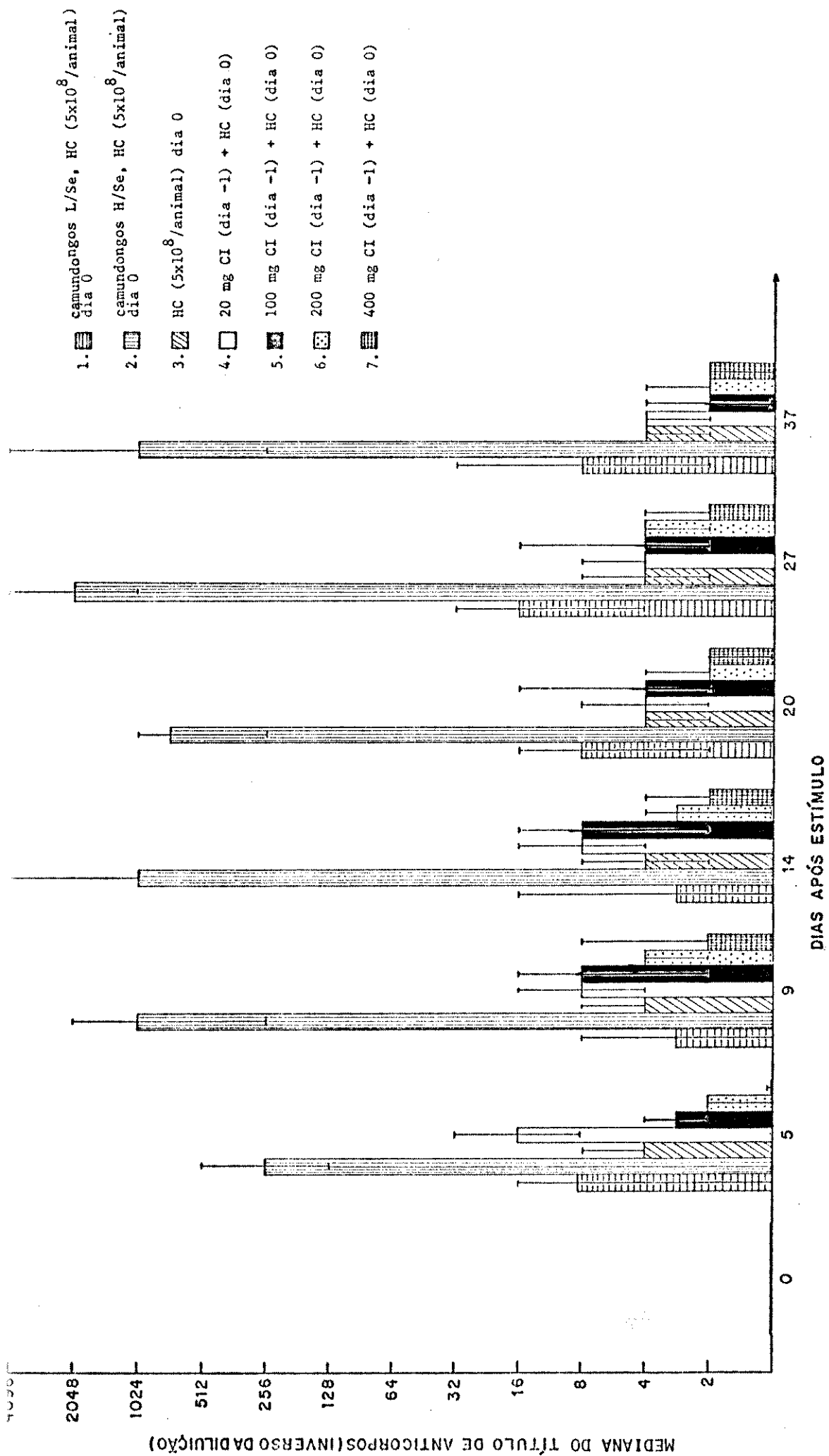


FIGURA 1A - Ação de diferentes doses de Ciclofosfamida (CI) sobre a resposta imune humoral de *C. callosus* a hemácias de carneiro (HC).

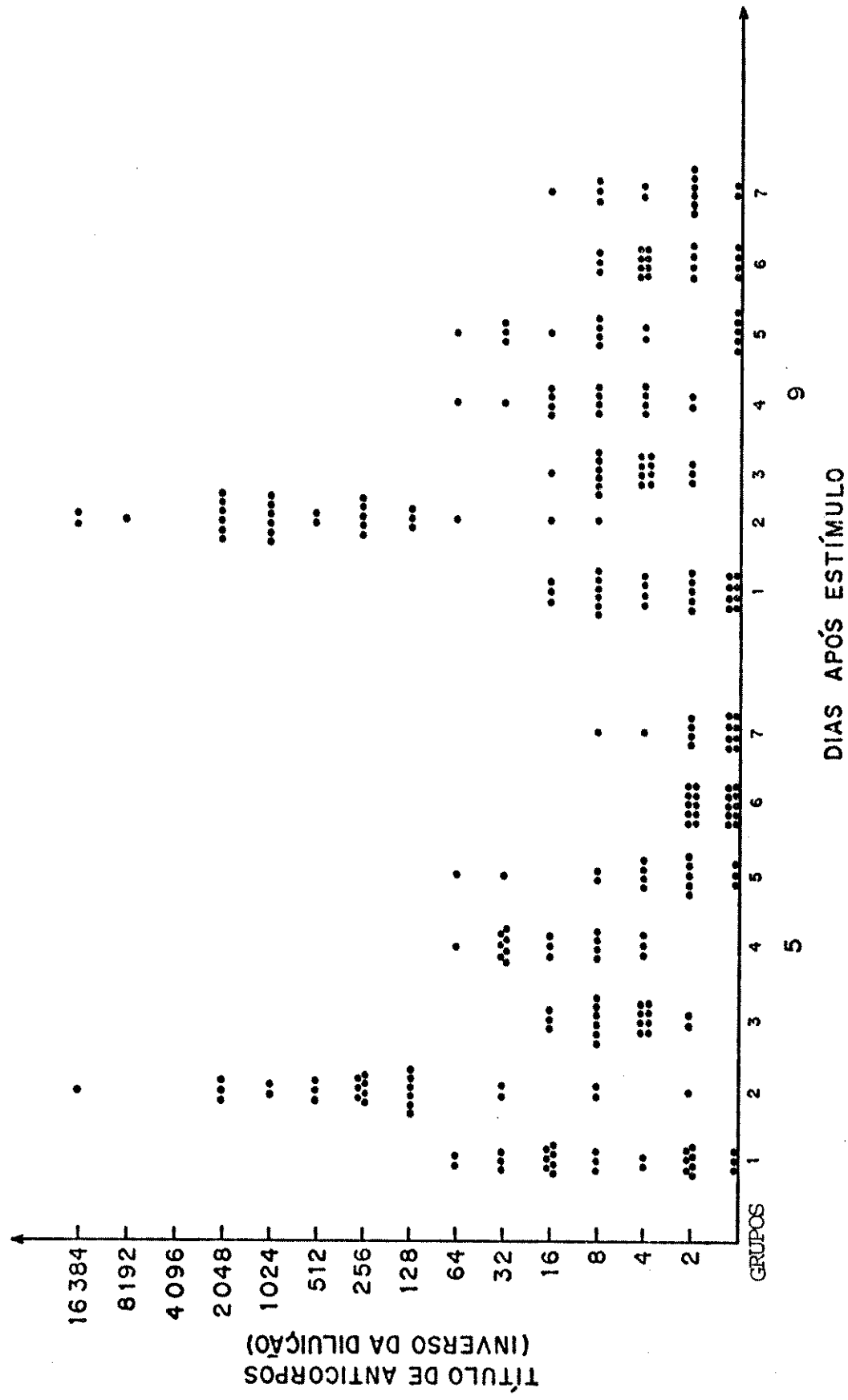


FIGURA 1B - Distribuição dos títulos de anticorpos de animais com ou sem a administração de diferentes doses de CI e estimulados com HC. Os grupos correspondem aos mostrados na Fig. 1A.

próximos (FIG. 1B).

Nos grupos imunossuprimidos com alta dose de CI (200 e 400 mg) a resposta humoral não diferiu entre estes grupos, ambos apresentando imunossupressão na resposta humoral em relação ao grupo controle ($p < 0,001$); este efeito imunossupressor foi mais acentuado até o 5º dia quando então iniciou-se a recuperação da resposta humoral. No grupo tratado com 400 mg esta tendência de imunossupressão parece persistir até o 37º dia em relação ao grupo controle quando $0,05 < p < 0,010$.

Notou-se que os animais tratados com 200 mg/kg apresentaram um aspecto geral menos debilitado em relação aos que receberam 400 mg/kg de CI.

Os *C. callosus* mostraram níveis de resposta humoral mais próximos aos camundongos maus produtores de anticorpos (L/Se) sendo que estes sempre foram inferiores em relação aos camundongos bons produtores de anticorpos (H/Se), FIG.1A e 1B, confirmando a exatidão de nossa metodologia.

Estes animais foram usados como testemunhos em todas as experiências com HC, mostrando sempre o mesmo perfil de resposta. Fato pelo qual foi mostrado graficamente apenas nesta figura.

3.2 - EFEITO DE DUAS DOSES DE CICLOFOSFAMIDA SOBRE O SISTEMA IMUNE DOS ANIMAIS.

A manutenção do efeito da CI sobre a resposta humoral dos animais foi avaliada tratando-se grupos de animais dia -1 e +5 com 200, 100 e 20 mg/kg de CI e estimulando-os no dia 0 com HC (FIGS. 2, 3 e 4).

Verifica-se que 200 mg de CI administrada antes do estímulo antigênico realmente teve efeito imunossupressor, uma vez que os títulos de anticorpos dos animais tratados são inferiores ao grupo controle até o 5º dia com $p < 0,001$. Neste dia, os animais que receberam a segunda dose de 200 mg de CI, não diferiram daqueles imunossuprimidos apenas no dia -1, apesar de graficamente haver esta sugestão, observa-se que o percentil 25% e 75% de ambos está entre 0 e 2, o que torna os grupos muito próximos, porém inferiores ao grupo controle.

A partir do 9º dia o grupo que recebeu apenas uma dose de CI (200 mg) iniciou sua recuperação, que se completou no 20º dia quando o nível de anticorpo deste grupo é próximo ao controle, sendo próximo seu percentil 25 e 75%.

Ao contrário, aqueles que receberam uma segunda dose de 200 mg de CI dia +5 mantiveram sua resposta humoral imunossuprimida até o 27º após estímulo antigênico

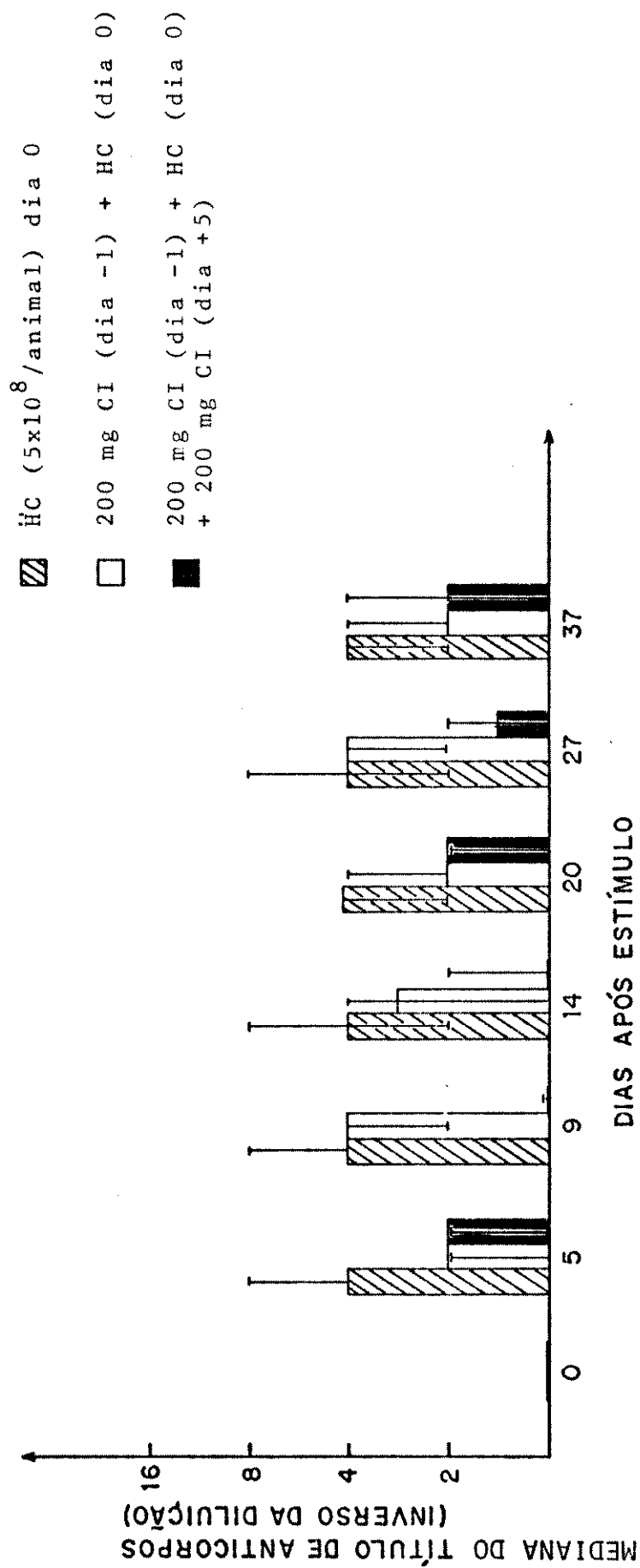


FIGURA 2 - Efeito de duas doses de 200 mg/kg Ciclofosfamida (CI) sobre a resposta imune humoral para hemácias de carneiro (HC).

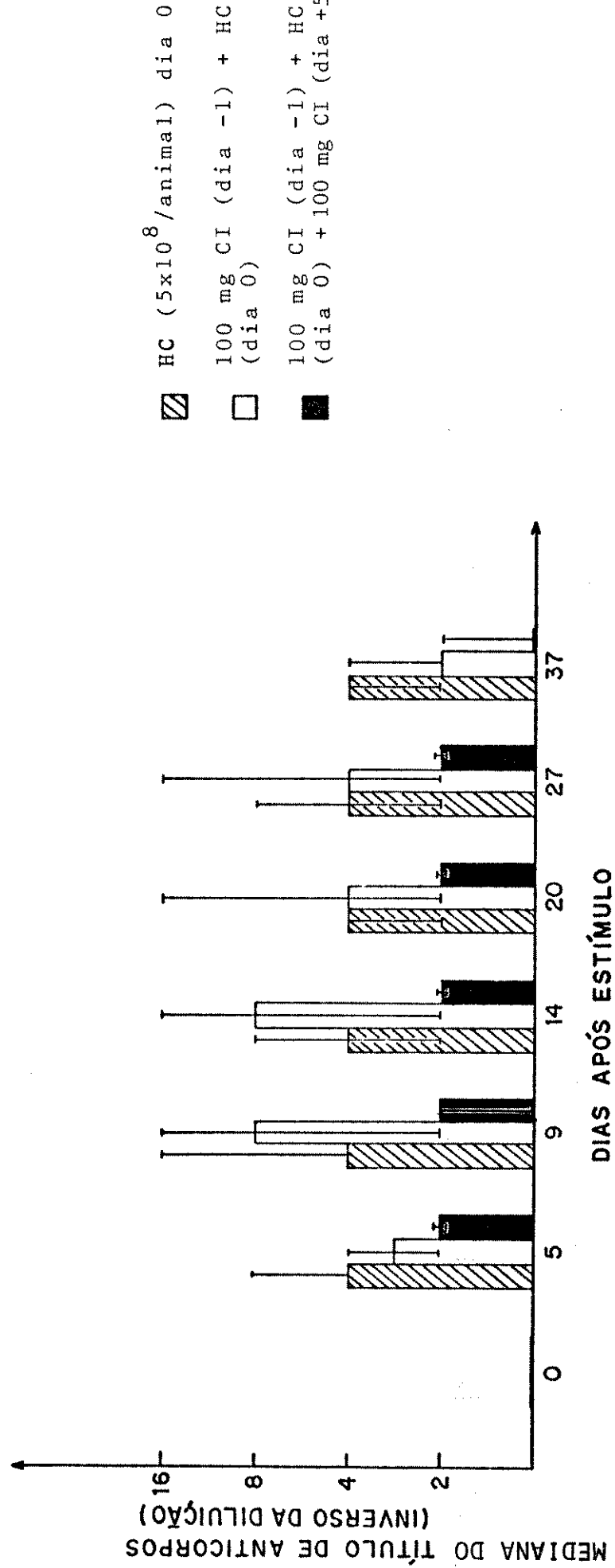


FIGURA 3 - Efeito de duas doses de 100 mg/kg Ciclofosfamida (CI) sobre a resposta imune humoral de *C. callosus* para hemácias de carneiro (HC).

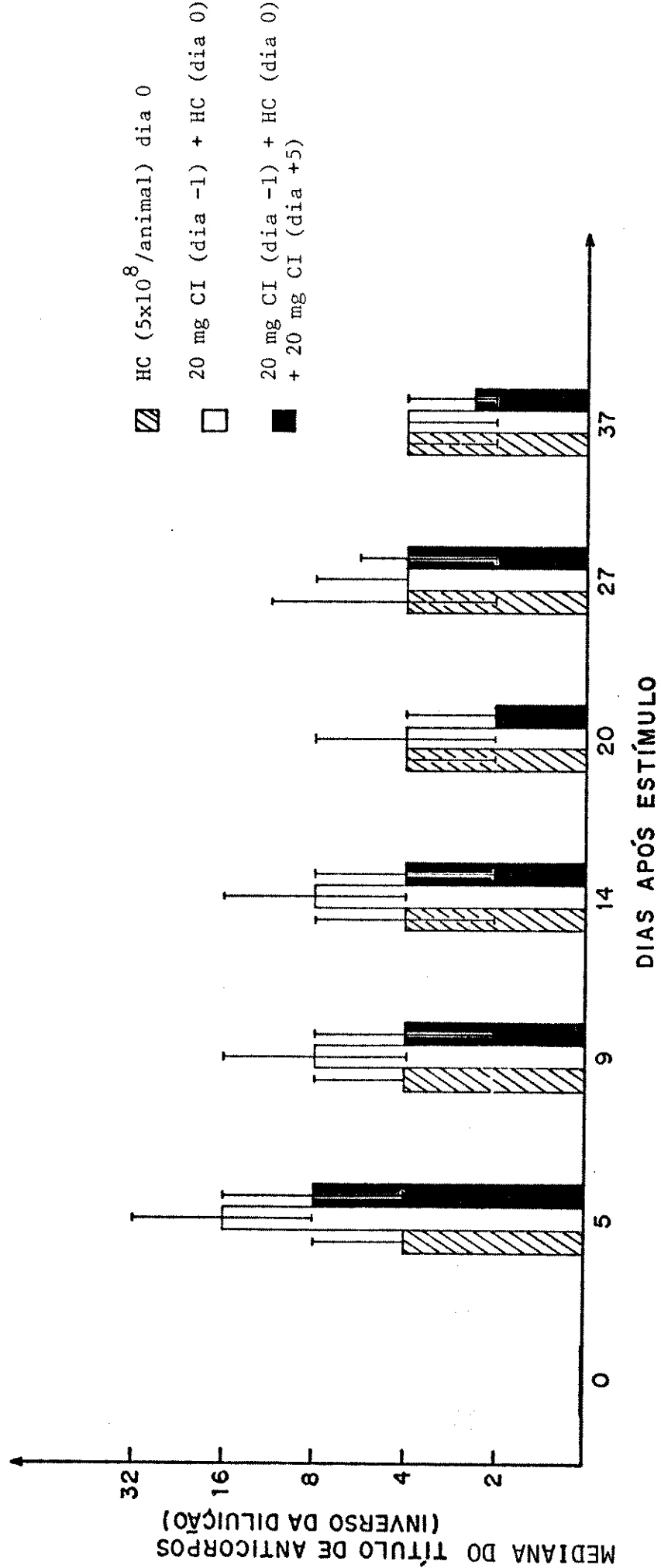


FIGURA 4 - Efeito de duas doses de 20 mg/kg de Ciclofosfamida sobre a resposta imune humoral para hemácias de carneiro (HC).

$p < 0,001$ e no 37º dia ainda há uma ligeira tendência deste grupo mostrar-se sob o efeito da droga $0,05 < p < 0,10$, mostrando que a segunda dose de 200 mg é capaz de manter o efeito imunossupressor mais prolongado.

A FIG. 3 mostra o mesmo esquema de tratamento, apenas variando a dose de CI, 100 mg, antes do estímulo antigênico.

Observa-se para o grupo que recebeu apenas uma dose de CI dia -1, o mesmo perfil de resposta descrita na FIG. 1.

O tratamento com uma segunda dose de CI dia +5 provocou efeito imunossupressor semelhante ao obtido com 200 mg; até o 14º dia este efeito foi mais acentuado, em relação aos que receberam apenas uma dose da droga ($p < 0,05$). Além disto, este efeito manteve-se até o 37º dia após o estímulo com $p < 0,02$.

A FIG. 4 mostra os grupos de animais tratados com 20 mg de CI.

Os que receberam a droga dia -1 mostraram o mesmo perfil descrito no Gráf. 1, com um leve aumento de anticorpos no 5º dia ($p < 0,01$), que se mantém até o 14º dia após o estímulo ($p = 0,02$). Após este dia não foi constatada diferença significativa entre os grupos $p > 0,20$.

Os animais que receberam uma segunda dose de 20 mg com a intenção de aumentar o efeito, não mostraram

aumento significativo de anticorpos em relação aos grupos anteriores ($p > 0,30$).

3.3 - DURAÇÃO DO EFEITO DA CICLOFOSFAMIDA

Os grupos de animais foram tratados com 200 ou 20 mg de CI dia -1, sendo o estímulo com HC dado nos dias 0, +5 ou +10 (FIGS. 5 e 6).

As FIGS. 5A e 5B, mostram que até 10 dias após o tratamento com 200 mg de CI ainda existia o efeito da droga no organismo dos animais, sendo o nível de anticorpos inferior ao grupo controle, só estimulado com HC ($p < 0,001$) quando então iniciou-se a recuperação da resposta humoral (FIG. 5B, grupos 1 e 4, 5º dia após estímulo antigênico). Observa-se que após este período, os três grupos experimentais já não diferiam mais entre si (FIG. 5B, 9º dia) e do controle.

Se a mesma análise é feita para os animais tratados com 20 mg de CI (FIGS. 6A e 6B) observa-se que os grupos estimulados dia +5 e +10 mostram título de anticorpos próximos do grupo controle (FIG. 6B, grupos 1, 3 e 4, 5º dia após estímulo) indicando que após 5 dias a droga provavelmente não está mais agindo sobre o sistema imune dos animais. Quando o estímulo com HC foi dado no dia 0, repe

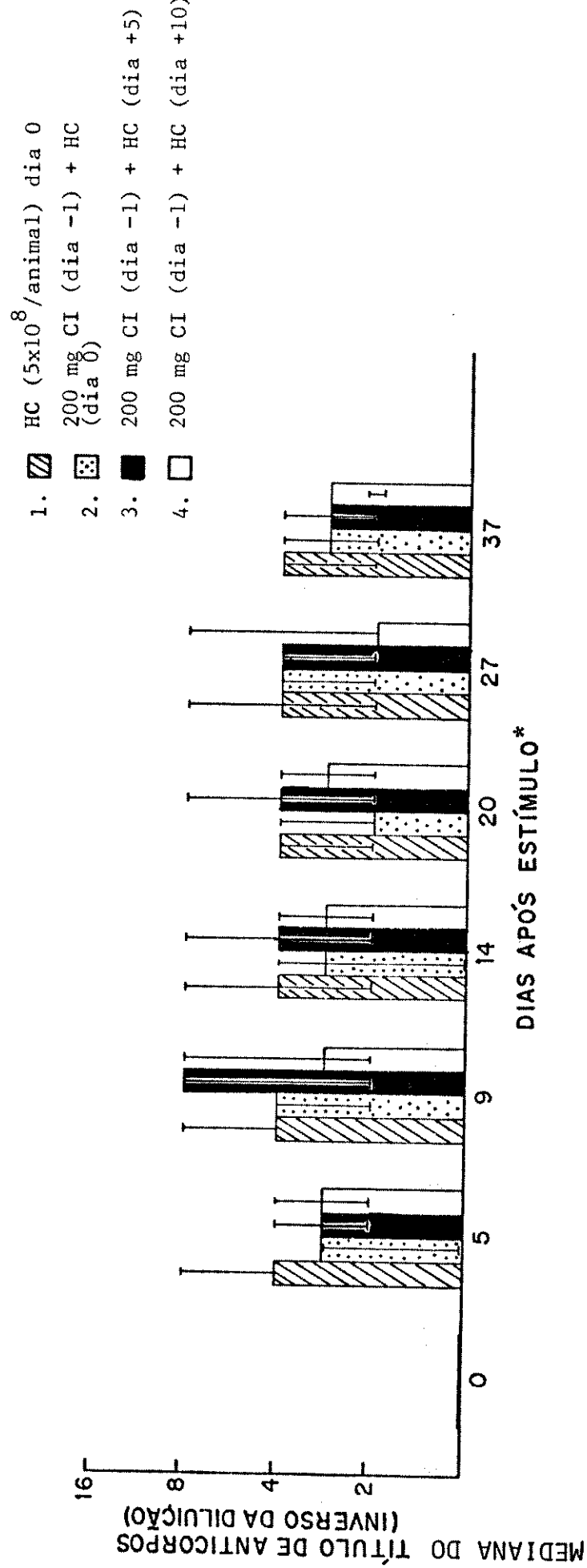


FIGURA 5A - Duração do efeito de 200 mg/kg de Ciclofosfamida (CI) em *C. callosus* estimulados com hemácias de carneiro (HC).

* Os dias referem-se a dia após o estímulo. Notar que estes estímulos são dados em dias diferentes.

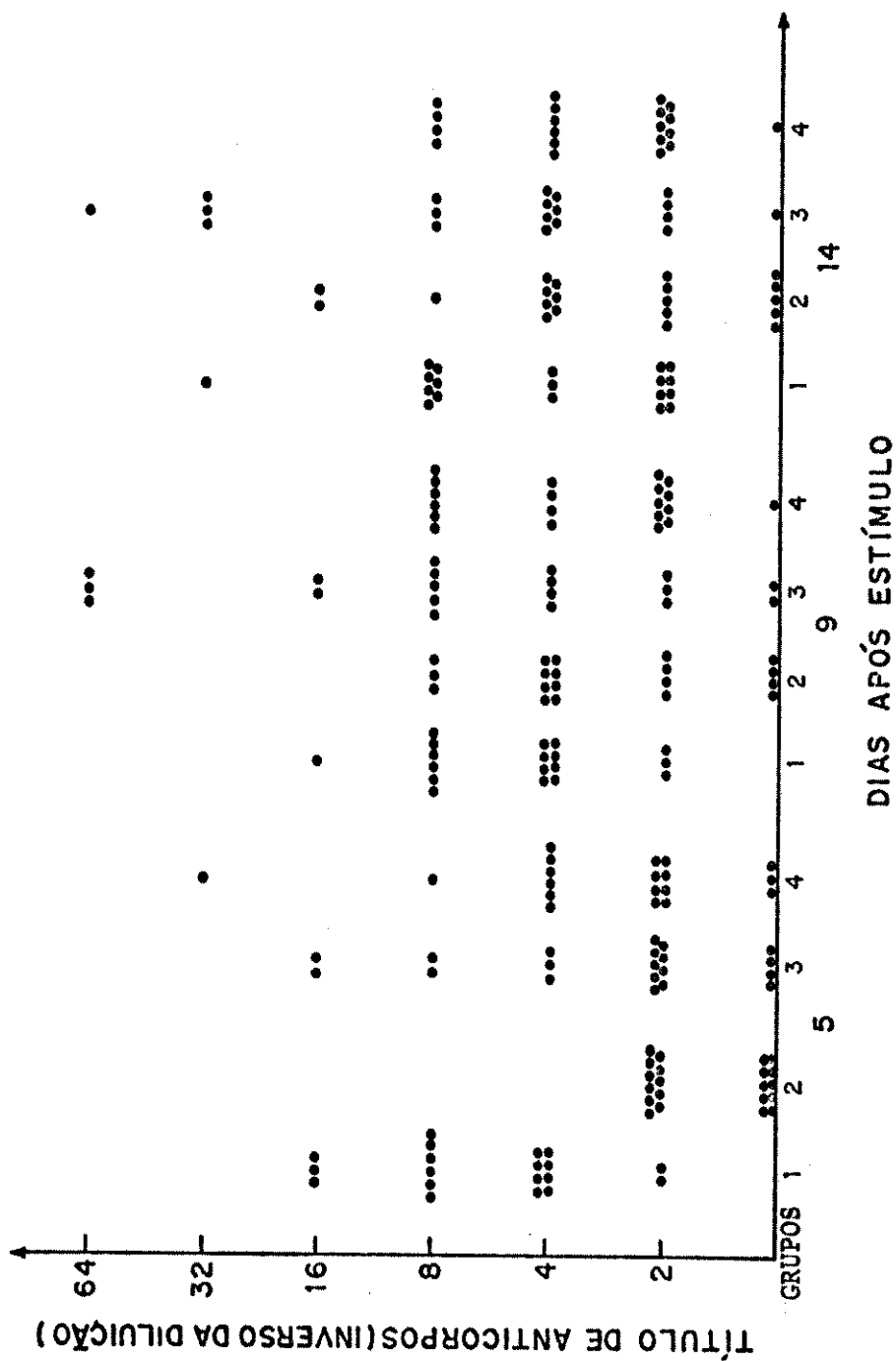


FIGURA 5B - Distribuição do título de anticorpos dos *C. callosus* imunossuprimidos com 200 mg de CI e estimulados com HC.

Os grupos correspondem aos mostrados na Fig. 5A.

1.  HC (5×10^8 /animal) dia 0
2.  20 mg CI (dia -1) + HC (dia +0)
3.  20 mg CI (dia -1) + HC (dia +5)
4.  20 mg CI (dia -1) + HC (dia +10)

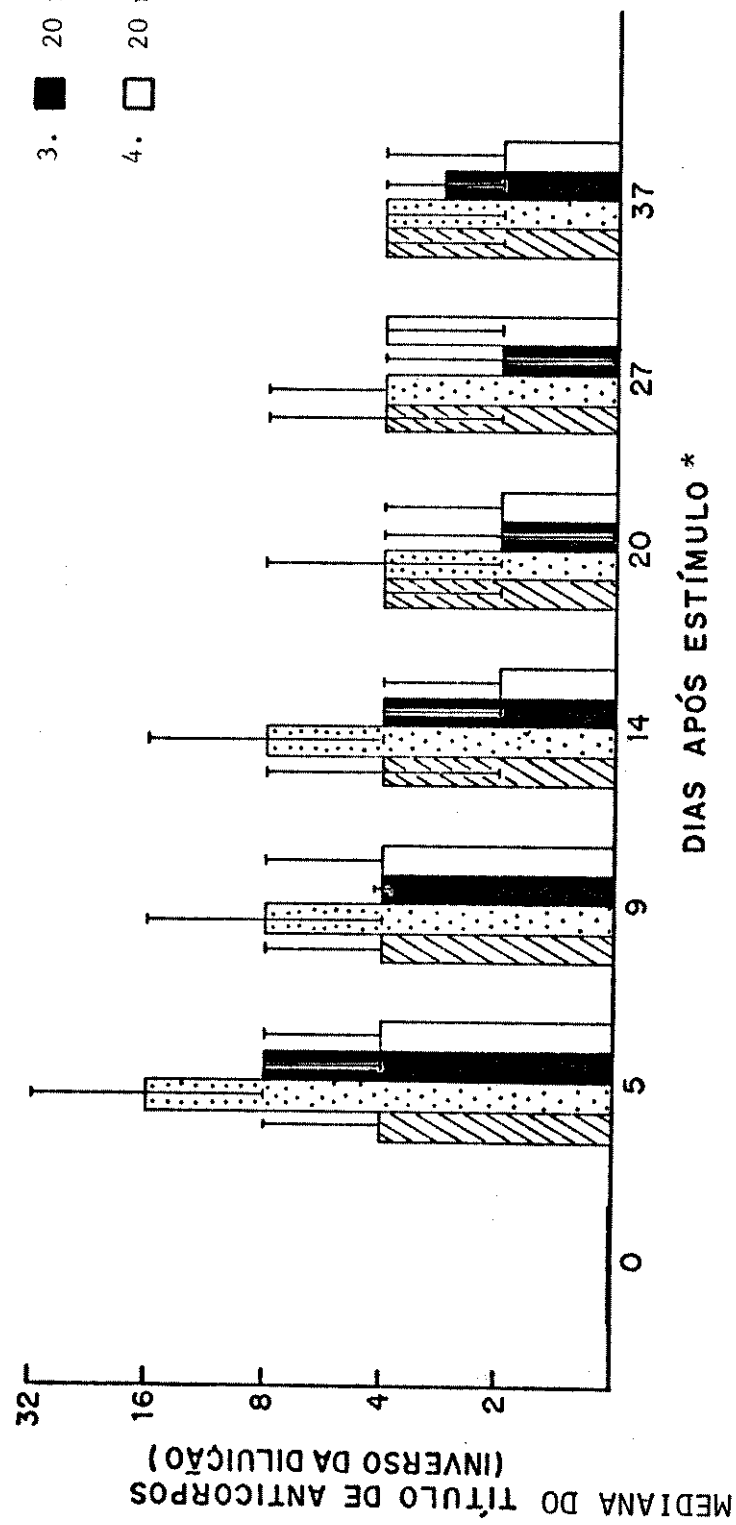


FIGURA 6A - Duração do efeito de 20 mg/kg de Ciclofosfamida (CI) em *C. callosus* estimulados com hemácias de carneiro (HC).

* Os dias referem-se a dia após o estímulo. Notar que estes estímulos são dados em dias diferentes.

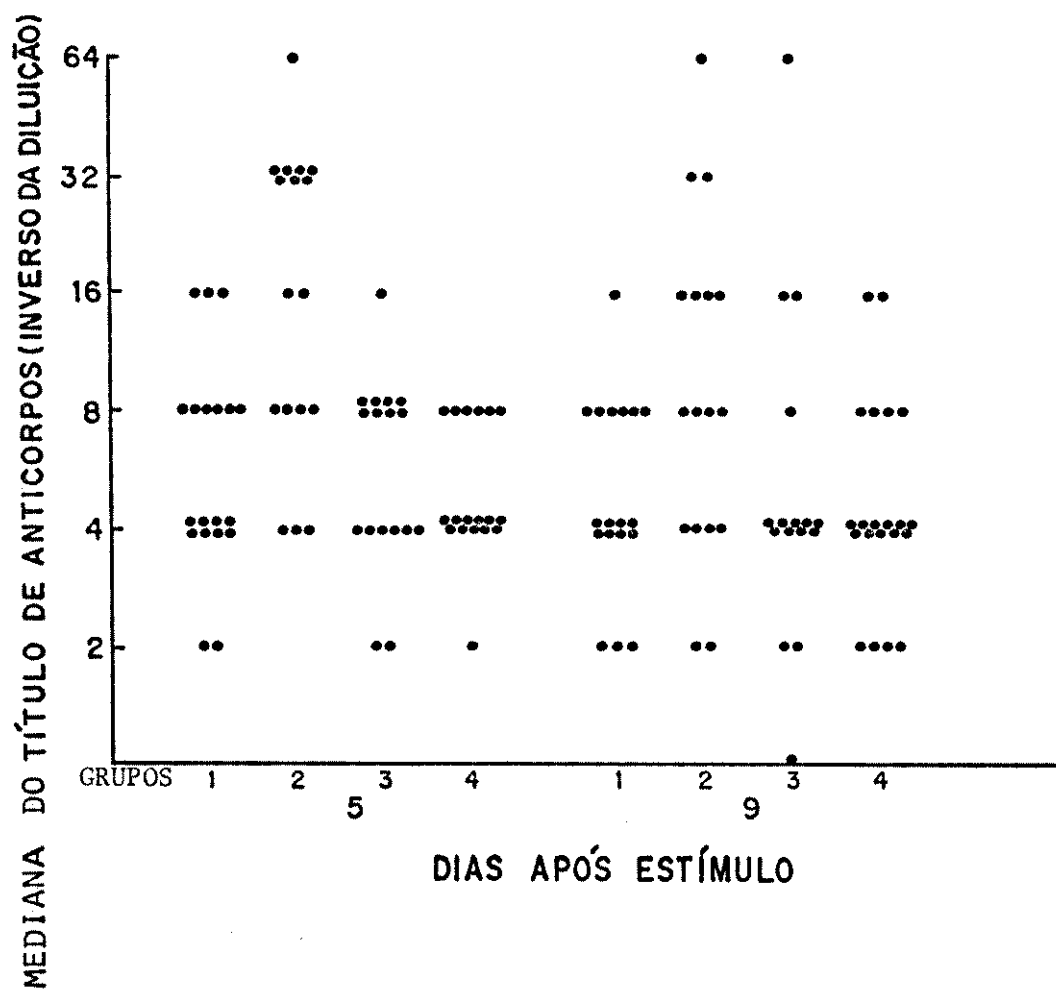


FIGURA 6B - Distribuição do título de anticorpos dos *C. callosus* imunossuprimidos com 20 mg de CI e estimulados com HC. Os grupos correspondem ao da Fig. 6A.

tiu-se o observado na FIG. 1, um leve aumento de anticorpos em relação aos animais apenas estimulados, $p < 0,001$ (FIG. 6B, grupos 1 e 2, 5º e 9º dias), sugerindo mais uma vez a possibilidade de que o tratamento com 20 mg 24 horas antes do estímulo antigênico possa facilitar a resposta humoral destes animais.

3.4 - INFLUÊNCIA DA RESPOSTA HUMORAL ALTERADA PELA CICLOFOSFAMIDA (CI), NO CONTROLE DA PARASITEMIA E MORTALIDADE DOS ANIMAIS INOCULADOS COM *T. cruzi*,

3.4.1 - EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE CI (20, 100 e 200 mg/kg) NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS E CONTROLE DA PARASITEMIA, CEPA Y:

3.4.1.A - CINÉTICA DE ANTICORPOS ANTI-*T. cruzi*

A FIG. 7 mostra o efeito de diferentes doses de CI na produção de anticorpos dos animais inoculados com 4.000 parasitas da cepa Y. O título de anticorpos foi dado pelo teste de aglutinação direta com tripomastigotas sanguícolas.

Observa-se que até o 9º dia o título de antiu

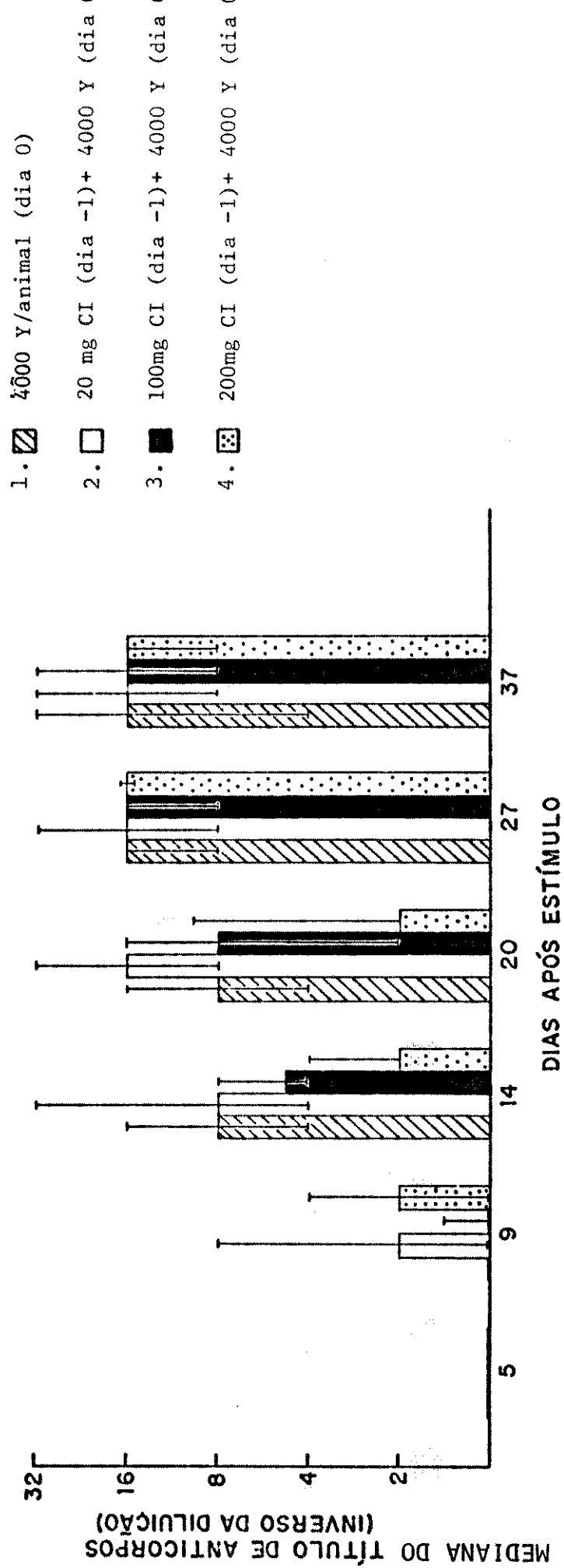


FIGURA 7A - Efeito de diferentes doses de Ciclofosfamida (CI mg/kg) sobre a resposta imune humoral para T. cruzi.

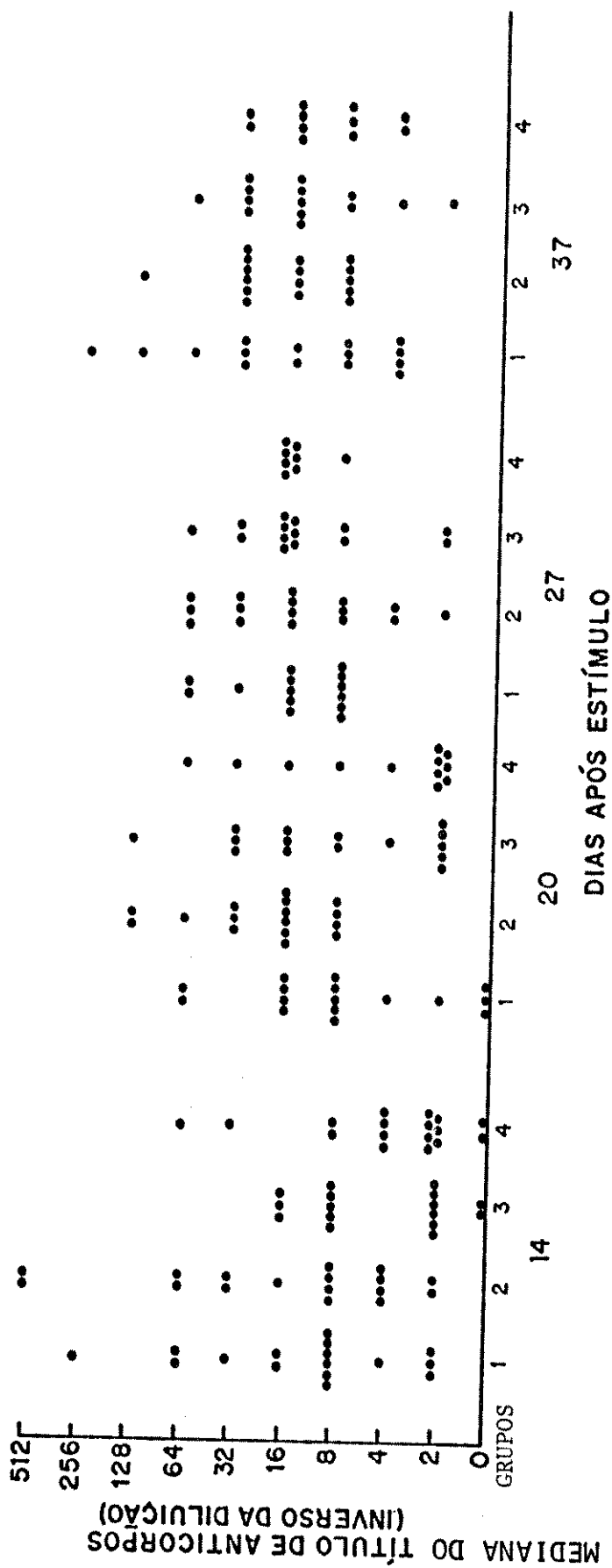


FIGURA 7B - Distribuição dos títulos de anticorpos dos *C. callosus* imunossuprimidos com diferentes doses de CI e estimulados com *T. cruzi*. Os grupos correspondem aos da Fig. 7A.

corpos em todos os grupos experimentais foi baixo e irregular.

Após 14 dias da infecção os níveis de anticorpos elevaram-se, sendo que o grupo tratado com 20 mg de CI antes de receber parasitas repetiu aqui, as tendências anteriores de aumento de anticorpos. Esta tendência foi mais acentuada no 20º dia ($p < 0,05$); observando-se que os percentis 25% e 75% neste grupo são superiores ao grupo controle (FIG. 7A) e graficamente também existe esta sugestão (FIG. 7B, grupos 1 e 2). Após este período não existe diferença.

Os animais tratados com 200 mg de CI tiveram a resposta humoral para *T. cruzi* imunossuprimida em relação ao grupo controle, até o 14º dia após estímulo ($p < 0,02$), FIG. 7A. Se observarmos a FIG. 7B, onde mostramos a dispersão das respostas encontradas, nota-se que este efeito persistiu até o 20º dia, após o qual se aproxima do controle.

Não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais e controle a partir deste dia.

O tratamento dos animais com 100 md de CI antes da infecção com *T. cruzi* estatisticamente não mostrou diferença significativa no nível de anticorpos em relação ao grupo controle ao longo da experiência, como pode ser visto nas FIGS. 7A e 7B.

As medianas dos títulos de anticorpos anti-*T.cruzi* foram sempre baixos, sendo 1/16 o título máximo obtido, tanto para o grupo controle como para aqueles tratados com 20 mg de CI antes do inóculo dos parasitas, apesar de haver alguns animais com títulos mais elevados.

3.4.1.B - INFLUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES PROVOCADAS POR DIVERSAS DOSES DE CI SOBRE O CONTROLE DA PARASITEMIA..

A influência das alterações provocadas pelas diversas doses de CI sobre a resposta humoral na capacidade de controle da infecção, medida através da contagem do número de parasitas circulante foi comparada entre os diversos grupos, procedendo-se à contagem de parasitas conforme descrito no item 2. Todas as curvas de parasitemia foram analisadas conforme descrito no item 2.10.

O Gráfico 1 mostra que a imunossupressão com 200 mg de CI, aumentou a parasitemia. A análise estatística realizada mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais e controle a partir do 7º dia ($p < 0,001$). No 11º dia após infecção os grupos tratados com 20 mg de CI antes da infecção e os que foram apenas infectados não diferem entre si, porém aqueles tratados com 200 mg mostram parasitemia superior

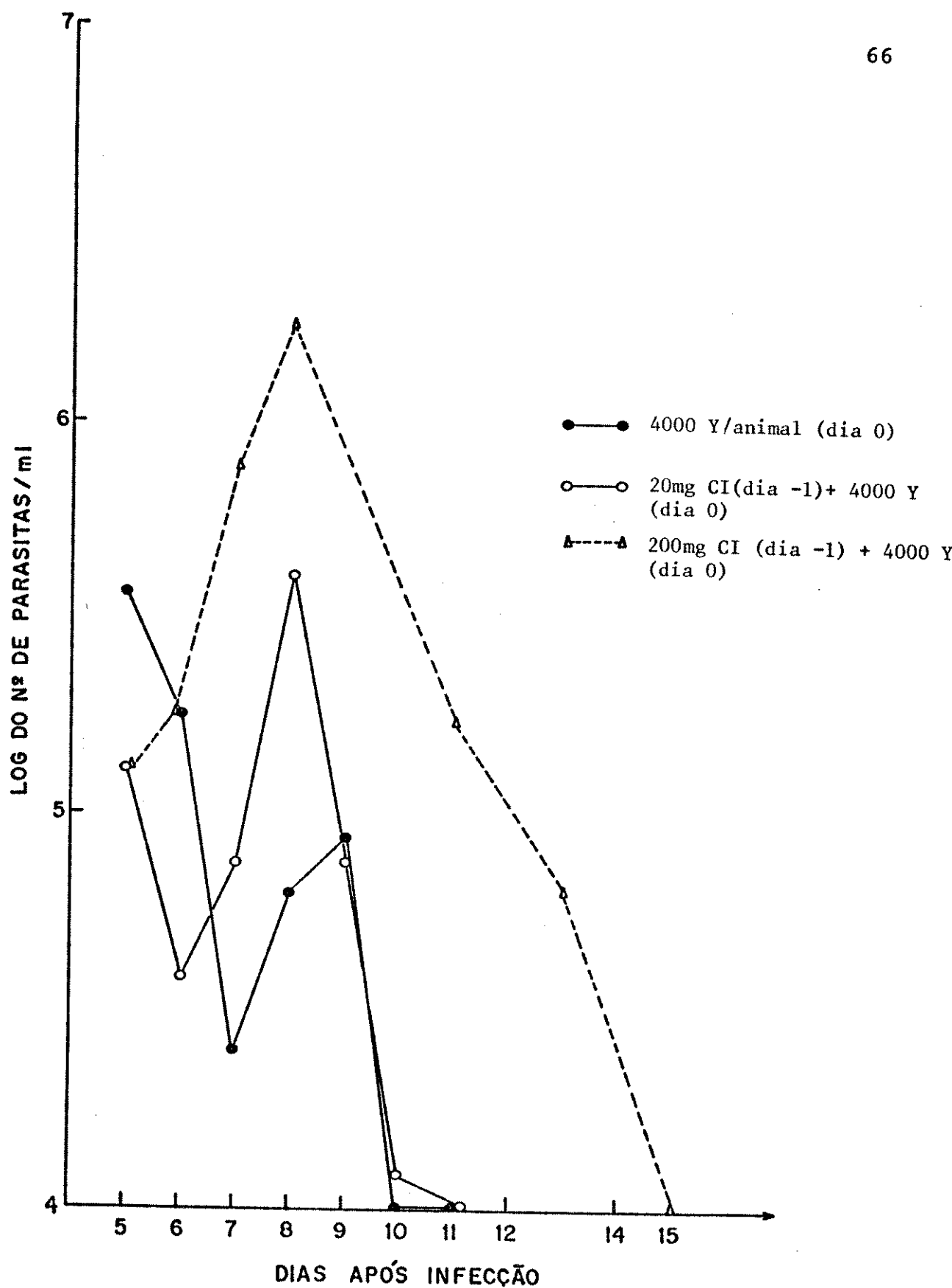


GRÁFICO 1 - Efeito de diferentes doses de Ciclofosfamida (CI mg/kg) sobre a parasitemia de *C. callosus* inoculados com *T. cruzi*, Cepa Y.

($p < 0,001$).

Os perfis das curvas de parasitemia são semelhantes entre si. As aparentes diferenças no grupo controle entre 5º e 9º dias, são numericamente desprezíveis.

O desaparecimento dos parasitas da circulação deu-se respectivamente para o grupo controle, tratados com 20 mg ou 200 mg/kg de CI nos dias 16, 19 e 22 após infecção, apesar do Gráf. 1, que representa mediana, mostrar este fato mais precocemente.

3.4.2 - EFEITO DE DUAS DOSES DE 20 MG/KG DE CI SOBRE RESPOSTA IMUNE HUMORAL, CONTROLE DA PARASITEMIA E MORTALIDADE EM ANIMAIS INOCULADOS COM *T. cruzi*, CEPA Y.

3.4.2.A - RESPOSTA IMUNE HUMORAL.

A FIG. 8A e B mostra a cinética de anticorpos dos animais tratados com dose única (dia -1) ou duas doses (dia -1 e +5) de CI e estimulados dia 0 com *T. cruzi*.

Os animais que recebem o tratamento com dose única mostraram o mesmo perfil de resposta descrito no item 3.4.1.A, com ligeira tendência de aumento no nível de

anticorpos em relação ao grupo controle $0,05 < p < 0,1$,
FIG. 8.B, grupos 1 e 2, 20º dia após infecção.

O tratamento com uma segunda dose de 20 mg
dia +5 na tentativa de potenciar a resposta imune não mos-
trou resultados similares dos demais grupos.

3.4.2.B - CONTROLE DA PARASITEMIA E MORTALIDADE.

No Gráfico 2 vê-se que o tratamento dos ani-
mais com 20 mg de CI provocou um aumento de parasitas cir-
culantes, conforme mostrado no Gráfico 1.

Os animais que receberam uma ou duas doses de
CI apresentaram níveis de parasitemia que não diferiram en-
tre si, porém superiores ao grupo que recebeu apenas 4×10^3
parasitas ($p < 0,02$), sendo esta diferença mais eviden-
te no 8º dia após infecção.

Quanto à mortalidade (Tab. 1), os animais con-
troles neste experimento tiveram 10% de mortalidade no pe-
ríodo de 30 dias, enquanto para ambos grupos tratados com 20 mg foi de
0%.

Todas as proporções de mortalidade foram rea-
lizadas segundo item 2.10.

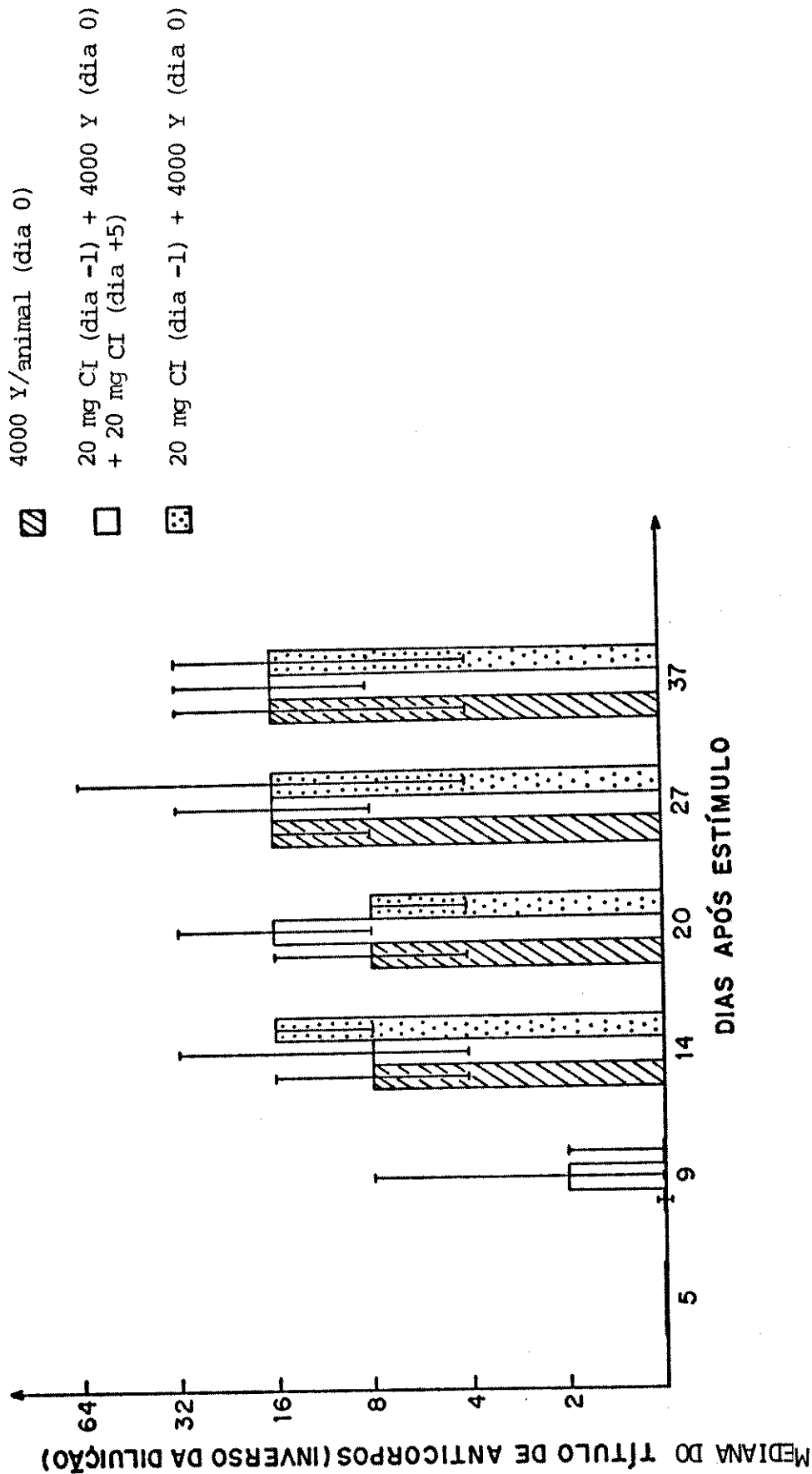


FIGURA 8A - Efeito de duas doses de 20 mg Ciclofosfamida (CI) sobre a resposta imune humoral do *C. callosus* para *T. cruzi*.

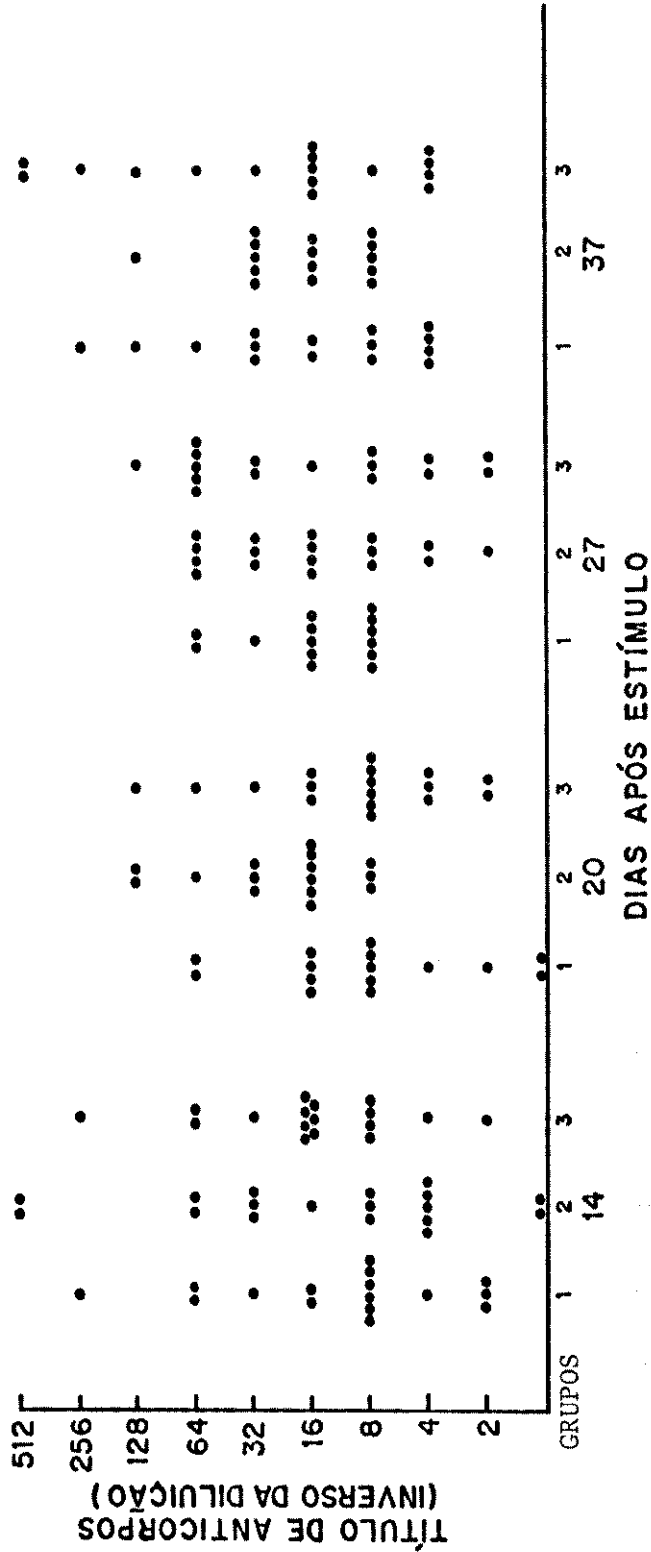


FIGURA 8B - Distribuição dos títulos de anticorpos dos *C. callosus* imunossu-
primidos com duas doses de 20 mg/kg de CI e estimulados com T.
cauzi.
Os grupos correspondem aos da Fig. 8A.

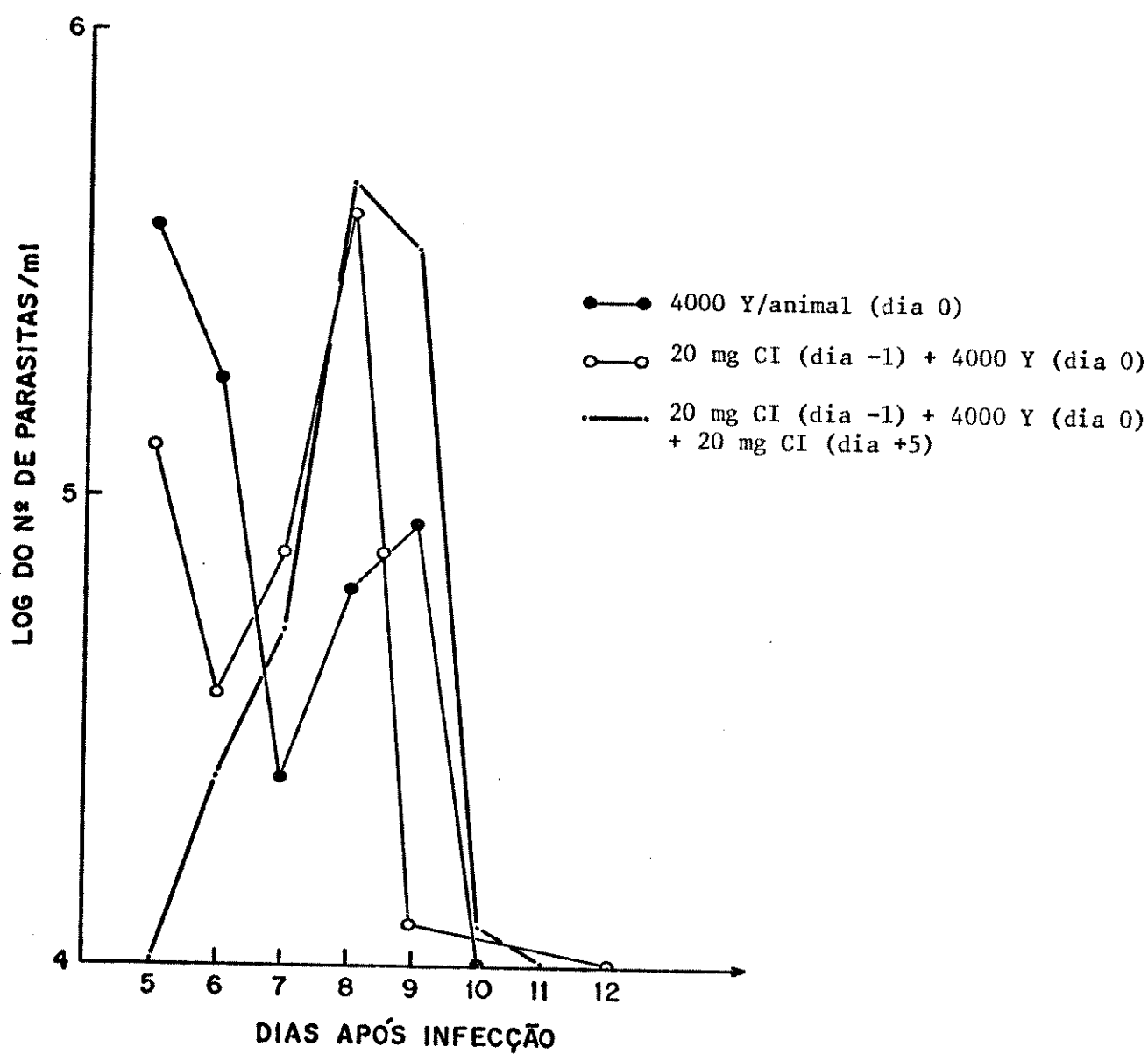


GRÁFICO 2 - Efeito de 20 mg/kg de Ciclofosfamida (CI) sobre a parasitemia de *C. callosus* inoculados com *T. cruzi*, cepa Y.

TABELA 1 - Ação de 20 mg CI sobre a mortalidade de *C. callosus* inoculados com *T. cruzi* (Cepa Y).

Grupos experi- mentais % mortos/ cepa	4000 parasitas (dia 0)		20 mg CI (dia -1) + 4000 parasitas (dia 0)		20 mg CI (dia -1) + 4000 parasitas (dia 0) + 20 mg CI (dia +5)	
Y	10% (2/19) *		0% (0/22)		0% (0/24)	

3.4.3 - EFEITO DE 200 MG DE CI EM ANIMAIS INOCULADOS
COM *T. cruzi*, CEPAS Y, M226 E COSTALIMAI.

3.4.3.A - RESPOSTA IMUNE HUMORAL PARA CEPA Y.

O efeito de 200 mg de CI na capacidade de produzir anticorpos anti *T. cruzi* foi de imunossupressão como foi descrito em item anterior, 3.4.1.A, supressão que se manteve até o 20º dia, quando então os animais iniciaram uma recuperação de resposta humoral; no 37º dia após a infecção os níveis de anticorpos deste grupo e dos controles já não diferiram entre si.

3.4.3.B - EFEITO DE 200 MG DE CI NO CONTROLE DA PARASITEMIA E MORTALIDADE DOS ANIMAIS INOCULADOS COM *T. cruzi*, CEPA Y, M226 e COSTALIMAI.

O efeito da alteração de resposta humoral sobre o controle da parasitemia foi analisado e os resultados estão no Gráfico 3, para a cepa Y.

Os animais tratados com duas doses de 200 mg

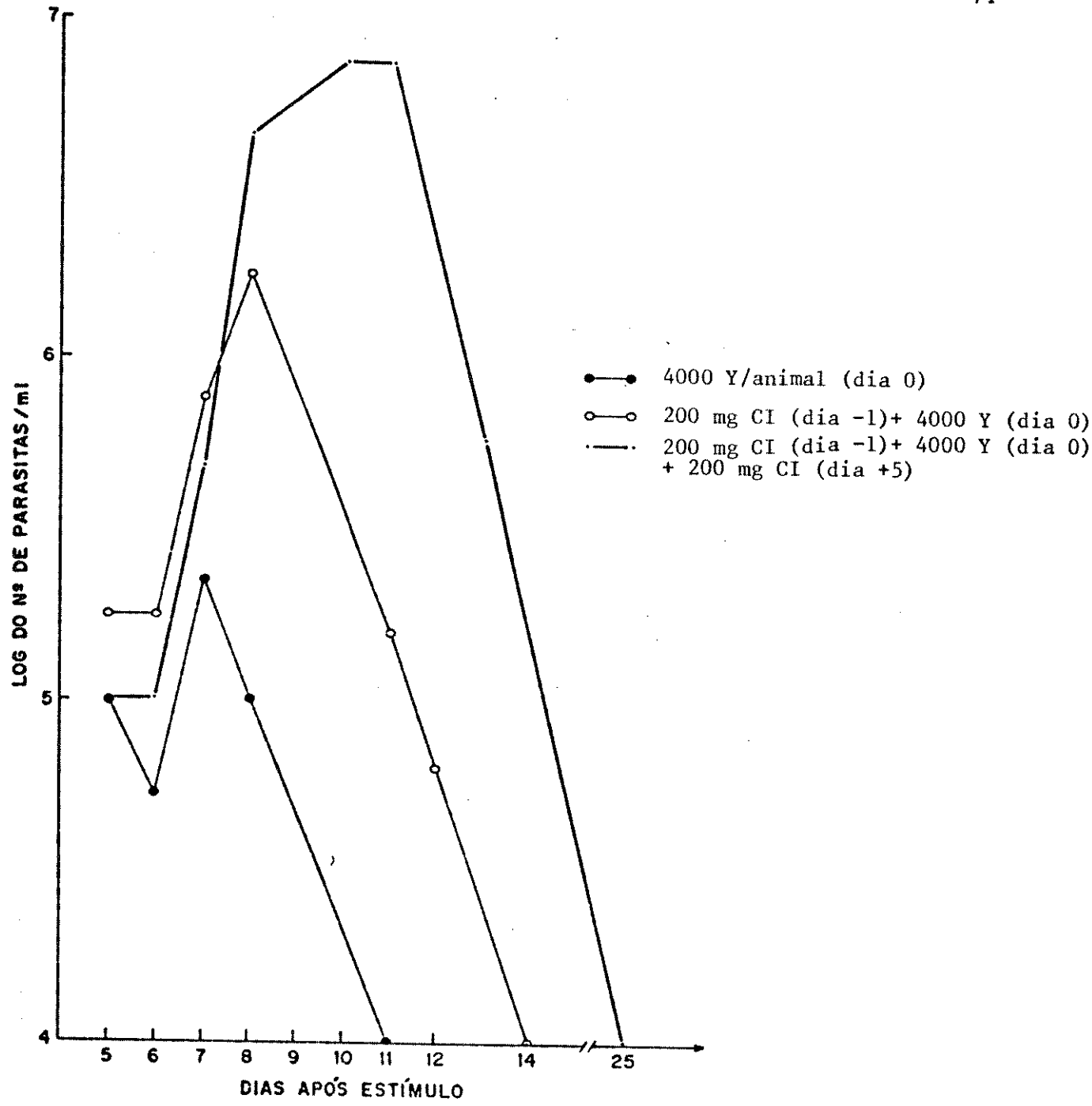


GRÁFICO 3 - Efeito de 200 mg/kg de Ciclofosfamida (CI) sobre parasitemia de *C. callosus* inoculados com *T. cruzi*, cepa Y.

de CI dia -1 e +5 tiveram aumento acentuado no número de parasitas, em relação aos que receberam uma única dose dia -1; ambos grupos mostram níveis de parasitas bem superiores ao grupo que recebeu apenas parasitas ($p < 0,001$).

Esta diferença foi mais significativa após o 8º dia de infecção e assim permaneceu até os animais não apresentarem parasitas na circulação.

Os picos de parasitemia foram no 7º, dia para o grupo controle e entre 8º-10º dia para os tratados com uma e duas doses de CI respectivamente.

No 25º dia após infecção nenhum grupo apresentou parasitas detectáveis na circulação, pelo método utilizado.

A Tabela 2 mostra que a mortalidade dos animais infectados com a cepa Y tratados com duas doses de 200 mg de CI de 90%, sendo superior ao grupo que recebeu dose única onde encontramos 18,51%, enquanto nos que receberam apenas parasitas foi de 0% ($p < 0,001$).

Os grupos que não foram infectados mas apenas imunossuprimidos com dose única (dia -1) ou duas doses (dias -1 e +5) tiveram 0% e 3,5% de mortalidade respectivamente (Tab. 2).

O efeito desta mesma dose de imunossupressor sobre o controle da parasitemia de animais inoculados com as cepas M226 ou Costalimai está expresso nos Gráficos 4 e

TABELA 2 - Ação de 200 mg CI sobre a mortalidade de *C. callosus* inoculados com diversas cepas de *T. cruzi*.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	200 mg CI (dia -1) + 4000 Parasitas (dia 0)				200 mg CI (dia -1) + 4000 Parasitas (dia 0)		200 mg CI (dia +5) + 4000 Parasitas (dia 0)	
	200 mg CI (dia -1) + 4000 Parasitas (dia 0)				200 mg CI (dia -1) + 4000 Parasitas (dia 0)		200 mg CI (dia +5) + 4000 Parasitas (dia 0)	
Y**	0% (0/15)*	18,51% (5/27)	90,9% (20/22)	0% (0/41)	3,5% (1/28)			
M226***	0% (0/20)	10% (2/20)	33,3% (5/15)	0% (0/20)	0% (0/10)			
Costalimai****	5% (1/20)	15% (3/20)	35% (7/20)▲	0% (0/12)	20% (3/15)▲			

* Nº Mortos / Nº total de animais

** p < 0,001

*** p < 0,01

**** p > 0,10 - não há diferença significativa entre os grupos ▲.

5.

Nestes gráficos o mesmo perfil de resposta anterior (Gráf. 3) repetiu-se.

Os animais tratados com duas doses de 200 mg de CI tiveram parasitemia superior aos grupos tratados com uma dose, sendo este também superior aos animais apenas infectados.

As curvas de parasitemia dos animais inoculados com as cepas M226 e Costalimai mostraram perfil irregular.

O nível máximo de parasitemia encontrado para a cepa M226 foi entre o 17º e 22º dia tanto para o grupo controle como para os animais imunossuprimidos (Gráfico 4).

O Gráfico 5 apresenta o perfil de parasitemia dos animais inoculados com a cepa Costalimai mostrando para o grupo controle um pico de parasitemia variável entre 21º-26º dias após inóculo para o grupo controle e no 27º dia para aqueles que receberam tratamento com CI antes da infecção. As parasitemias apresentaram oscilações.

As mortalidades do grupos inoculados com as cepas M226 e Costalimai foram muito próximas (Tab. 2); para os animais que receberam sô parasitas M226 esta foi 0% ou Costalimai 5%.

Nos animais tratados com uma dose de imunos-

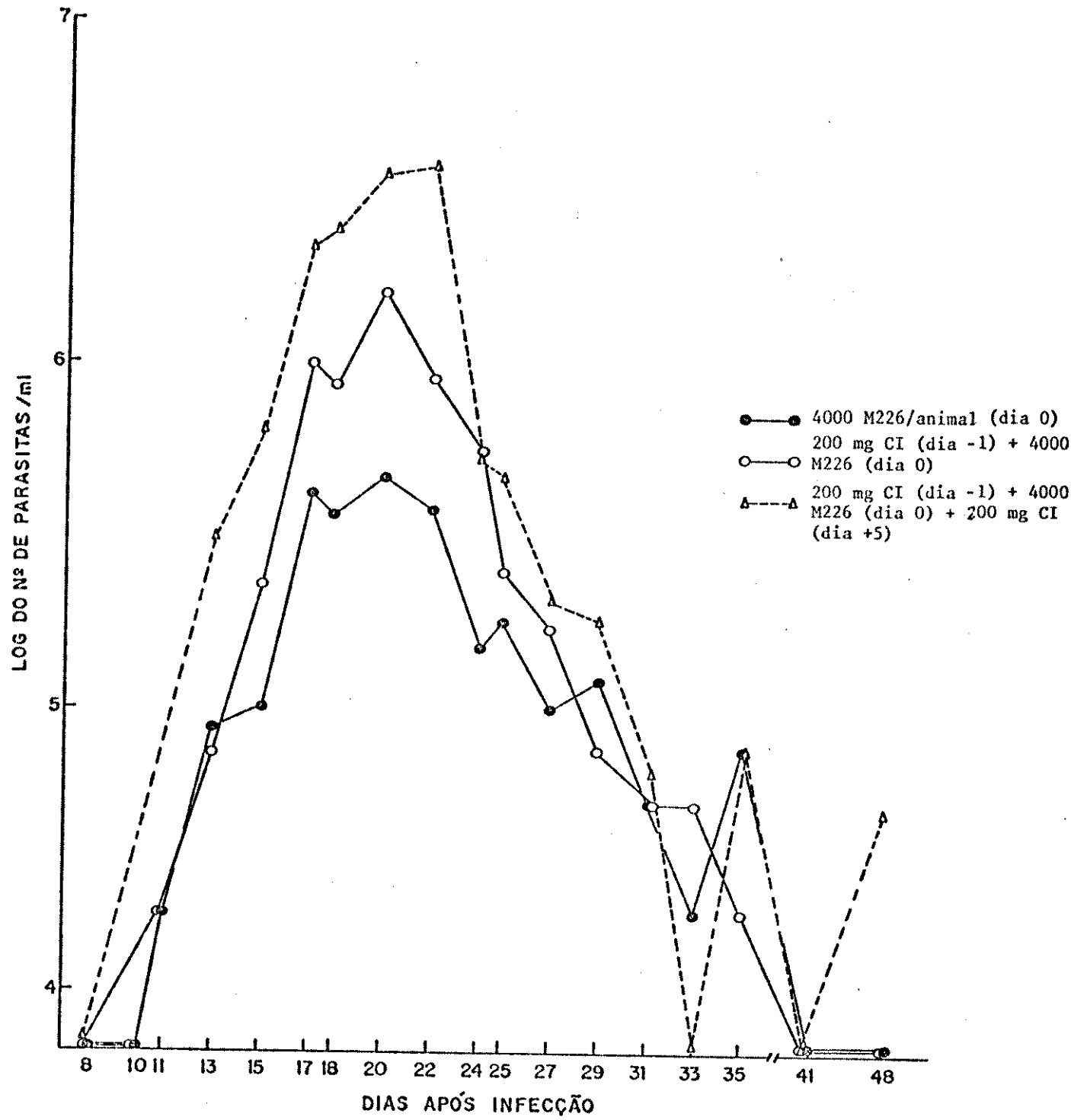


GRÁFICO 4 - Efeito de 200 mg/kg de Ciclofosfamida (CI) sobre a parasitemia de *C. callosus* inoculados com *T. cruzi*, cepa M226.

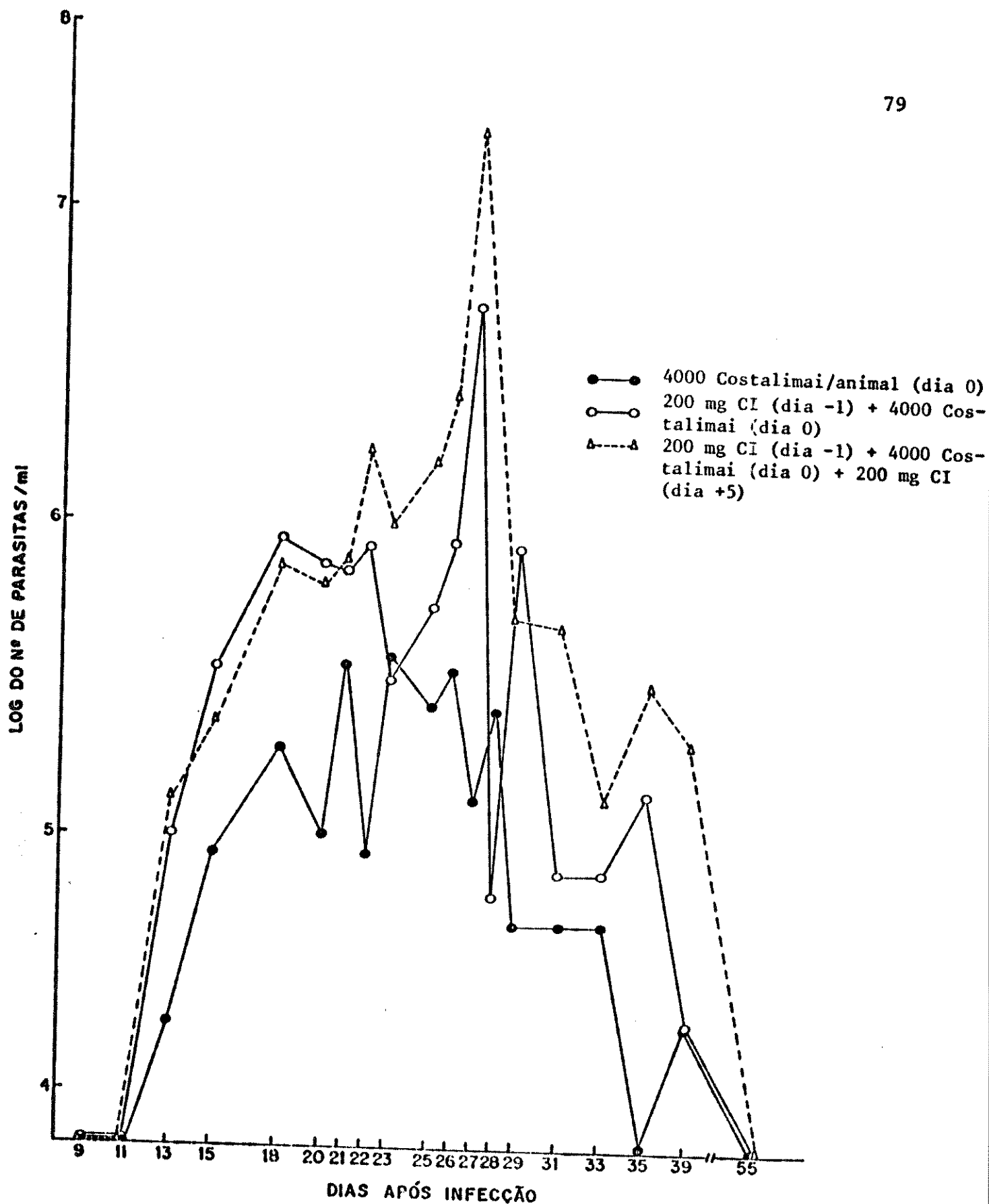


GRÁFICO 5 - Ação de 200 mg/kg de Ciclofosfamida (CI) sobre a parasitemia de *C. callosus* inoculados com *T. cruzi*, cepa Costalimai.

supressor e infectados, a taxa de mortalidade aumentou passando a ser de 10% e 15% para as cepas M226 e Costalimai.

Nos grupos não infectados porém tratados com uma dose de CI a mortalidade foi 0% em todos os grupos.

Quando os animais receberam uma segunda dose de CI a mortalidade aumentou para ambas as cepas, passando a ser de 33% para a M226 ($p < 0,001$) e 35% para Costalimai ($p < 0,01$).

Para os animais não infectados e imunossuprimidos com duas doses de CI, a mortalidade foi respectivamente de 0 para o grupo controle da M226 e 20% para o da Costalimai.

Quando se fez a análise estatística comparando os grupos infectados com a cepa Costalimai e imunossuprimidos com duas doses de 200 mg de CI com os apenas imunossuprimidos não foi possível observar diferença significativa quanto ao índice de mortalidade $p > 0,10$.

Com as três cepas de *T. cruzi* utilizadas o efeito de imunossupressão provocado pelo tratamento com altas doses de CI provocou aumento na quantidade de parasitas na circulação, sendo mais pronunciado para o cepa Y.

3.5 - TRANSFERÊNCIA PASSIVA DE SORO IMUNE

A transferência passiva de soro imune não di

luído, de cepa homóloga feita por via intraperitoneal 3 horas antes da inoculação com 4.000 parasitas Y, em animais imunossuprimidos com 200 mg/kg CI, dia -1, resultou em aparente proteção dos animais que receberam o soro imune (Gráfico 6), $p < 0,001$.

Houve uma redução da parasitemia e mortalidade destes animais em relação aos grupos controles imunossuprimidos que receberam ou não soro normal.

O grupo experimental (A) teve parasitemia e mortalidades bem inferiores aos grupos controles imunossuprimidos que receberam soro normal (C) ou só parasitas (D).

O pico de parasitemia entre estes grupos diferiu: no grupo experimental A ocorreu no 12º dia, enquanto nos controles C e D no 9º dia.

As mortalidades foram respectivamente de 10,34%, 72,4% e 35% (Tab. 3).

Observa-se que a mortalidade nos grupos imunossuprimidos que receberam soro normal antes dos parasitas foi superior aos grupos imunossuprimidos que receberam apenas parasitas. No entanto, a parasitemia entre estes grupos não diferiu significativamente.

Se compararmos os grupos não imunossuprimidos que receberam só parasitas (B) ou soro normal e parasitas (E) o nível de parasitas circulantes não diferem entre eles, nem as mortalidades que foram, respectivamente, de 9,52% e 4,76% (Tabela 3).

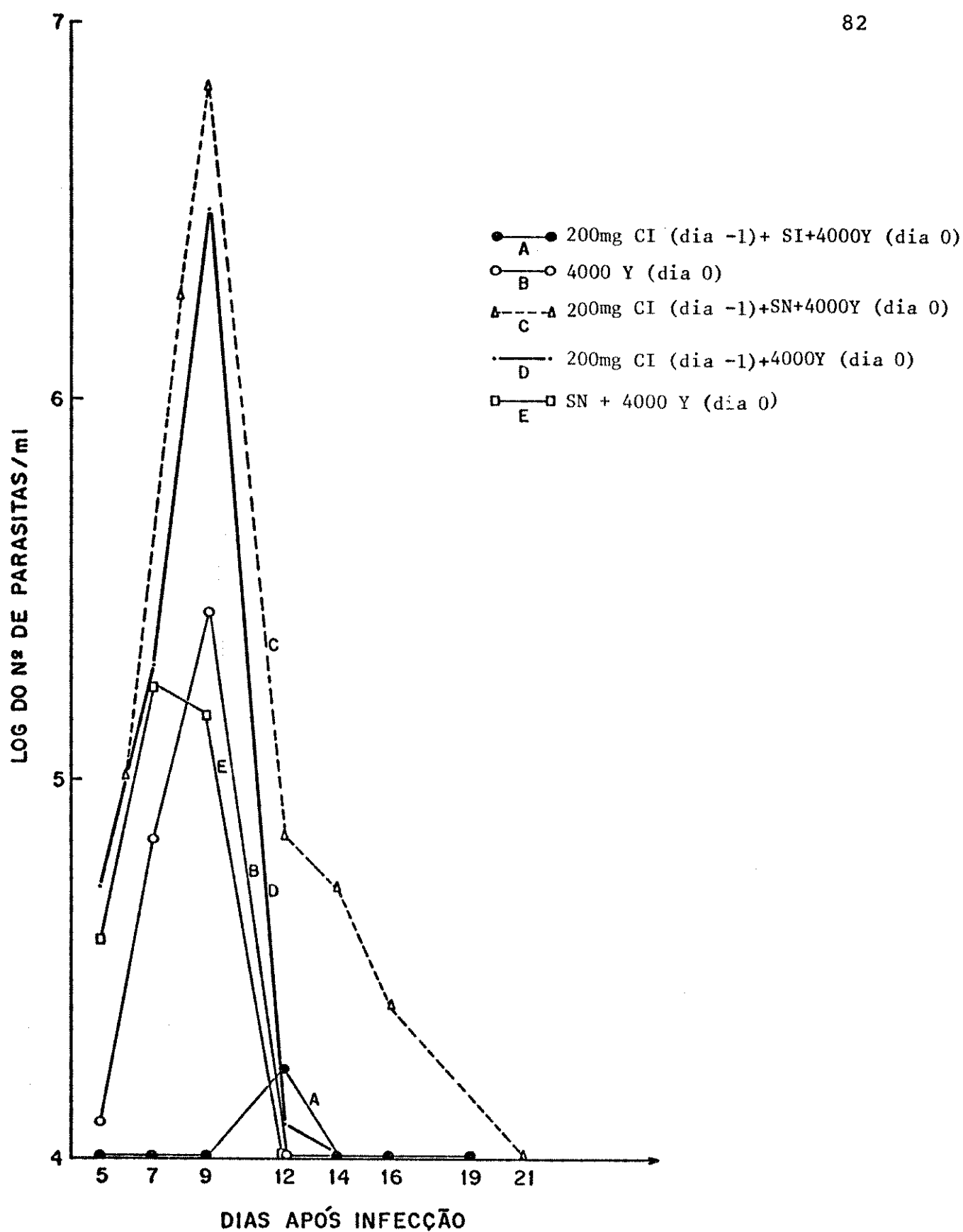


GRÁFICO 6 - Efeito da transferência passiva de soro imune na parasitemia de *C. callosus* imunossuprimidos e inoculados com *T. cruzi*, cepa Y.

TABELA 3 - Efeito da transferência passiva de soro imune na mortalidade de *C. callosus* imunossuprimidos.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	% MORTOS
A (CI + SI + 4000 Y)	10,34% (3/29)
B (4000 Y)	9,52% (2/21)
C (CI + SN + 4000 Y)	72,4% (21/29)
D (CI + 4000 Y)	35% (7/20)
E (SN + 4000 Y)	4,76% (1/21)

CI = 200 mg/kg (i.p.) dia -1
 SI = soro imune de *C. callosus* 3 horas antes da infecção.
 SN = soro normal de *C. callosus* 3 horas antes da infecção.
 (A = B = E) < D < C p < 0,001

4. DISCUSSÃO

A resposta imune de um animal sabidamente é um fenômeno complexo, envolvendo grande número de populações de células imunocompetentes (células T, B, Macrófago) e a interação entre elas tanto direta como através de seus produtos.

Esta resposta que é a principal responsável pela resistência à infecções e o controle das mesmas pode ser influenciada de várias maneiras, uma delas é o tratamento com drogas imunossupressoras.

A ciclofosfamida (CI) é um dos agentes alquilantes mais utilizados em trabalhos experimentais para modulação da resposta imune.

Esta droga atua sobre o DNA de células em processo de divisão celular (DEWYS et al. 1970, MOORHEAD et al. 1974) e pode também inibir vários processos enzimáticos necessários para formação do DNA (LAWLEY, 1954).

Alguns trabalhos experimentais mostram que a CY atua como imunossupressora da imunidade celular e humoral (TURK et al. 1972a,b e 1982, ASKENASE et al. 1975, YAMAGUCHI et al. 1978, COTTNEY et al. 1980, SHAND et al. 1980 e DRÖSSLER et al. 1981 e 1983).

Estes trabalhos mostram que a ação da CI depende da dose, esquema de tratamento e antígeno empregado.

Tratamento de diversas espécies animais com CI (camundongos, ratos, cobaias e hamsters) usando dose única entre 100 e 400 mg/kg é capaz de depletar áreas T dependentes e independentes nos órgãos linfóides (TURK et al. 1982, LOC et al. 1981, DUTHU et al. 1980).

A ação da CI pode então atuar sobre populações de célula T e B, sendo estas últimas mais sensíveis (POULTER et al. 1972, STOCKMAN et al. 1973, DUMONT 1974, TURK et al. 1975, WILLERS et al. 1975, HURME 1980, DRÖSSLER et al. 1983 e KUPPER et al. 1984).

A CI tem sido usada principalmente em laboratório para obter os mais diversos modelos experimentais tanto de imunidade celular como humoral.

Tenta-se construir modelos onde as respostas imunes possam ser alteradas de tal modo que se obtenha supressão ou facilitação destas.

Dentre estes, os mais estudados são aqueles que tentam correlacionar hipersensibilidade tardia e nível de anticorpo.

Usando diversas doses e esquemas de tratamento, alguns autores mostraram que altas doses de CI facilitam as reações de hipersensibilidade, enquanto os níveis de anticorpos não foram alterados nos animais imunossuprimidos (KERCKHAERT et al. 1977, COTTNEY et al. 1980, GIOVANNIELLO et al. 1983).

Usando baixa dose de CI, ASKENASE et al. 1975 e GILL et al. 1978 obtiveram o mesmo efeito.

KERCKHAERT et al. 1977 usando 100 mg CI obtiveram aumento de hipersensibilidade e de anticorpos anti-HC no 7º dia após imunização.

Todos estes dados sugerem existir populações de células T supressoras distintas para cada um dos mecanismos, e que estas diferem na sua sensibilidade à CI ou aos subprodutos, originários de sua metabolização.

Estes efeitos de facilitação de resposta humoral ou celular são atribuídos à destruição de subpopulações reguladoras ou precursoras de linfócitos T as quais provavelmente se originaram de células $Ly\ 1^+2^-$ que induziriam populações $Ly\ 1^+2^+$, as quais gerariam populações $Ly\ 1^-2^+$ responsáveis pela imunossupressão, a qual é bastante sensível mesmo a baixas doses de CI (KUPPER et al. 1984).

Vários autores têm conseguido demonstrar a diferença de suscetibilidade entre as populações de células T e B à ação da CI.

A célula B tem mostrado ser mais sensível a CI em relação à células T.

STOCKMAN et al. 1973, trabalhando com células de baço de animais tratados com 400 mg/kg CI mostrou diferença no efeito desta droga sobre células T e B, pois a recuperação da resposta ao mitógeno PHA (célula T) se dá

no 5º dia enquanto para PWM (célula B) ocorre no 14º dia.

DIAMANTSTEIN et al. 1979 mostraram que células de baço de camundongo pré-tratadas com 125 mg diferem na resposta *in vitro* aos mitógenos de célula B, DS (Dextran Sulfato) e LPS (lipolissacaride). A resposta ao primeiro mitógeno foi facilitada, ao contrário para o segundo foi reduzida em 50%.

As subpopulações de célula T também diferem na sensibilidade a CI.

As células T supressoras (T_S) parecem ser mais sensíveis em relação a T auxiliar (T_H), T para hipersensibilidade T_{DH} e T citotóxica (T_C) para aloantígenos, uma vez que baixas doses podem destruí-la ao contrário T_H e T_C requerem doses mais altas para sua destruição (ASKENASE et al. 1975, KERCKHAERT et al 1977, FERGUSON et al 1978, GILL et al. 1978 e SHAND et al 1980). Estudos neste sentido realizado por HURME et al. 1980, mostraram que camundongos CBA possuem células T_C 5-10 vezes mais resistentes a CI em relação ao C57BL/6.

DUMONT 1974 mostrou que as células B de camundongos tratados com 300 mg iniciam sua regeneração por volta do 16º dia e que esta se completa no 30º dia quando recuperam a capacidade de resposta ao LPS.

As células T mostraram-se mais resistentes iniciando a recuperação no 8º dia e no 30º dia após tratamento recuperaram-se completamente.

A resposta a Con A nestes experimentos não foi suprimida, mas apenas reduzida.

A mobilidade eletroforética destes células mostrou duas subpopulações de célula T com diferentes suscetibilidades ao tratamento com 300 mg de CI.

Estas diferenças de suscetibilidade não estão bem esclarecidas, sabendo-se apenas que dependem do tipo de antígeno e do esquema de tratamento utilizado.

Pelo exposto observa-se que a modulação da resposta imune mediada pela CI é bastante variável com resultados que dependem do modelo escolhido.

Nossa escolha de tratamento com CI foi de certo modo aleatória uma vez que nada se conhece sobre a ação desta droga em *C. callosus*.

Neste trabalho tentamos verificar o efeito de diferentes doses de CI (FIG. 1, 7 e Gráf. 3) sobre a resposta humoral destes animais silvestres para hemácias de carneiro (HC) e *T. cruzi* como início de caracterização deste modelo optamos por esta abordagem, pois devido ao fato de não possuímos animais isogênico até o momento, estudos mais específicos de imunidade celular tal como transferência de linfócitos não seriam possíveis.

O tratamento com altas doses de CI 200 e 400 mg provocou uma imunossupressão da resposta humoral para HC o que confirma os dados para outras espécies de animais

(STEWART & PETTY, 1972; WILLERS et al. 1975; PARKER & TURK 1978, COTTNEY et al. 1980) feitos com vários antígenos.

Os animais tratados com 400 mg de CI mostraram-se com aspecto doentio e a mortalidade destes foi superior ao grupo que recebeu 200 mg de CI, razão pela qual não utilizamos esta dose nos experimento com *T. cruzi*.

O tratamento com 20 e 100 mg não modificou significativamente o nível de anticorpos anti-HC (FIG. 1A e B) apesar de no 5º dia haver uma tendência de aumento para aqueles que receberam 20 mg antes do estímulo antigênico.

STEWART & PETTY (1972), ASKENASE et al (1975), PARKER & TURK (1978) e COTTNEY (1980) trabalhando com doses menores que 100 mg e com antígenos diversos observaram o mesmo, em outras espécies animais.

O nível de anticorpos dos grupos apenas estimulados foram sempre baixos comparando-se aos camundongos Biozzi mau produtores de anticorpos para HC (L/Se).

Analisando a ação desta mesma dose de CI sobre a resposta humoral para *T. cruzi* (FIG. 7A e B) observa-se o mesmo padrão de cinética de anticorpos com títulos semelhantes aos encontrados para HC.

Os animais tratados com 20 mg de CI mostraram títulos de anticorpos um pouco mais elevados em relação àqueles que receberam 100 mg tanto nos estimulados com

HC ($p < 0,001$) e com *T. cruzi* ($p < 0,05$).

Houve apenas um deslocamento no pico de anticorpos que foi no 5º dia após estímulo para o primeiro grupo (FIG. 1A e B) enquanto para o segundo ocorreu no 20º dia (FIG. 7A e B).

Esta diferença quanto ao tempo de aparecimento de anticorpos entre os dois grupos experimentais é justificada pela natureza do antígeno, uma vez que o primeiro é rapidamente metabolizado, desaparecendo da circulação, enquanto o segundo é um protozoário intracelular que permanece na circulação, multiplica-se em células, e repõe na circulação a cada novo ciclo, parasitas eventualmente destruídos além de ter composição antigênica diversa de HC.

Os clones de célula B que respondem para um dado antígeno também podem diferir daqueles que são estimulados por outro de composição diversa e estes clones podem apresentar suscetibilidades diferentes ao tratamento por CI (DRÖSSLER et al. 1981 e 1983).

Quanto à ação destas diferentes doses de CI sobre a parasitemia de animais inoculados com cepa Y, (Graf. 1) o número de parasitas circulantes foi sempre maior para os animais com resposta humoral imunossuprimida (200 mg). Os grupos tratados com 20 mg mostraram aumento do número de parasitas em relação ao grupo controle, porém numericamente pouco expressivo.

Apesar desta dose de CI aparentemente não ter

agido significativamente sobre os mecanismos que controlam a produção de anticorpos é possível que esta tenha interferido em outros elementos (subpopulações de células B, seus subprodutos ou de outras células) que auxiliam o controle da resposta imune na destruição de parasitas permitindo aumento de parasitemia.

A reconstituição das funções de célula B nos grupos tratados com alta dose de CI (200 mg), coincide com os dados obtidos "in vitro" por DUMONT (1974) e STOCKMAN et al. (1973) onde esta iniciou-se entre 14º-16º dia e se recuperou entre 21-30 dias após estímulo com LPS, ConA, KLH (Keyhole lympet hemocyanin).

Sobre o efeito de duas doses de CI (20, 100 e 200 mg) na resposta humoral para HC supomos que a segunda dose de 100 ou 200 mg tenha atuado sobre outras populações celulares além de T_S , provavelmente célula B destruindo-a e impedindo a formação de anticorpos anti-HC, provocando uma imunossupressão desta resposta (FIG. 2 e 3).

O tratamento com 20 mg (FIG.4) provavelmente não foi capaz de agir sobre as populações de células que controlam a resposta humoral mesmo após a segunda dose.

O tempo em que perdura a ação desta droga no organismo foi proporcional à concentração de CI utilizada, sendo mais prolongada para 200 mg, o que provavelmente de-

ve estar relacionado com a maior dificuldade em reparar o DNA, devido à alta concentração de CI (FIGS. 5B e 6B).

Quanto aos grupos tratados com uma ou duas doses de 200 mg de CI e inoculados com *T. cruzi*, a redução do nível de anticorpos (FIG. 7A e B) facilitou o aumento de parasitemia sendo o efeito proporcional ao tipo de tratamento. Os animais tratados com duas doses de 200 mg controlaram menos a infecção.

Esta dose de CI certamente pode ter interferido também sobre a imunidade celular modificando ainda mais os mecanismos de resistência do animal, dado este confirmado pelo aumento de mortalidade (Tabela 2).

Este efeito de 200 mg também foi observado para cepas M226 e Costalimai. Apesar de não termos explorado a resposta humoral destes animais, pode se inferir por analogia que os mesmos mecanismos eventualmente foram envolvidos.

A influência da resposta imune sobre o curso de doença nos grupos tratados com 20 mg não pode ser excluída pois apesar da parasitemia nos animais tratados com esta dose ser superior ao grupo controle (Gráf. 2) a

mortalidade foi menor (Tab. 1).

A importância de anticorpos foi confirmada quando animais imunossuprimidos, os quais receberam passivamente soro imune antes da infecção (A) tiveram parasitemia inferior aos grupos controles B, C, D e E (Gráf. 6).

Os mecanismos de ação dos anticorpos podem ser vários, já tendo sido descrita a ADCC, via receptor em macrófago ou mesmo lise mediada por complemento.

O fato do grupo imunossuprimido e infectado (C) que recebeu soro normal ter mortalidade superior ao grupo imunossuprimido que recebeu apenas parasitas é um dado a ser esclarecido (Tab. 3).

Os antisoros, além de anticorpos, podem conter fatores biologicamente ativos que podem interferir com a resposta imune.

Por exemplo, KATZ et al. 1985 demonstraram a presença de um fator em soro normal humano e de algumas espécies animais provavelmente liberado por plaquetas, o qual foi capaz de reverter a imunossupressão produzida em camundongos pela infecção de células de linfoma irradiado, em resposta a HC, sugerindo a presença de mais um produto celular a interferir em experiências com transferência passiva de soro normal.

Em nosso trabalho não foi possível definir a origem deste aumento de mortalidade em animais imunossupri

midos que receberam soro normal antes da infecção.

Os níveis de anticorpos aglutinantes tanto para *T. cruzi* (cepa Y) como HC foram sempre muito baixos.

Como nada se conhece sobre mecanismos imunológicos desenvolvidos por este animal durante a infecção por *T. cruzi* é difícil inferir se o baixo nível de anticorpos esta relacionado com a produção de substância supressora.

A presença desta substância tem sido descrita por vários autores para antígenos heterólogos (CUNNINGHAM et al. 1978, KIERSZENBAUM & GHARPURE, 1983)

Alguma sugestão sobre a participação de fenômenos imunossupressores em *C. callosus* fica difícil sem o conhecimento de seus mecanismos imunes.

Finalmente queremos assinalar que a análise de todos os nossos dados foi baseada na mediana, uma vez que esta abordagem pareceu-nos representar a mais fiel ao obtido experimentalmente. Por serem os animais utilizados não isogênicos, estes terminam por nos dar uma amostra de dados bastante assimétrica, devido à grande variação individual.

A grande maioria dos autores quando trabalham principalmente com parasitemias obtém média com desvio padrão muito elevado, demonstrando com isto uma grande

diversidade de resposta entre os animais utilizados.

Os valores muito altos obtidos, quando utilizados no cálculo da média aritmética terminam por distorcer os resultados, provocando às vezes interpretações não muito fiéis ao obtido experimentalmente, pois terminam arrastando a média a valores elevados.

SOGAYAR (1985) fazendo um estudo comparativo entre os diversos métodos utilizados para avaliar a parasitemia (média, mediana, moda) sugeriu que a média só tem valor como tendência central se a distribuição de medidas tender a ser simétrica com desvio padrão baixo, caso contrário, se a distribuição dos dados é assimétrica a associação da mediana ao percentis 25% e 75% é mais representativa na análise dos dados, uma vez que representam um parâmetro de tendência central sendo portanto mais fiel ao ocorrido experimentalmente.

A apresentação gráfica destes valores, nem sempre permite uma visualização completa dos dados. Assim, foram incluídas também, sempre que pertinentes, as distribuições dos dados individuais (Figs. 1A, 5A, 7A, 8A).

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Investigamos se a resistência relativa do *C. callosus*, reservatório silvestre do *T. cruzi* à infecção chagásica, é mediada por mecanismos imunológicos.

Animais de ambos sexos com peso entre 18-24 g e idade de 30-40 dias foram inoculados dia 0, +5 ou +10 (via intraperitoneal, i.p.) com 5×10^8 hemácias de carneiro (HC)/animal e estimulados com várias doses de ciclofosfamida (CI) dia -1 ou -1 e +5, para estabelecer um modelo de resposta humoral facilitada ou diminuída, o qual foi usado nas infecções por *T. cruzi* para avaliar o papel da resposta humoral no controle desta infecção.

Grupos de animais imunossuprimidos ou não receberam dia 0 4000 parasitas/animal das cepas humanas Y ou silvestre M226 e Costalimai.

Acompanhamos a cinética de produção de anticorpos através do teste de aglutinação direta de tripomastigotas, correlacionando-a com o número de parasitas circulante nos grupos inoculados com a cepa Y. Naqueles, inoculados com as cepas silvestres, somente a parasite-mia foi acompanhada.

A participação da resposta humoral foi também avaliada através da transferência passiva de soro imune em animais imunossuprimidos e infectados.

Nas experiências com hemácias de carneiro

camundongos Biozzi High (H/Se) e Biozzi Low (L/Se) seleção III, foram usados como testemunho.

Obtivemos as seguintes conclusões:

1. A administração de diversas doses de CI (20, 100, 200 e 400 mg/kg) sobre a resposta humoral para HC mostrou que 200 e 400 mg/kg de CI dada dia -1 em animais estimulados dia 0 com HC foi a dose imunossupressora da resposta humoral, sendo que 200 mg exerce seu efeito imunossupressor até o 9º dia. Uma segunda dose dada no dia +5 após o estímulo é capaz de prolongar seu efeito por tempo maior.
2. Doses de 20 e 100 mg de CI administradas no dia -1 em animais estimulados dia 0 com HC produziram facilitação da resposta humoral para este antígeno apenas no 5º dia; nos dias subsequentes não houve diferença significativa entre estes grupos e o controle. Uma segunda dose de 20 mg dada dia +5 após o estímulo não provocou aumento de anticorpo, ao contrário do obtido por 100 mg de CI que produziu efeito imunossupressor semelhante a 200 mg.
O efeito da ação de 20 mg é menor que 5 dias, uma vez que não há facilitação de resposta homoral para HC em relação ao grupo controle, quando o estímulo é administrado no dia +5.

3. Quanto ao nível de anticorpos anti-hemácias de carneiro, o *C. callosus* mostrou resposta mais próxima aos camundongos Biozzi mau produtor de anticorpos (L/Se).
 4. O mesmo efeito sobre a resposta humoral para HC foi obtido para infecções com *T. cruzi* e concluímos que 200 e 20 mg/kg de CI quando dadas dia -1 em animais infectados dia 0 produz os efeitos obtidos anteriormente de imunossupressão e não facilitação de resposta humoral.
 5. O tratamento com 200 mg de CI antes da infecção permitiu um aumento de parasitemia e mortalidade superior aos grupos só infectados. Este efeito foi maior nos animais que receberam tratamento com duas doses de CI (dia -1 e +5). Isto para todas as três cepas de *T. cruzi* estudadas.
 6. 20 mg de CI administrada no mesmo esquema do item anterior não facilitou a resposta humoral ao *T. cruzi*. Uma segunda dose dia +5 após a infecção, não reverteu este efeito.
- O tratamento destes animais com uma e duas doses de 20 mg provocou aumento da parasitemia sendo esta superior ao grupo só infectado. A mortalidade nos grupos tratados com esta dose foi menor que a do controle.

7. A transferência passiva de soro imune antes da infecção com cepa Y para animais imunossuprimidos foi capaz de protegê-los, tendo estes apresentado mortalidade e parasitemia inferior dos grupos controles.

Portanto, a participação da resposta humoral parece ser um dos fatores responsáveis pela resistência parcial do *C. callosus* ao *T. cruzi*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARA, A. & BRENER, Z. 1978 - The in vitro interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. *Acta Trop.* 35 : 209.
- ALMEIDA, C.R. 1973 - Relatório das Pesquisas do Plano de Peste de Exu. Centro de Pesq. Ag. Magalhães, Ministério da Saúde.
- AMATO NETO, V.; MAGALDI, C. & PESSOA, S.B. 1964 - Intradermoreação para diagnóstico de doença de Chagas com antígeno de *Trypanosoma cruzi* obtido de cultura de tecido. *Rev. Goiana Med.* 10: 121-126.
- ANDRADE, S.G. 1978 - Possibilidade de incorporação de proteínas do hospedeiro pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 20: 279.
- ANDRADE, Z.A. & ANDRADE, S.G. 1980 - A patologia da doença de Chagas experimental no cão. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 75(3-4): 77-95.
- ANSELM, A.; PIFANO, F.; SUARES, J.A. & GURDIEL, O. 1966 - Myocardiopathy in Chagas' disease. I. Comparative study of pathologic findings in chronic human and experimental Chagas' myocarditis. *Amer. Heart. J.* 72: 469-481.
- ASKENASE, P.W.; HAYDEN, B.J. & GERSHON, R.K. 1975. Augmentation of delayed type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide which do not affect antibody responses. *J. Exp. Med.* 141: 697-701.

- BARRETO, M.P. 1964 - Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* nas Américas. Rev. Bras. Malar. Doenç. Trop. 16: 527-552.
- BARRETO, M.P. 1965 - Tripanossomos semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da Doença de Chagas. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 7(5): 305-315.
- BARRETO, M.P. 1967 - Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXII Modificação dos focos naturais da tripanossomose americana e suas consequências. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1(4): 167-173.
- BARRETO, M.P. & RIBEIRO, R.D. 1979 - Reservatórios silvestres do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, Chagas, 1909. Rev. Inst. Adolfo Lutz 39(1): 25-36.
- BARRETO, M.P.; SIQUEIRA, A.F.; CORRÊA, M.A.; FERRIOLLI FILHO, F. & CARVALHEIRO, J.R. 1964 - Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. VII. Investigações sobre a infecção natural de gambá por tripanossomos semelhantes ao *Trypanosoma cruzi*. Rev. Brasil. Biol. 24: 289-300.
- BASSO, B.; ERASO, A.J.; MORETTI, E.R.; ALBESA, I. & KRAVETZ, F.O. 1977 - Infección natural de *Calomys musculinus* (Rodentia, Cricetidae) por *Trypanosoma cruzi*. Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 9: 11-16.
- BORDA, C.E. 1972 - Infecção natural e experimental de alguns roedores pelo *Schistosoma mansoni*, Sambon 1907. Tese Inst. Ciênc. Biol. Univ. Fed. M. Gerais.

- BORGES, M.M. & MELLO, D.A. 1980 - Infectividade de cepas silvestres de *Trypanosoma cruzi* mantidas em cultura para *Calomys callosus* (Rodentia) e camundongos albinos. Rev. Patol. Trop. 9: 145-151.
- BORGES, M.M.; MELLO, D.A. & TEIXEIRA, M.L. 1982 - Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) com *Trypanosoma cruzi*. Rev. Saúde Públ. S.Paulo 16: 233-242.
- BRAY, M.A. 1977 - Cell mediated immunity during experimental Chagas'disease in guinea-pigs and rabbits. Proc. 5th Int. Congr., Protozool. Abst. 65. 1977.
- BRENER, Z. 1962 - Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo 4: 389-396.
- BRENER, Z. 1965 - Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. Ann. trop. Med. Parasit. 59: 19-26.
- BRENER, Z. & CHIARI, E. 1971 - The effects of some immunosuppressive agents in experimental chronic Chagas'disease. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 65: 629-636.
- BUDZKO, D.B.; PIZZIMENTI, M.C. & KIERSZENBAUM, F. 1975 - Effects of complement depletion in experimental Chagas'disease: immune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. Infec. Immun. 11: 86-91.
- BRUMPT, E. 1913 - Immunité partielle dans les infections à *Trypanosoma cruzi*, transmission de ce trypanosome par *Cimex rotundatus*. Rôle régulateur des hôtes intermédiaires. Passage a travers la peau. Bul. Soc. Path. Exot. 6: 172-176

- BURGESS, D.E. & HANSON, W.L. 1980 - *Trypanosoma cruzi*: the T cell dependence of the primary immune response and the effects of depletion of T cells and Ig-bearing cells on immunological memory. *Cell. Immunol.* 52:176.
- CAMARGO, M.E. & AMATO NETO, V. 1974 - Anti *Trypanosoma cruzi* antibodies as serological evidence of recent infection. *Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo* 16: 200-202.
- CANÇADO, J.R.; SALGADO, A.A.; BATISTA, S.M. & CHIARI, C. A. 1979 - Specific treatment of human Chagas'disease. Congr. Intern. sobre Doença de Chagas. Rio de Janeiro. 2-7.
- CASTELO BRANCO, A.Z.C.L. 1978 - Proteção mediada por imunoglobulina G em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Tese Univ. Fed. Minas Gerais, 79 pp.
- CERISOLA, J.A. 1977 - Chemotherapy of Chagas'disease. In *Infection in man: em Chagas'disease* PHO Scientific. Publ. 347: 35-47.
- CHAGAS, C. 1912 - Sobre um tripanosoma do tatu *Tatusia novemcincta*, transmitido pelo *Triatoma geniculata* (Latr. 1811). *Brazil Med.* 26:305-306.
- CHAGAS, C. 1918 - Host of the *Trypanosoma cruzi*. *Rev.Med. Cir. Brazil* 26: 220-223.
- CHAGAS, C. 1924 - Sobre a verificação do *Trypanosoma cruzi* em macacos no Pará (*Chyzothrrix sciureus*) *Sci. Med.* 2: 75-76.

- CLARK, H.C. & DUNN, L.H. 1932 - Experimental studies on Chagas'disease in Panamá. *Am. J. Trop. Med.* 12: 49-77.
- CORSINI, A.C.; COSTA, M.G.; OLIVEIRA, O.L.P.; CAMARGO, I. J.B.; STELINI, A. 1980b - Susceptibility of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* strain Y. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 22: 192-196.
- CORSINI, A.C.; OLIVEIRA, O.L.P. & COSTA, M.G. 1980a - Unimpaired delayed type hypersensitivity reaction in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strain Y. *Z. Parasitenkd* 61: 179-185.
- CORSINI, A.C. & STELINI, J.R. 1981 - Immune T cells control *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp.* 37: 904-906.
- COTTNEY, J.; BRUIN, J. & LEWIS, A. 1980 - Modulation of the immune system in the mouse 1. Drug administration prior to antigen sensitization. *Ag. Act.* 10(4): 378-388.
- CULBERTSON, J.T. & KOLODNY, M.H. 1938 - Acquired immunity in rats against *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 24: 83-90.
- CUNNINGHAM, D.S.; KUHN, R. & ROWLAND, E.C. 1978. Suppression of humoral responses during *Trypanosoma cruzi* infections in mice. *Infect. Immun.* 22(1): 155-160.
- DALMASSO, A.P. & JARVIMEN, J.A. 1980 - Experimental Chagas'disease in complement deficient mice and guinea pigs. *Inf. Immunol.* 28:434-440.
- DEANE, L.M. & DEANE, M.P. 1957 - Nota sobre transmissores e reservatórios do *Trypanosoma cruzi* no noroeste do Estado do Ceará. *Rev. Bras. Malariol. Doenç. Trop.* 9: 77-595.

- DEANE, L.M. 1958 - Novo hospedeiro do tripanosoma do tipo cruzi e rangeli encontrado no Estado do Pará: O marsupial *Metachirops opossum opossum*. Rev. Bras. Malar. Doenç. Trop. 4: 531-541.
- DEANE, L.M. 1964 - Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. Rev. Malar. Doenç. Trop. 16: 27-48.
- DEANE, M.P.; JANSEN, A.M. & MANGIA, R.H.R. 1983 - Experimental infection of the opossum *Didelphis marsupialis* with different strains of *Trypanosoma cruzi*. 10a. Reunião Anual em Pesquisa Básica sobre Doença de Chagas. Caxambú, Brasil Abs. BI-24.
- DEANE, M.P.; LENZI, H.L. & JANSEN, A. 1984 - *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host the opossum *Didelphis marsupialis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79(4): 513-515.
- DEWYS, W.D.; GOLDIN, A. & MANTEL, N. 1970 - Haemopoietic recovery after cyclophosphamide: correlation of proliferative state with sensitivity. Cancer Res. 30:1962-1967.
- DIAS, E. 1933 - Immunité naturelle des animaux à sang froid vis-à-vis de l'infection par le *Trypanosoma cruzi*. Compt. R. Soc. de Biol. 112: 1474-1475.
- DIAS, E. 1935 - Revisão geral dos hemoflagelados dos Chiropteros. Estudo experimental do *Schizotrypanum* de *Phyllostomus hastatus*: identidade com o *Schizotrypanum cruzi*. O grupo vespetilionis. 9a. Reunion Soc. Arg. Patol. Reg. Norte 1: 10-88.

- DIAMANTSTEIN, T.; WILLINGER, E. & REIMAN, J. 1979 - T-suppressor cells sensitive to cyclophosphamide and to its in vitro active derivative 4-hydroperoxycyclophosphamide control the mitogenic response of murine splenic B cells to Dextran sulfate. *J. Exp. Med.* 150:1571-1576.
- DIÁZ-VÁSQUEZ, A. 1960 - Consideraciones epidemiológicas de la enfermedad de Chagas. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasit. Méd.* 3: 187-201.
- DRÖSSLER, K.; KLIMA, F. & AMBROSIUS, H. 1981 - The influence of cyclophosphamide and 6 mercaptopurine on the IgG, and IgG₂ immune response in guinea-pigs. *Immunol.* 44: 61-66.
- DRÖSSLER, K.; PARKER, D. & TURK, J.L. 1983 - The influence of a single dose of cyclophosphamide on the Kinetics of antibody production in the guinea pig. *Int. J. Immunopharmac.* 5(4): 323-327.
- DUMONT, F. 1974 - Destruction and regeneration of lymphocyte populations in the mouse spleen after cyclophosphamide treatment. *Int. Arch. Allergy* 47: 110:123.
- DUTHU, A.; LE GOFFIC, N.; LOISILLIER, F. & VAUX SAINT-CYR de C. 1980 - Cyclophosphamide induction of splenic suppressor cells in hamsters. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*. 131C:125-202.
- ESPINOSA, L.A. 1955 - Epidemiologia de la enfermedad de Chagas en La República del Ecuador. *Rev. Ecuat. Hig. Med. Trop.* 12: 25-105.

- FERGUSON, R.M. & SIMMONS, R.L. 1978 - Differential cyclophosphamide sensitivity of suppressor and cytotoxic cell precursors. *Transplant.* 25(1): 36-38.
- FERRIOLLI FILHO, F. & BARRETO, M.P. 1965 - Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. IX. Infecção natural do *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) por tripanossoma semelhante ao *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo* 71:169-179.
- FRANCO, M.F. 1972 - Cardite experimental da cobaia pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. Correlação entre a histopatologia e a presença de antígenos parasitários identificados por imunofluorescência indireta. Tese. Botucatu. São Paulo.
- GILL, H.K. & LIEW, F.Y. 1978 - Regulation of delayed type hypersensitivity. III. Effect of cyclophosphamide on the suppressor cell for delayed-type hypersensitivity to sheep erythrocytes in mice. *Eur. J. Immunol.* 8: 172-176.
- GIOVANNIELLO, O.A.; BARRIOS, H.A.; RONDINONE, S.N. & NOTTA, N.R. 1983 - Modificaciones inducidas por ciclofosfamida en la respuesta inmune del raton hacia rojos de carnero. *Medicina (Buenos Aires)* 43:301-307.
- GONZALES-CAPPA, S.M.; SCHMUNIS, G.A.; TRAVERSA, O.C.; YANOVSKY, J.F. & PARODI, A.S. 1968 - Complement fixation tests: skin tests and experimental immunization with antigens of *Trypanosoma cruzi* prepared under pressure. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 17: 709-715.
- HANSON, W.L. 1977 - Immune response and mechanisms of re

- sistance in *Trypanosoma cruzi*. Pan American Health Organization Scientific Publication 347: 22-34.
- HAUSCHKA, T.S.; GODWIN, N.B.; PALMQUIST, J. & BROWN, E. 1950 - Immunological relationship between seven strains of *Trypanosoma cruzi* and its application in the diagnosis of Chagas'disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 30:1-16.
- HERSHKOVITZ, P. 1962 - Evolution of neotropical cricetinae rodents (Muridae) with special reference to the Phyllotine group. Fieldiana Zool. 46: 1-524.
- HERSHKOVITZ, P. 1969 - The evolution of mammals of the neotropical region. A zoogeographic and ecological review. Quart. Rev. Biol. 44: 1-70.
- HOFF, R. 1975 - Killing in vitro of *Trypanosoma cruzi* by macrophages from mice immunised with *Trypanosoma cruzi* of BCG and absence of cross-immunity on challenge in vivo. J. Exp. Med. 142: 299.
- HURME, M.; BANG, B.E. & SIHVOLA, M. 1980 - Genetic differences in the cyclophosphamide - induce immune suppression: weaker suppression of T cell cytotoxicity by cyclophosphamide activated by CBA mice. Clin.Immunol.Immunopathol. 17: 38-42.
- JOHNSON, K.M.; MACKENZIE, R.B.; WEBB, P.A. & KUNS, M.L. 1975 - Chronic infection of rodents by machupo virus. Sci. 150: 1618-1619.
- JUSTINES, G. & JOHNSON, K.M. 1969 - Immune tolerance in *Calomys callosus* infected with machupo virus. Nature 222: 1090-1091.

- JUSTINES, G. & JOHNSON, K.M. 1970 - Observation on laboratory breeding of the Cricitinae rodent *Calomys callosus*. Lab. Anim. Care 20: 57-60.
- KAGAN, I.G. & NORMAN, L. 1961 - Immunologic studies of *Trypanosoma cruzi*. III. Duration of acquired immunity in mice initially infected with a North American strain of *Trypanosoma cruzi*. J. Infect. Dis. 108: 213-217.
- KAGAN, I.G. & NORMAN, L. 1982 - Immunologic studies of *Trypanosoma cruzi*. IV. Serial transfer of *Trypanosoma cruzi* organisms from immune to non immune mice. J. Parasitol. 48: 584-588.
- KARINI, Y.; ALMEIDA, C.R. & PETTER, F. 1976 - Note sur les Rongeurs du nord-est du Br sil. Mammalia 40: 258-266.
- KATZ, I.R.; HOFFMANN, M.K.; ZUCKER, M.B.; BELL, M.K. & THORBECKE, J. 1985 - A platelet-derived immunoregulatory serum factor with T cell affinity. J. Immunol. 134(5): 3199-3203.
- KERCKHAERT, J.A.; HOFHUIS, F.M. & WILLERS, J.M. 1977 - Effects of variation in time and dose of cyclophosphamide infection on delayed hypersensitivity and antibody formation. Cell. Immunol. 29:232-237.
- KIERSZENBAUM, F.; KNECHT, E.; BUDZKO, D.B & PIZZIMENT, M. C. 1974. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. 112: 1839-1844

- KIERSZENBAUM, F. & HOWARD, J.G. 1976 - Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. J. Immunol. 116: 1208-1211.
- KIERSZENBAUM, F.; IVANY, J. & BUDZKO, D. 1976 - Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. Immunol. 30: 1-6.
- KIERSZENBAUM, F. & PIENKOWSKI, M.M. 1979 - Thymus dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. Infect. Immunol. 24: 117.
- KIERSZENBAUM, F. & GHARPURI, H.M. 1983 - Killing of circulating forms of *Trypanosoma cruzi* by lymphoid cells from acutely and chronically infected mice. Inter.J.Parasitol. 13(4): 377-381.
- KIPNIS, T.L.; CALICH, V.L.G. & DA SILVA, W.D. 1979 - Active entry of blood stream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. Parasit. 78:89.
- KIPNIS, T.L.; MINÓPRIO, P.O.; LUQUETTI, A.O.; RASSI, A. & DIAS DA SILVA, W. 1983 - Estudos imunológicos de estoques de *Trypanosoma cruzi* isolados de pacientes na fase aguda da Doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 16(4):175-183.
- KLOETZEL, J.K. & DEANE, M.P. 1977 - Presence of immunoglobulins on the surface of bloodstream *Trypanosoma cruzi*. Capping during differentiation in culture. Rev. Invest.Med. Trop. S.Paulo 19: 397-402.
- KRCO, C.K. & DAVID, C.S. 1981 - Genetics of immune response: A survey. Critical Reviews in Immunol. 1(3):211.

- KRETTLI, A.U. 1979 - Aspectos imunológicos da doença de Chagas. *Ciência e Cultura* 31(Supl): 119-132.
- KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. 1976 - Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 116: 755.
- KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. 1982 - Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* 128: 2009-2012.
- KRETTLI, A.U.; CARRINGTON, P.W. & NUSSENZWEIG, R.S. 1979 - Membrane bound antibodies of bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice. Strain differences in susceptibility to complement mediated lysis. *Clin. Exp. Immunol.* 37: 416-423.
- KRETTLI, A.U. & LIMA PEREIRA, F.E. 1981 - Immunosuppression in Protozoal infections: in *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. M. Lezandovski Y S.H. Hunter. Ed. (New York, Academic Press) 4: 431-461.
- KRETTLI, A.U. & NUSSENZWEIG, R.S. 1977 - Presence of immunoglobulins on the surface of circulating trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* resulting in activation of the alternative pathway of complement and lysis. Washington, D.C., USA; PAHO Scientific Publ. 347: 71-73.
- KUHN, R.E. & DURUM, S.K. 1975 - The onset of immune protection in acute experimental Chagas'disease in C_3H (HE) mice. *Inter. J. Parasitol.* 5: 241-244.

- KUHN, R.E. & MURNANE, J.E. 1977 - *Trypanosoma cruzi*: immune destruction of parasitized mice fibroblasts in vi-
tro. Exp. Parasitol. 41: 66.
- KUMAR, R.; KLINE, I.K & ABELMANN, W.J. 1970 - Immunossup
pression in experimental acute and subacute chagasic
miocarditis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 932.
- KUPPER, T.S.; GREEN, D.R.; CHAUDRY, T.H.; FOX, A. & BAUE, A.E.
1984 - A cyclophosphamide-sensitive suppression T cell circuit in
duced by thermal injury. Surgery 95(6): 699-705.
- LAWLEY, P.D. 1954 - The relative reactivities of deoxyribonucleoti-
des and the bases of DNA towards alkylating agents. Biochem Bio-
phys Acta 26: 450-451.
- LELCHUK, R.A.; PATRUCCO, A. & MANNI, J.A. 1974 - Studies of cellu-
lar immunity in Chagas'disease: effect of glutaraldehyde - trea-
ted specific antigen on inhibition of leukocyte migration. J.
Immunol. 112: 1578-1581.
- LEME, M.V.S. & COLLARES, E.F. 1962 - Estudos sobre a suscetibilida
de de ratos brancos a uma amostra de *Trypanosoma cruzi* altamente
virulenta para camundongo (amostra Y). Medicina Ribeirão Preto 1:
109-111.
- LOC, N.K.; OLÁH, I.; TAKÁCS, L.; KITTNER, Z. & TÓRO, I. 1981 -
Effect of cyclophosphamide on the rat thymus. Acta Morphologica
Acad. Sci. Hung. 29(4): 319-333.
- MADEIRA, E.D.; ANDRADE, A.F.B.; BUNN-MORENO, M.M. & BARCINSKI, M.
1979 - Antibody-dependent cellular cytotoxicity of *Trypanosoma*
cruzi: characterization of the effector cell from normal human
blood. Infect. Immunol. 25: 34.
- MARINKELLE, C.J. 1966 - Observations on human, monkey and bat trypano-
somes and their vectors in Colombia. Trans.Roy.Soc.Trop.Med. Hyg.
60: 109-116.

- MARSDEN, P.D. 1967a - *Trypanosoma cruzi* infection in CFI mice. I. Mortality with different doses of trypanosomes. An. Trop. Med. Parasitol. 61: 57-61.
- MARSDEN, P.D. 1967b - *Trypanosoma cruzi* infection in CFI mice. II. Infection induced by different routes. An. Trop. Med. Parasitol. 61: 62-67.
- MARSDEN, P.D. 1969 - *Trypanosoma cruzi* infection. III. The capability of flagellates obtained from two sources (bug feces and mouse blood) to induce patent infection on perconjuntival instillation. An. Trop. Med. Parasitol. 63: 309-311.
- MARSDEN, P.D. & HAGSTROM, J.W.C. 1968 - Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in beagle puppie. The effect of variation in the dose and source of infecting trypanosomes and the route of inoculation on the course of the infection. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 62: 816-824.
- MARSDEN, P.D.; VOLLER, A.; SEAN, S.K.K.; HAWKEY, C. & GREEN, D. 1970 - Behavior of a Peru strain of *Trypanosoma cruzi* in rhesus monkeys. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 4: 177-182.
- MARTINS, M.V.C.L.; SANCHEZ, G.P.; KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. 1982 - Antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) with sera from mice chronically infected or immunized with *Trypanosoma cruzi*. IX Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambú, Minas Gerais. Brasil.
- MASSOIA, E. & FORMES, A. 1965 - Nuevos datos sobre la morfologia, distribucion geografica y etoecologia de *Calomys callosus callosus* (Ranger) (Rodentia-Cricetidae) Physis. 25: 325.

- MAYER, M. & PIFANO, C.F. 1941 - O diagnóstico da moléstia de Chagas por intradermo reação com cultivo de *Schizotrypanum cruzi*. Brasil. Med. 55: 317-319.
- MAYER, M. & ROCHA LIMA, H. 1954 - El comportamiento del *Schizotrypanum cruzi* en animales homeotérmicos y artrópodos. Versão do original "Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in Warmblutern und Artropoden". Arch. Venezol. Med. Trop. Parasitol. Med. 2: 10-49.
- McHARDY, N. 1977 - Passive immunization of mice against infection with *Trypanosoma cruzi* using convalescent mouse serum. Tropemmed, Parasit. 28: 195-201.
- McHARDY, N. 1980 - Passive protection of mice against infection with *Trypanosoma cruzi* with plasma: the use of blood and vector bug-derived trypomastigote challenge. Parasitol. 80: 471.
- MELLO, D.A. 1969 - Roedores silvestres de alguns municípios do Estado de Pernambuco e suas regiões naturais. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol. 2: 360-362.
- MELLO, D.A. 1977a - Observações preliminares sobre a ecologia de algumas espécies de roedores do cerrado, município de Formosa, Goiás, Brasil. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol. 10: 39-44.
- MELLO, D.A. 1977b - Note on breeding of *Calomys callosus* Lund 1841 (Rodentia Cricetidae) under laboratory condition. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol. 10: 107.

- MELLO, D.A. 1978 - Biology of *Calomys callosus* (Rengger, 1830) under laboratory conditions (Rodentia-cricetidae). Rev. Bras. Biol. 38: 807-811.
- MELLO, D.A. 1979/80 - Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rengger, 1830), (Cricetidae-Rodentia) a quatro espécies de parasita. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 13: 101-105.
- MELLO, D.A. 1980a- Aspectos ecológicos do ciclo silvestre do *Trypanosoma cruzi* em Região de cerrado (Município de Formosa, Estado de Goiás). Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P. - Depto. Parasitologia. *
- MELLO, D.A. 1980b- Estudo populacional de algumas espécies de roedores do cerrado (norte do município de Formosa - Goiás). Rev. Bras. Biol. 40: 843-860.
- MELLO, D.A. 1981 - Aspectos do ciclo silvestre do *Trypanosoma cruzi* em região do cerrado (município de Formosa, Estado de Goiás). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 76: 227-246.
- MELLO, D.A. 1982 - Roedores, marsupiais e triatomíneos silvestres capturados no municípios de Mambai, Goiás. Infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Saúde Públ. S. Paulo. 16: 282-291.
- MELLO, D.A. & BORGES, M.M. 1981 - Primeiro encontro do *Triatoma costalimai* naturalmente infectado pelo *Trypanosoma cruzi*: estudo dos aspectos biológicos da amostra isolada. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 76: 61-69.

- MELLO, R.C. & BRENER, Z. 1978 - Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. J. Parasit. 64: 475-482.
- MELLO, D.A. & MOOJEN, L. 1979 - Notas sobre uma coleção de roedores e marsupiais de algumas regiões do cerrado do Brasil Central. Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol. 12: 287-291.
- MELLO, D.A. & TEIXEIRA, M.L. 1977 - Nota sobre a infecção natural de *Calomys expulsus* (Lund 1841) (Cricetidae - Rodentia) pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Saúde Públ. S. Paulo 11: 561-564.
- MELLO, D.A.; VALIN, E. & TEIXEIRA, M.L. 1979 - Alguns aspectos do comportamento de cepas silvestres de *Trypanosoma cruzi* em camundongos e *Calomys callosus* (Rodentia). Rev. Saúde públ.; S. Paulo 13: 314-25.
- MELLO, D.A.; VALIN, E. & TEIXEIRA, M.L. 1979 - Nota sobre infecção natural de *Calomys expulsus*, Lund 1841 (Cricetidae-Rodentia) pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Saúde Públ. S. Paulo 11: 314-321.
- MILDER, R.V.; KLOETZEL, J.K. & DEANE, M.P. 1977 - Observation on the interaction of peritoneal macrophages with *Trypanosoma cruzi*. II. Intracellular fate of bloodstream forms. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 19: 313.
- MILDER, R.V. & KLOETZEL, J.K. 1980 - The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages in vitro. Interaction with lysosomes and host cell fate. Parasitol. 80: 139.

- MOOJEN, J. 1952 - Os roedores do Brasil. Instituto Nacional do Livro, Biblioteca Científica Brasileira, Série A-II.
- MOORHEAD, J.W. & CLAMAN, H.M. 1974 - Subpopulation of mouse T lymphocytes. I. "Thymidine suicide" of a major proliferating, PHA - responsive cell population present in spleen but not in lymph node. J. Immunol. 112: 333.
- MORETTI, E.R.; BASSO, B.; ALBESA, I.; ERASO, A.J. & KRAVETZ, F.O. 1980 - Infección natural de *Calomys laucha* por *Trypanosoma cruzi*. Med. (Buenos Aires) 40(supl.1): 181-186.
- MUNIZ, J. & BORRIELLO, A. 1945 - Estudio sobre a ação lítica de diferentes soros sobre as formas de cultura e sangüícola de "*Schizotrypanum cruzi*". Rev. Bras. Biol. 5: 563-576.
- NATHAN, C.; NOGUEIRA, N.; JUANGBHANICH, C.; ELLIS, J. & COHN, Z. 1979 - Activation of macrophages in vivo and in vitro: correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. J. Exp. Med. 149: 1056.
- NERY-GUIMARÃES, F. 1972 - A refratariedade das aves ao *Trypanosoma* (S.) *cruzi* I. Ausência de passagem para o sangue; duração da viabilidade e destruição dos parasitas na pele. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 70: 37-48.

- NERY-GUIMARÃES, F. & LAGE, H.A. 1972 - A refratariedade das aves ao *Trypanosoma cruzi* (S.) *cruzi*. II. Refratariedade das galinhas desde o nascimento; persistência da refratariedade após bursectomia, infecções em ovos embrionados. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 70: 97-107.
- NOGUEIRA, N.; BIANCO, C. & COHN, Z. 1975 - Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. J. Exp. 142(1): 224-229.
- NOGUEIRA, N.; CHAPLAN, S. & COHN, Z. 1980 - *Trypanosoma cruzi*: factors modifying ingestion and fate of blood form trypomastigotes. J. Exp. Med. 152: 447.
- NOGUEIRA, N.; CHAPLAN, S.; REESINK, M.; TYDINGS, J. & COHN, Z. 1982 - *Trypanosoma cruzi* induction of microbicida activity in human mononuclear phagocytes. J. Immunol. 128: 2142-2146.
- NOGUEIRA, N. & COHN, Z. 1976 - *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. J. Exp. Med. 143: 1402-1420.
- NOGUEIRA, N. & COHN, Z.A. 1978 - *Trypanosoma cruzi*: in vitro induction of macrophage microbicidal activity. J. Exp. Med. 148: 288.
- NOGUEIRA, N.; GORDON, S. & COHN, Z. 1977 - *Trypanosoma cruzi*: modification of macrophage function during infection. J. Exp. Med. 146: 157.

- NUSSENZWEIG, V.N.; DEANE, L.M. & KLOETZEL, J.K. 1962 - Diversidade na constituição antigênica de amostra de *Trypanosoma cruzi* isoladas do homem e de gambá. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 4: 409-410.
- NUSSENZWEIG, V.N.; DEANE, L.M. & KLOETZEL, J.K. 1963b - Differences in antigenic constitution of strains of *Trypanosoma cruzi*. Exper. Parasitol. 14: 221-232.
- NUSSENZWEIG, V.N.; KLOETZEL, J.K. & DEANE, L.M. 1963a - Acquired immunity in mice infected with strains of immunological types A and B of *Trypanosoma cruzi*. Exper. Parasitol. 14: 233-239.
- OKABE, K.; KIPNIS, T.L.; CALICH, V.L.G. & DIAS DA SILVA, W. 1980 - Cell mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. I. Antibody dependent cell mediated cytotoxicity to trypomastigote blood stream form. Clin. Immunol. Immunopathol. 16: 344.
- PARKER, D. & TURK, J.L. 1978 - The effect of cyclophosphamide pretreatment on B cell stimulation: Dissociation of action on homocytotropic antibody and other B cell functions. Immunol. 34: 115-121.
- PELLEGRINO, J. 1946 - O eletrocardiograma na fase crônica da Doença de Chagas experimental no cão. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 44: 615-647.
- PESSOA, S.B. & MARTINS, A.V. 1977 - Parasitologia Médica. 10ª Edição. Editora Guanabara Koogan.

- PETTER, F.; KARIMI, Y. & ALMEIDA, C.R. de, 1967 - Un nouveau rongeur de laboratoire le cricetidé *Calomys callosus*. C.R. Acad. Sc. Paris 265: 1974-1976.
- PIFANO, F. 1969 - Algunos aspectos en la ecología y epidemiología de las enfermedades endémicas con focos naturales en el área tropical, especialmente en Venezuela, Caracas. Minist. Sanid. Assist. Soc. 297p.
- PIFANO, F. 1973 - La dinámica de la enfermedad de Chagas en el Valle de los Naranjos, Estado Carabobo, Venezuela. I. Contribución al estudio de los focos naturales silvestres del *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1909. Arch. Venezol. Med. Trop. Parasitol. Med. 5 (2): 3-29.
- PIZZI, J.P. 1953 - Sobre el problema de las formas delgadas del *Trypanosoma cruzi* (comunicación preliminar). Biol. Inform. Parasit. Chilena 8: 26-30.
- PIZZI, T. 1961 - Immunología de la enfermedad de Chagas: Estado actual del problema. Bol. of Sanit. Panam. 51: 450-464.
- PIZZI, T.P.; RUBIO, M. & KNIERIM, F. 1954 - Immunología de la enfermedad de Chagas. Bol. Chileno Parasitol. 9: 35-47.
- POULTER, L.W. & TURK, J.L. 1972 - Proportional increase in the theta-carrying lymphocytes in peripheral lymphoid tissue following treatment with cyclophosphamide. Nature New Biol. 238: 17-18.

- REIS, A.P.; CHIARI, C.A.; TANUS, R. & ANDRADE, M. 1976 - Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 18: 422.
- RIBEIRO, R.D. 1971 - Contribuição para o estudo da infecção natural de roedores brasileiros pelo *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto (Tese livre docência) - Fac. Farm. Odont. Ribeirão Preto, U.S.P.
- RIBEIRO, R.D. 1973 - Novos reservatórios do *Trypanosoma cruzi*. Rev. Bras. Biol. 33: 429-537.
- RIBEIRO DOS SANTOS, R.; MARQUES, J.O.; VON GAL FURTADO, C.C.; RAMOS DE J.C.; MARTINS, A.R. & KOBERLE, F. 1979 - Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. Tropenmed. Parasitol. 30: 19.
- RIBEIRO DOS SANTOS, R. & HUDSON, L. 1980a - *Trypanosoma cruzi*: immunological consequence of parasite modification of host cells. Clin. Exp. Immunol. 40: 36.
- RIBEIRO DOS SANTOS, R. & HUDSON, L. 1980b - *Trypanosoma cruzi*: binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. Parasite Immu. 2: 1.
- RIBEIRO DOS SANTOS, R. & HUDSON, L. 1980 - *Trypanosoma cruzi*: immunological consequence of parasite modification of host cells. Clin. Exp. Immunol. 40: 36.
- RIVERA-VANDERPAS, M.T.; RODRIGUEZ, A.M.; AFCHAIN, D. 1983 - *Trypanosoma cruzi*: variation in susceptibility of inbred strains of rats. Acta Tropica 40: 5-10.

- ROBERSON, E.L.; HANSON, W.L. & CHAPMAN, (Jr), W.L.
1973 - *Trypanosoma cruzi*: effects of antithymocyte serum in mice and neonatal thymectomy rats. Exp. Parasitol. 34: 168.
- ROBERSON, E.L. & HANSON, W.L. 1974 - Transference of immunity to *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 68: 338.
- RUBIO, M. 1956 - Actividad lítica de sueros normales sobre formas de cultivo e sanguíneas de *Trypanosoma cruzi*. Bol. Chil. Parasitol. 11: 62-69.
- ROWLAND, E.C. & KUHN, R.E. 1978 - Suppression of cellular responses in mice during *Trypanosoma cruzi* infections. Infect. Immun. 20: 393.
- ROSEMBERG, M.E.; MARSDEN, P.D. & PETTITT, L.E. 1969 - The infectivity of cultural forms of a Peru strain of *Trypanosoma cruzi* for CFI mice and Reduviid bugs. An. Trop. Med. Parasitol. 63: 207-210.
- ROMAÑA, O. 1944 - Contribuição ao conhecimento da patogenia da tripanosomíase americana (Período inicial da infecção). Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro 39: 253-264.
- RODRIGUEZ, A.M.; SANTORO, F.; AFCHAIN, D.; BAZIN, H. & CAPRON, A. 1981 - *Trypanosoma cruzi* infection in B cells deficient rats. Infect. Immunol. 31: 524.
- SANCHEZ, D.O. & GONZALES-CAPPA, S.M. 1983 - Neutralizing antibodies in *Trypanosoma cruzi* infection. Medicina (Buenos Aires) 46: 41-46.

- SANTOS, R.R. 1973 - Contribuição ao estudo da imunidade na fase aguda da Doença de Chagas experimental. *Rev. Patol. Trop.* 2:433-463.
- SCOTT, M.T. 1981 - The nature of immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice recovered from acute infection. *Parasite Immunol.* 3: 209.
- SEAH, S.K.; MARSDEN, P.D.; VOLLER, A. & PETTIT, L.E. 1974 - Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rhesus monkeys. The acute phase. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 68: 63-69.
- SENECA, H. & ROCKEMBACKY, J. 1952 - Fatal *Trypanosoma cruzi* infection in the white rats. *Sci.* 116: 14.
- SHAND, F.L. & LIEW, F.Y. 1980 - Differential sensitivity to cyclophosphamide of helper T cells for humoral response and suppressor T cells for delayed type hypersensitivity. *Eur. J. Immunol.* 10: 480-483.
- SILVA, L.H.P. da & NUSSENZWIEG, V. 1953 - Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. & Biol. (São Paulo)* 20: 191-208.
- SILVA, E.O.R.; ANDRADE, J.C.R. & LIMA, A.R. 1975 - Importância dos animais sinantrópicos no controle da endemia chagásica. *Rev. Saúde Públ. S. Paulo*, 9: 371-381.
- SOGAYAR, R. 1981 - Infecção experimental de ratos albinos Wistar com diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *Rev. Patol. Trop.* 10(2): 119-180.
- SOGAYAR, R. 1985 - Estudos da imunidade humoral em ratos albinos Wistar inoculados com as cepas Y e Fl de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Tese Doutorado, apresentada ao Deptº de Parasitologia do ICB/USP, São Paulo.
- STEFANI, M.M.A.; TAKEHARA, H.A. & MOTA, I. 1983 - Isotype of antibodies responsible for immune lysis in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Immunol. Lett.* 7(2): 91-97.

- STEWART, M.W. & PETTY, R.E. 1972 - The use of ammonium sulphate globulin precipitation for determination of affinity of anti-protein antibodies in mouse serum. *Immunology* 22: 747.
- STEWART, M.W. & PETTY, R.E. 1972 - The antigen-binding characteristics of antibody pools of different relative affinity. *Immunol.* 23: 881.
- STOCKMAN, G.D.; HEIM, L.R.; SOUTH, M.A.; TRENTIN, J.J. 1973 - Differential effects of cyclophosphamide on the B and T cell compartments of adult mice. *J. Immunol.* 110(1): 277-282.
- TAKEHARA, A.; PERINI, A.; DA SILVA, M.H. & MOTA, I. 1981 - *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exp. Parasitol.* 52: 137.
- TALIAFERRO, W.H. & PIZZI, T. 1955 - Connective tissue reaction in normal and immunized mice to a reticulo-tropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 96: 199-226.
- TEIXEIRA, A.R.; FIGUEIREDO, F.; REZENDE FILHO, J. & MACEDO, V. 1983 - Chagas'disease: a clinical parasitological, immunological, and pathological study in rabbits. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32(2): 258-272.
- TEIXEIRA, A.R.L. & SANTOS BUCH, C.A. 1974 - The immunology of experimental Chagas'disease. I - Preparation of *Trypanosoma cruzi* antigens and humoral antibody response to those antigens. *J. Immunol.* 113: 859-869.

- TEIXEIRA, A.R.L.; TEIXEIRA, M.L. & SANTOS-BUCH, C.A. 1975 - The immunology of experimental Chagas'disease in man. IV. Production of lesions in rabbits like those of chronic Chagas'disease in man. Am. J. Pathol. 80: 163-180.
- TORRES, C.B.M. 1930 - Patogénia de la miocarditis crôni-
ca en la enfermedad de Chagas. 5 Reunión de la Soc.
Argentina de Patol. Regional del Norté Jujuy, Argentina 2: 902-916.
- TRISCHMANN, T.M. & BLOOM, B.R. 1980 - *Trypanosoma cruzi*:
hability of T cell enriched and depleted lymphocyte po
pulations to passively protect mice. Exp. Parasitol.
49: 225.
- TRISCHMANN, T.; TANOWITZ, H.; WITTNER, M.; BLOOM, B. 1978
- *Trypanosoma cruzi*: Role of the immune response in na
tural resistance of inbred strains of mice. Exp. Paras
itol. 45: 160-168.
- TSCHUDI, E.J.; ANZIANO, D.F. & DALMASSO, A.P. 1972 - Lym
phocyte transformation in Chagas'disease. Infect.Immun.
6: 905-908.
- TURK, J.L. & POULTER, L.W. 1972a- Selective depletion of
lymphoid tissue by ciclophosphamide. Clin. Immunol.10:
285-296.
- TURK, J.L.; PARKER, D. & POULTER, L.W. 1972b- Functional
aspects of the selective depletion of lymphoid tissue
by cyclophosphamide. Immunol. 23: 493.
- TURK, J.L. & PARKER, D. 1982 - Effect of cyclophosphami-
de on immunological control mechanisms. Immunological
Rev. 65: 99-113.

- VANTUONE, N.H.; SZARFMAN, A. & GONZALES-CAPPA, S.M.
1973 - Antibody response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas'disease). Amer. J. Trop. Med. Hyg. 76: 45-47.
- VILLELLA, E. 1924 - Paralysie experimentale chez le chimpanzé le *Trypanosoma cruzi*. Compt. Rend. (Biologic) 91: 978-983.
- VOLLER, A. & SHAW, J.J. 1965 - Immunological observation on an antiserum to *Trypanosoma cruzi*. Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie 16: 181-187.
- WILLERS, J.M.N. & SLUIS, E. 1975 - The influence of cyclophosphamide on antibody formation in the mouse. Ann. Immunol. 126C : 267-279.
- WOOD, J.N.; HUDSON, L.; JESSEL, T.M. & YAMAMOTO, M.
1982 - A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulation of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. Nature 296: 34-38.
- WORLD, Health Organization - Report of the First Scientific Working Group on Chagas'disease. Buenos Aires, Argentina 1977, p.1-45.
- WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S. & WATSON, J. 1982 - Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. Infect. Immun. 36(2): 637-644.

YAMAGUCHI, K. & KISHIMOTO, S. 1978 - Distinction between suppressors of the delayed-type hypersensitivity and the humoral response to sheep erythrocytes. *Immunol.* 35: 721-731.

YANOVSKY, J.F. & ALBADO, E. 1972 - Humoral and cellular response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 109: 1159-1161.

ZELEDÓN, R.; SOLANO, G.; SÁENZ, G. & SWARTZWELDER, J.C. - 1970 - Wild reservoirs of *Trypanosoma cruzi* with special mention of the opossum, *Didelphis marsupialis*, and its role in the epidemiology of Chagas' diseases in an endemic area of Costa Rica. *J. Parasitol.* 56: 38.