

RAFAEL CAMPOS BEZERRA

Este exemplar corresponde a Redação Final da Tese defendida pelo candidato Rafael Campos Bezerra e Aprovada pela Comissão Julgadora. Campinas, 23/03/92. *Beza/a*

ESTUDOS PARASITOMICOS E CITOLOGICOS EM CAMUNDONGOS
INFECTADOS COM AS CEPAS Y OU CL DO *Trypanosoma cruzi*
(CHAGAS, 1909).

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Ciências na área de Imunologia.

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
Campinas - São Paulo

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

RAFAEL CAMPOS BEZERRA

ESTUDOS PARASITOMICOS E CITOLOGICOS EM CAMUNDONGOS
INFECTADOS COM AS CEPAS Y OU CL DO *Trypanosoma cruzi*
(CHAGAS, 1909).

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do Título de Mestre em Ciências
na área de Imunologia.

Orientador:

Dr. Marcos Garcia, Costa

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
Campinas - São Paulo

" OS PODEROSOS PODEM MATAR
UMA. DUAS OU TRÊS ROSAS.
MAS NÃO CONSEGUIRÃO DETER
A PRIMAVERA."

*Para Wanda que me ensinou o amor
em suas formas várias
e aos nossos filhos*

*Rafael
Carolina
Iza Maria
Ana Maria
Lia Maria*

*e para Gabriel, Babá e Gigi
que não puderam esperar para ver.*

O Curso de Pós-Graduação em Imunologia recebeu auxílio das seguintes Instituições:

Universidade Estadual de Campinas - *UNICAMP*.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - *CNPq*.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - *FAPESP*.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior - *CAPES*.

Organização Mundial da Saúde - *Divisão de Imunologia*.

Biblioteca Regional de Medicina - *BIREME*.

Agradecemos o auxílio prestado para a realização deste trabalho, aos seguintes setores da Fundação Universidade Estadual de Maringá:

Pró-Reitoria de Ensino e Pesquisa.

Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação.

Departamento de Análises Clínicas.

Biotério Central.

Biblioteca Central.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Marcos Garcia Costa, que acreditou quando eu não mais acreditava e me fez voltar a crer. Graças ao seu estímulo e a sua confiança este trabalho foi possível. A ele, devo em primeiro lugar, o aprendizado da amizade, que se renova a cada novo dia, nutrida na sinceridade e alicerçada na confiança mútua; em segundo lugar, qualquer valor que por ventura tenha este trabalho.

Ao Professor José de Anchieta Alves pela colaboração e sugestões nos estudos Hematológicos e Citológicos.

A Professora Maria Raquel Marçal Natali e sua Técnica assistente, Tarcília Volski, pela contribuição nos estudos Histológicos.

Aos Professores Cesar Pereira e Yoshiaki Fukushigue, pelo auxílio prestado nas análises estatísticas dos dados obtidos.

Ao Professor Paulo de Tarso Sica de Toledo, cujo auxílio na edição do texto foi fundamental para o aspecto final desta tese.

Aos funcionários do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, cujo apoio foi muito importante para este trabalho.

Aos companheiros do laboratório, Alice, Márcia, Neuza, Ricardo e Thaís, pela amizade, compreensão e ajuda extemporânea; sobretudo, Milton Takafumi Hiracava, que de aprendiz a "braço-direito", transformou-se no companheiro de todas as horas.

Ao Professor Dr. Walter A. Hadler, do Instituto de Biologia, da UNICAMP, pelas preciosas sugestões sobre o uso do Azul de Cresil Brilhante e sobre imprint e citologia de baço de camundongos.

Ao Professor Dr. Humberto de Araújo Rangel, do Instituto de Biologia, da UNICAMP, que com muita paciência, ensinou a arte e a ciência da busca, com honestidade e perseverança, não apenas a mim, mas à toda uma geração que hoje faz do ensino e da pesquisa, uma extensão natural das suas atividades.

Aos Professores Doutores Celso Paulino da Costa, Judith Kloetzel, Julia Keiko Sakurada, Leonilda Maria Barbosa dos Santos, Luiz Cândido de Souza Dias e Paulo Maria Ferreira de Araújo, pelas críticas e sugestões a este trabalho.

Uma geração vai, uma geração vem, e a terra sempre permanece.

*O sol se levanta, o sol se deita, apressando-se a voltar
ao seu lugar e é lá que ele se levanta (...)*

*Todos os rios correm para o mar e contudo o mar nunca enche:
embora chegando ao fim do seu percurso,
os rios continuam a correr. (...)*

*O que foi, será,
o que se fez, se tornará a fazer (...)*

Eclesiastes ()*

() A Bíblia de Jerusalém, Ed. Paulinas, São Paulo - 1980*

INDICE

	Página
1.- <i>Introdução</i>	01
2.- <i>Material e Métodos</i>	08
2.1.- Animais Utilizados.....	08
2.2.- <i>Trypanosoma cruzi</i>	08
2.3.- Manutenção das Amostras de <i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> em Camundongos.....	09
2.4.- Infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
2.5.- Parasitemia.....	10
2.6.- Técnicas Hematológicas.....	11
2.7.- Técnicas Histológicas.....	11
2.8.- Imprint de Baço.....	11
2.9.- Observações Medulares.....	12
2.10- Análises Estatísticas.....	12
3.- <i>Resultados</i>	13
3.1.- <i>Trypanosoma cruzi</i> - Cepa Y. Parasitemia, Período Pré-Patente e Mortalidade.....	13

3.1.1.- Comparação entre linhagens de Camundongos.....	13
3.1.2.- Camundongos Swiss - Comparação entre idades.....	25
3.2.- <i>Trypanosoma cruzi</i> - Cepa CL. Parasitemia, Período Pré-Patente e Mortalidade.....	27
3.2.1.- Comparação entre Linhagem de Camundongos.....	27
3.3.- Comparação entre as Cepas Y e CL do <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
3.4.- Observações Hematológicas.....	47
3.4.1.- Comparação entre Hematócritos.....	48
3.4.1.1.- Camundongos C57BL/10 - Cepa Y	48
3.4.1.2.- Camundongos (C57BL/10xCBA)F1 - Cepa Y.....	51
3.4.1.3.- Camundongos (C57BL/10xBALB/c)F1 - Cepas Y ou CL.....	53
3.4.1.4.- Diferentes linhagens de Camundongos - Cepa Y.....	55
3.4.1.5.- Diferentes Linhagens de Camundongos - Cepa CL.....	56

	Página
3.4.2.- Alterações da Série Vermelha.....	62
3.5.- Observações Esplênicas.....	68
3.5.1.- Observações Macroscópicas.....	68
3.5.2.- Observações Microscópicas.....	68
3.6.- Observações Medulares.....	86
<i>Discussão.....</i>	91
<i>Conclusões.....</i>	117
<i>Resumo.....</i>	120
<i>Bibliografia.....</i>	123

Introdução

A Tripanosomiase Americana, doença que deve a sua descoberta e caracterização inicial a Carlos Chagas (CHAGAS, 1909), é um sério problema de saúde pública em vários países latino-americanos, com a sua ocorrência verificada desde o México até o sul do continente sul-americano (WHO, 1977).

Diversos estudos têm sido realizados desde o trabalho original de Chagas (CHAGAS, 1909), visando melhor caracterizar esta doença, e entretanto ainda hoje, é considerada uma moléstia sem cura.

Dentre os vários problemas que dificultam a erradicação desta doença, encontra-se, principalmente, o seu ciclo vital complexo, onde tipos morfológicos bem distintos se apresentam com parasitismos intra e extra-celular, a diversidade e a vasta distribuição de hospedeiros e as condições sócio-econômicas das populações humanas acometidas da moléstia (WHO, 1960; CANÇADO, 1968; WHO, 1974; WHO, 1977).

Além do polimorfismo apresentado pelo *Trypanosoma cruzi*, diferenças significativas são também observadas nas diversas amostras do parasita, que são isoladas de casos humanos ou de hospedeiros invertebrados, constituindo-se, assim, nas chamadas cepas do *Trypanosoma cruzi* (BRENER & CHIARI, 1963; DEANE e col., 1963; BRENER, 1965).

As várias cepas isoladas, apresentam diferentes comportamentos biológicos, quando comparadas frente a diversos parâmetros, tais como: morfologia das formas tripomastigotas sanguíneas, infectividade, virulência, período pré-patente, parasitemia, resistência à drogas, resistência à radiação, cargas elétricas de superfície, constituição antigênica, além de diferentes tropismos nos hospedeiros vertebrados (BRENER, 1962; BRENER, 1962b; NUSSENZWEIG e col., 1962; BRENER & CHIARI, 1963; DEANE e col., 1963; BRENER & CHIARI, 1967; BRENER, 1967; BRENER, 1969; CHIARI e col., 1968; BRENER, 1969; BRENER, 1971; BRENER & CHIARI, 1971; KRETTLI & BRENER, 1976; PERALTA e col., 1980; SOUZA, 1983; FILARDI & BRENER, 1984).

Por outro lado, os animais utilizados nas infecções experimentais, apresentam comportamentos distintos quando testados com uma única cepa do *Trypanosoma cruzi*. Deste modo, camundongos isogênicos de linhagens diferentes apresentam período pré-patente, parasitemia ou mortalidade desiguais, tendo sido descritos camundongos altamente suscetíveis, bem como outros resistentes, a inóculos relativamente altos de *Trypanosoma cruzi*, cepa Brasil e entre estes dois tipos, camundongos considerados de resistência intermediária (TRISCHMANN e col., 1978; HATCHER e col., 1981; TRISCHMANN, 1983; LALONDE e col., 1985; TRISCHMANN, 1986).

CORSINI e colaboradores (1980), estudaram a suscetibilidade de diferentes linhagens de camundongos em relação a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. Usando um inóculo pequeno (100 tripomastigotas/intraperitonealmente), estes autores verificaram que a linhagem C3He/J era altamente suscetível, a CBA, suscetível, a C57BL/10, moderadamente resistente e o híbrido (C57BL/10 x CBA)F1, resistente.

Uma base genética para a resistência ao *Trypanosoma cruzi* tem sido sugerida, desde o trabalho pioneiro de PIZZI e colaboradores (1949). Mais recentemente, estes achados têm sido confirmados (TRISCHMANN, 1978). Entretanto, o mecanismo ou mecanismos através dos quais a base genética se expressa, permanecem ainda desconhecidos.

Além da base genética ligada à linhagem, uma resistência relacionada ao sexo vem sendo aventada, desde o trabalho precursor de HAUSCHKA (1947), que demonstrou uma maior resistência das fêmeas de camundongos ao *Trypanosoma cruzi*. Este fato não foi confirmado por PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG (1953), devendo-se esta dissimilitude ser creditada, possivelmente, a diferenças na virulência das cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas em cada experimento.

DEMEY e colaboradores (1985), trabalhando com diferentes linhagens de camundongos, mostraram em todas as linhagens, uma maior suscetibilidade dos machos ao *Trypanosoma brucei brucei*, resultados semelhantes àqueles obtidos por HAUSCHKA em 1947, com o *Trypanosoma cruzi*.

A Doença de Chagas, tanto em humanos como em animais, caracteriza-se por duas fases bem distintas: uma fase aguda e outra crônica, distinguindo-se esta última, pelas lesões

histológicas causadas pelo parasito, que nesta fase, é de difícil visualização pelo exame a fresco do sangue periférico (ANDRADE & ANDRADE, 1968; CANÇADO, 1968; ANDRADE & ANDRADE, 1979).

A fase aguda, nos animais experimentais, caracteriza-se principalmente, pelo aparecimento da onda parasitêmica, podendo-se colher e contar os parasitos do sangue periférico, determinando-se desta forma, o período pré-patente e a curva de parasitemia da cepa de *Trypanosoma cruzi* em estudo, no animal experimental escolhido.

Durante esta fase, cujo período depende do tamanho do inóculo, da virulência da cepa e da resistência do animal, sintomas clínicos não são muito aparentes. Já no estágio tardio da fase aguda, diversos sintomas têm sido relatados, tais como arrepiamento de pêlo, menor mobilidade, incontinência urinária, edema, paralisia dos membros, perda de peso, etc (PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG, 1953).

Ainda com relação a duração da fase aguda, CORSINI e colaboradores (1980b), estimaram este período entre seis e trinta dias para os camundongos experimentalmente infectados, considerando em fase crônica, os animais que sobrevivessem após trinta dias de infecção.

Entre os efeitos patológicos da Doença de Chagas, encontram-se as alterações hematológicas. REPKA e colaboradores (1985), mostraram alterações hematológicas compreendidas por discreta anemia, neutropenia seguida por neutrofilia e eosinofilia. Neste trabalho, os autores usaram uma dose letal 50% - DL₅₀ - (aproximadamente 200 tripomastigotas/inóculo) da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*.

Atualmente, tem sido descrito uma atividade de neuraminidase, apresentada pelas formas tripomastigotas, sanguíneas ou de cultura de tecidos, do *Trypanosoma cruzi* (PEREIRA, 1983; PEREIRA, 1983a). As alterações hematológicas observadas em pacientes chagásicos (De TITTO & ARAUJO, 1987) ou em animais experimentais (CSETE & colaboradores, 1985), estão, aparentemente, relacionadas com esta atividade de neuraminidase, demonstrada pelo *Trypanosoma cruzi*.

Somando-se aos diversos achados patológicos descritos na Doença de Chagas, tem-se também demonstrado que o *Trypanosoma cruzi* confere imunossupressão e ativação policlonal nos animais experimentais, de modo semelhante ao descrito para o *Trypanosoma brucei*, comprometendo tanto a resposta humoral, como a celular (JAYAWARDENA & WAKSMAN, 1977; WITHEY e col., 1978; RAMOS e col., 1979; CORSINI e col., 1980b). Estes achados têm sido também obtidos com extratos brutos de formas de cultura ou sanguíneas do parasito (CORSINI e col., 1980c; CORSINI & COSTA, 1981; CORSINI & COSTA, 1981b).

Recentemente, foi demonstrado na doença de Chagas experimental, uma severa depleção de timócitos. Além disso, foi também observado um decréscimo transitório nos níveis de timulina, além de alterações na citoarquitetura do timo (SAVINO & colaboradores, 1989). Estes autores, trabalhando com camundongos C57BL/6 e C3H/HeJ, sugerem, que o microambiente tímico é afetado durante a infecção chagásica e que o timo poderia ser, também, um alvo da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

VELGE e colaboradores (1989), mostraram pela primeira

vez, que tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, infectam linfócitos T *in vitro* e, mais interessantemente, *in vivo*, e que, tripomastigotas liberadas de linfócitos T infectados, são infectantes.

A Doença de Chagas, portanto, tem-se caracterizado por apresentar diferentes afecções, que podem variar de acordo com o hospedeiro e com a cepa do parasito.

As observações aqui relatadas, se comparadas às diferentes formas clínicas que têm sido assinaladas para a Doença de Chagas humana, indicam a necessidade de mais estudos sobre a infectividade das diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* em linhagens isogênicas de animais experimentais.

Neste trabalho, tivemos como objetivo estudar a Doença de Chagas, utilizando duas cepas altamente virulentas do *Trypanosoma cruzi*: a cepa Y (PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG, 1953) e a cepa CL (BRENER & CHIARI, 1963) e três linhagens isogênicas de camundongos: as linhagens CBA e BALB/c, consideradas suscetíveis ao *Trypanosoma cruzi*, a linhagem C57BL/10, considerada moderadamente resistente e os híbridos (C57BL/10 x CBA)F₁, considerado resistente a baixos inóculos da cepa Y (CORSINI e col., 1980) e (C57BL/10 x BALB/c)F₁, aparentemente, ainda não estudado com as cepas Y e CL. Além das linhagens isogênicas, utilizamos também o camundongo "Swiss", não isogênico, mas de acasalamento endogâmico à várias décadas.

Durante a infecção das diferentes linhagens de camundongos, estudamos o efeito de diferentes inóculos sobre o período pré-patente, a mortalidade, a parasitemia e

o índice do hematócrito. Observamos, também, as alterações ocorridas na série vermelha e no baço, a nível histológico e citológico.

Material e Métodos

1. Animais Utilizados

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas, com 2 a 3 meses de idade, das linhagens isogênicas, BALB/c, CBA, e C57BL/10, criados e mantidos no nosso Biotério Experimental. Camundongos "Swiss", não isogênicos, foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os camundongos híbridos F1, foram obtidos pelo cruzamento da linhagem C57BL/10 com as linhagens CBA e BALB/c. Os animais em experimentação foram mantidos em gaiolas com, no máximo, 3 camundongos e foram alimentados com ração Purina e água *ad libitum*.

2. *Trypanosoma cruzi*

Duas amostras de *Trypanosoma cruzi* foram utilizadas neste trabalho: a cepa Y (PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG, 1953) e a CL (BRENER & CHIARI, 1963). As duas amostras foram

fornecidas pelo Dr. Marcos Garcia Costa (Campinas - São Paulo) e eram originalmente provenientes do Dr. Zigmar Brener (Belo Horizonte - Minas Gerais).

3. Manutenção das Amostras de *Trypanosoma cruzi* em Camundongos

As amostras de *Trypanosoma cruzi* foram mantidas em camundongos "Swiss", por passagem de 100.000 formas tripomastigotas, colhidas por sangria do plexo axilar no dia do pico parasitêmico (7 dias após a infecção, para a cepa Y e 11 dias após a inoculação, para cepa CL). O sangue foi coletado em heparina (5.000 UI/ml). A contagem dos parasitos circulantes foi realizada imediatamente após a colheita, utilizando-se o método descrito por BRENER, em 1968. A diluição dos parasitos foi feita em solução salina tamponada com fosfatos (pH = 7.2), contendo 500 UI/ml de heparina. As amostras assim padronizadas, contendo 100.000 tripomastigotas/inóculo, foram utilizadas para infectar, pela via intraperitoneal, os novos lotes de animais utilizados para a manutenção das cepas.

Algumas vezes, por falta de camundongos "Swiss" no Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, as cepas Y e CL do *Trypanosoma cruzi*, foram mantidas em camundongos BALB/c ou CBA.

4. Infecção por *Trypanosoma cruzi*

Camundongos BALB/c, CBA, C57BL/10, Swiss e os híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1 e (C57BL/10xCBA)F1, foram inoculados intraperitonealmente, com formas tripomastigotas sanguíneas, obtidas de camundongos Swiss infectados com 10^5 parasitos/inóculo. Os animais de manutenção foram sangrados pelo plexo axilar e o sangue recolhido em heparina (5.000 UI/ml). Após a contagem pelo método de BRENER (1968), os parasitos foram padronizados em solução salina tamponada com fosfatos (pH = 7.2), de modo a conter 10^5 , 10^4 , 10^3 ou 10^2 tripomastigotas por 0.1 ml de inóculo.

5. Parasitemia

A parasitemia dos camundongos, foi determinada pela contagem dos parasitos do sangue periférico, utilizando-se o método de BRENER (1968). Os animais foram sangrados através de um pequeno corte realizado na extremidade da cauda e o sangue colhido em pipeta de hemoglobina, calibrada para coletar 5 mm³. O sangue coletado foi colocado em lâmina de microscópio e coberto com uma lamínula 22x22 mm, obtendo-se uma camada de sangue homogeneamente distribuída.

A preparação foi examinada em microscópio binocular, com lente ocular 10 x e objetiva 40 x, contando-se os parasitos observados em 50 campos microscópios, aleatoriamente escolhidos e o número de parasitos

determinado do seguinte modo:

$$\frac{\text{número de parasitos}}{50 \text{ campos observados}} \times \text{número de campos microscópicos contidos na laminula } 22 \times 22 \text{ mm} = \text{parasitos}/5 \text{ mm}^3 \text{ de sangue.}$$

6. Técnicas Hematológicas

Os esfregaços de sangue foram feitos pela técnica usual e corados pelo Leishmann. Para a observação de reticulócitos os esfregaços foram corados pelo azul de cresil brilhante. A determinação dos hematócritos, seguiu o método padrão (DACIE & LEWIS, 1975).

7. Técnicas Histológicas

Fragmentos de baços dos animais, foram fixados em Bouin por 18 horas, lavados 2 vezes em álcool 70%, com 6 horas de intervalo entre as lavagens e então processados segundo as técnicas histológicas habituais. As colorações foram feitas pelo Hemalumen (Hematoxilina-Eosina).

8. Imprint de Baço

Animais normais ou chagásicos, foram anestesiados, seus baços retirados, lavados em solução salina tamponada com fosfatos (pH = 7.2), gelada, seccionados em sentido longitudinal ou transversal e suavemente pressionados contra

lâminas de microscópio. A preparação assim obtida foi corada pelo Leishmann. Para evitar acúmulo de sangue na preparação os animais foram sangrados, até a morte, antes da retirada dos baços.

9. Observações Medulares

Camundongos normais ou chagásicos, foram anestesiados e sacrificados por exanguinação. Os fêmures dos animais foram retirados, lavados várias vezes em solução salina tamponada com fosfatos (pH = 7.2), gelada. A medula óssea foi extraída e esfregada em lâmina de microscópio. Os esfregaços assim obtidos foram corados pelo Leishmann.

10. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas através de análise de variância e do teste "t" de Student (AYRES & AYRES Jr., 1987).

Resultados

1. *Trypanosoma cruzi* - cepa Y

1. Parasitemia, Período Pré-Patente e Mortalidade

Com a finalidade de verificar o decurso da infecção com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, lotes de 10 camundongos (5 machos e 5 fêmeas), de cada linhagem, foram infectados, pela via intraperitoneal, com inóculos variando de 100 a 100.000 tripomastigotas. A parasitemia foi acompanhada diariamente, durante 30 dias, sendo verificado neste intervalo, o período pré-patente e a mortalidade de cada grupo experimental.

1.1. Comparação entre Linhagens de Camundongos

Comparamos o desenvolvimento da infecção nas diferentes linhagens e híbridos estudados, infectados com

diversos inóculos do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Nas Figuras 1 e 2 observamos o decurso da infecção nas linhagens CBA, BALB/c, C57BL/10, Swiss e híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1, inoculados com 100.000 tripomastigotas. O período pré-patente, foi de dois dias para as linhagens C57BL/10, CBA e Swiss e de três dias, para a linhagem BALB/c e híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1 (Figura 1). Um primeiro pico parasitêmico foi observado no quinto dia, nos camundongos C57BL/10, CBA e Swiss, seguido de uma queda no nível parasitêmico no sexto dia, quando os camundongos C57BL/10 controlaram a onda parasitêmica e as duas outras linhagens mostravam um pico de nível parasitêmico máximo no sétimo dia.

A linhagem BALB/c apresentou pico máximo no sexto dia, decaindo a parasitemia, até o décimo dia, quando uma nova onda parasitêmica começou a surgir. Os híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1, apresentaram uma parasitemia muito baixa, tornada incipiente com 15 dias de infecção. Não foram observadas diferenças significantes nas parasitemias dos camundongos CBA, BALB/c e Swiss ($P > 0.05$), que em relação aos camundongos C57BL/10 e híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1, mostraram diferenças significativas ($P < 0.05$). Os híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1, apresentaram diferenças significativas ($P < 0.05$), em relação a todas as linhagens examinadas nestas experiências (Figura 1).

A mortalidade destes animais, é mostrada na Figura 2. As linhagens CBA e BALB/c, apresentaram mortalidade precoce, ocorrendo 10% e 20% de óbitos, respectivamente, já no oitavo dia, seguindo-se pelas

linhagens C57BL/10 e Swiss, com 10% e 20%, respectivamente com 11 dias de infecção. A mortalidade foi total para os camundongos CBA (11 dias), BALB/c (12 dias) e Swiss (17 dias), não havendo diferenças significativas entre estas três linhagens ($P > 0.05$), enquanto os camundongos C57BL/10, apresentavam, ao fim da experiência, uma taxa de mortalidade de 50%. Os híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1, apresentaram apenas 10% de mortalidade, ao término da experiência, resultado significativamente diferente ($P < 0.05$), daqueles observados nas demais linhagens.

Com o inóculo de 10.000 tripanosomas todas as linhagens e os híbridos (C57BL/10xCBA)F1 e (C57BL/10xBALB/c)F1, foram testados, mostrando os padrões parasitêmicos apresentados na Figura 3. Com exceção dos camundongos Swiss, cujo período pré-patente foi de dois dias, os demais apresentaram período pré-patente de 3 dias, ao qual seguiu-se uma parasitemia, cujos picos iniciais ocorreram no sétimo dia para os camundongos CBA e BALB/c, no oitavo para os Swiss e híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1 e (C57BL/10xCBA)F1 e no nono dia para a linhagem C57BL/10. O maior índice parasitêmico, no pico, foi mostrado pelos camundongos Swiss, seguidos pelos CBA. Os camundongos CBA, BALB/c e C57BL/10, apresentaram uma nova onda parasitêmica, enquanto os híbridos controlaram a parasitemia, que foi mantida em níveis incipientes, até o fim da experiência.

A mortandade destes animais é mostrada na Figura 4. Os primeiros animais a apresentarem mortalidade, foram os camundongos Swiss (30%), (C57BL/10xBALB/c)F1 e (C57BL/10xCBA)F1 (ambos 10%), com 11 dias de infecção,

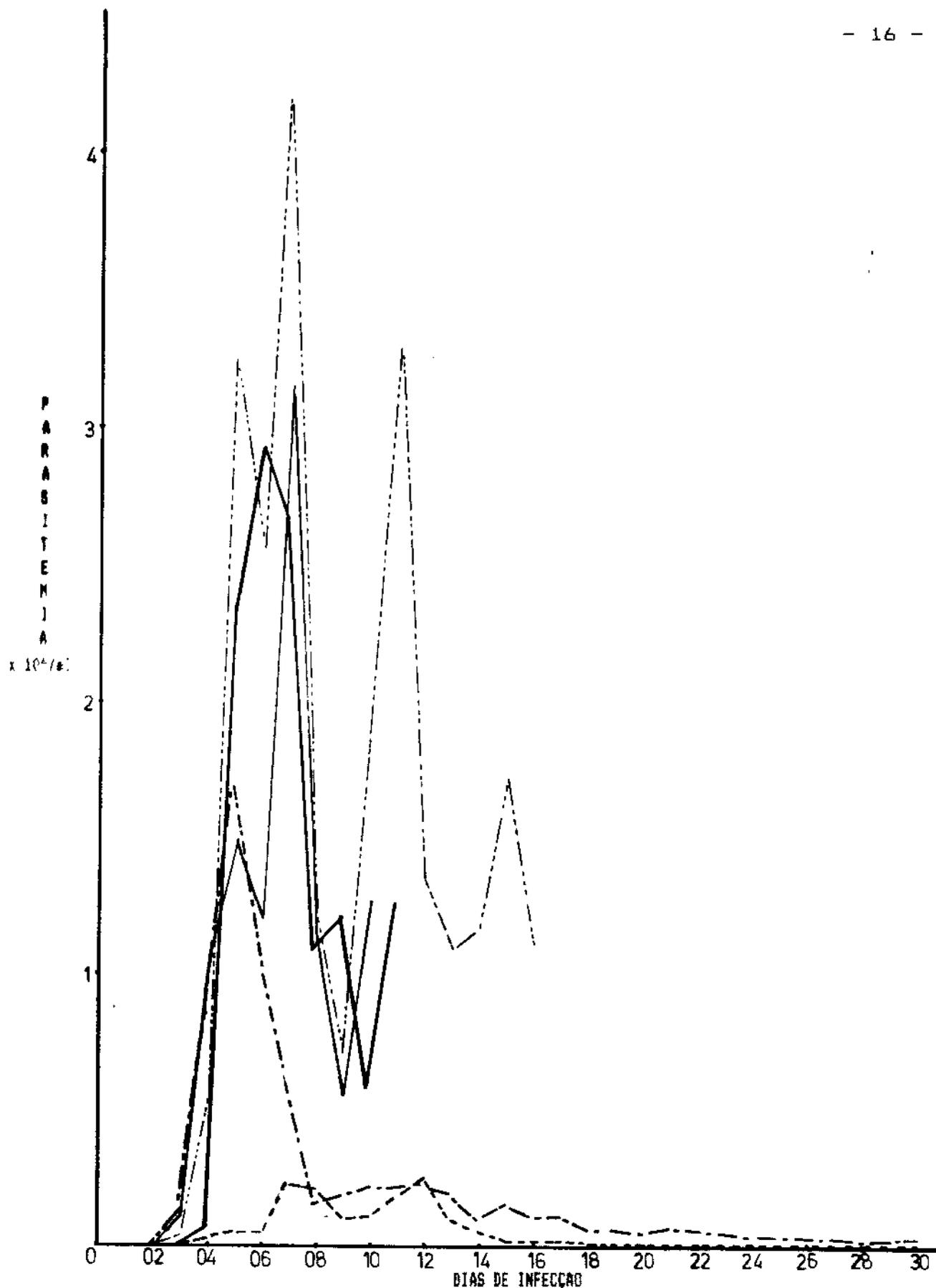


FIGURA 01. Comparação entre as Linhagens C57B1/10, CBA, BALB/c, Swiss e Híbridos (C57B1/10xBALB/c)F1, infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Linhagem e idade dos animais: (—) BALB/c, 90 dias; (---) CBA, 80 dias; (-.-.) C57B1/10, 70 dias; (-...-) Swiss, 60 dias; (----) Híbridos (C57B1/10xBALB/c)F1, 90 dias.

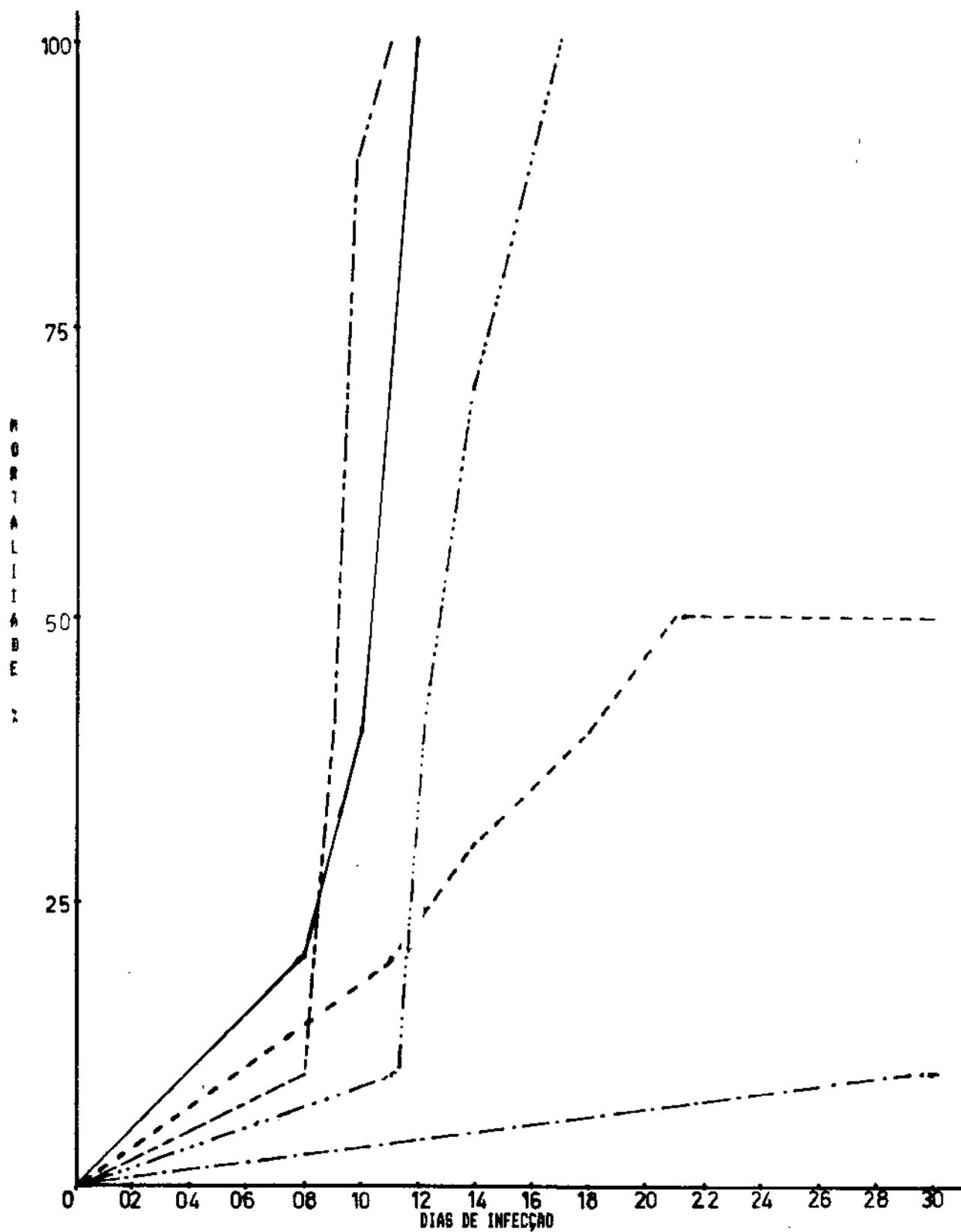


FIGURA 02. Comparação entre as Mortalidades das Linhagens C57Bl/10, CBA, BALB/c, Swiss e Híbridos (C57Bl/10xBALB/c)F1, infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Linhagem e idade dos animais: (____) BALB/c, 90 dias; (--____--) CBA, 80 dias; (-...-) Swiss, 60 dias; (-.-.-) Híbridos (C57Bl/10xBALB/c)F1, 90 dias; (----) C57Bl/10, 70 dias. n = 10 no início da experiência.

atingindo, os híbridos, a taxa de 20% ao final da experiência, enquanto os Swiss chegavam a 100% com 24 dias de infecção. Nos animais das linhagens CBA e BALB/c, a mortalidade sobreveio com 12 e 13 dias de infecção, respectivamente, atingindo, ambos, 100% de mortalidade; os primeiros, com 18 dias e estes últimos, 24 dias após a inoculação. Os camundongos C57BL/10, mostraram-se ligeiramente mais resistentes que as três linhagens anteriores, atingindo 70% de óbitos com 30 dias de experimentação. Os dois híbridos testados, mostraram-se muito mais resistentes que as demais linhagens infectadas com o mesmo inóculo.

As curvas de parasitemia e a mortalidade dos animais inoculados com 1.000 tripomastigotas são mostradas nas Figuras 5 e 6. O período pré-patente foi de 3 dias para os camundongos BALB/c e Swiss, 4 dias para CBA e C57BL/10 e 6 dias para os híbridos (C57BL/10xCBA)F1. Os picos parasitêmicos iniciais ocorreram no oitavo dia para os animais das linhagens BALB/c, Swiss e C57BL/10, no nono para (C57BL/10xCBA)F1 e no décimo para os camundongos CBA (Figura 5). Nenhuma diferença significativa foi observada nas parasitemias dos camundongos BALB/c, C57BL/10, CBA e Swiss. Os híbridos mostraram os menores índices parasitêmicos, significativamente diferente ($P < 0.05$) dos demais camundongos ensaiados. Todas as linhagens, com exceção da Swiss, controlaram a parasitemia antes do fim da experiência.

A taxa de mortalidade dos animais infectados com 1.000 tripomastigotas foi de 100% para os camundongos Swiss, 80% para os BALB/c, 50% para os CBA e C57BL/10 e de apenas

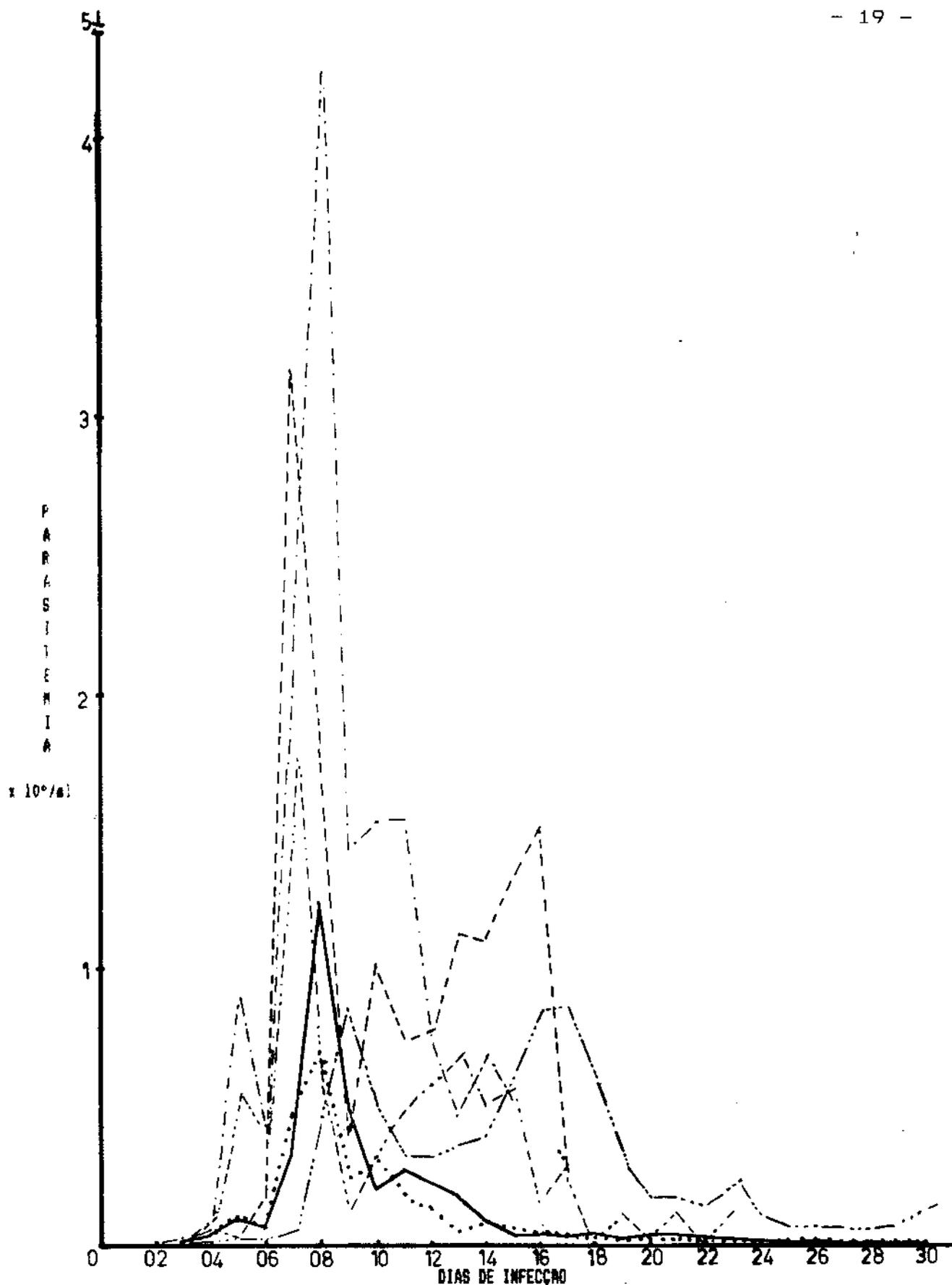


FIGURA 03. Comparação entre as Linhagens C57Bl/10, BALB/c, CBA, Swiss e Híbridos (C57Bl/10xBALB/c)F1 e (C57Bl/10xCBA)F1 infectados com 10.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Linhagem e idade dos animais: (----) CBA, 90 dias; (____) Híbrido (C57Bl/10xBALB/c)F1, 85 dias; (....) Híbrido (C57Bl/10xCBA)F1, 90 dias; (-...-) C57Bl/10, 70 dias; (-.-.-) Swiss, 85 dias; (---...---) BALB/c, 90 dias.

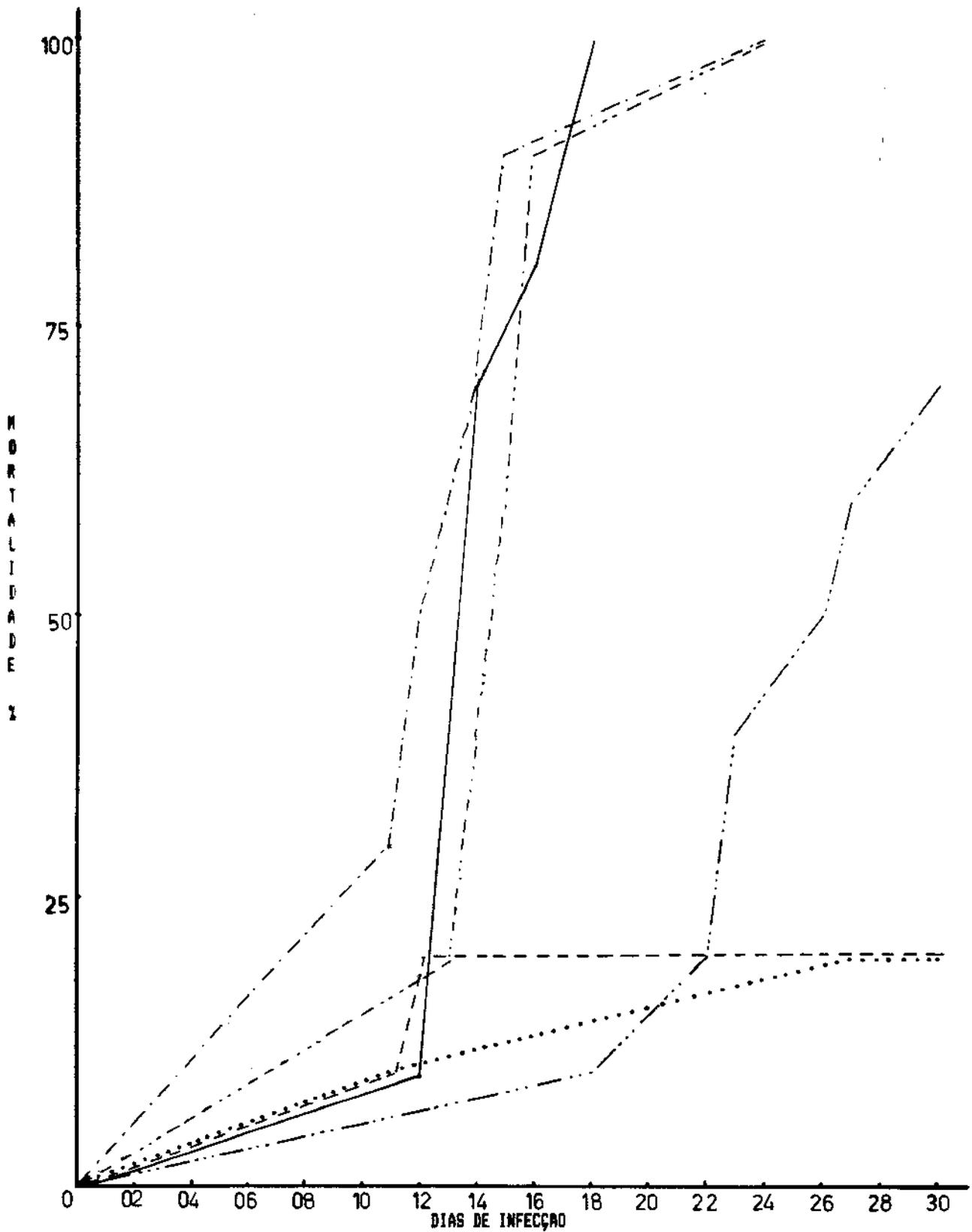


FIGURA 04. Comparação entre as Mortalidades das Linhagens C57B1/10, BALB/c, CBA, Swiss e Híbridos (C57B1/10xBALB/c)F1 e (C57B1/10xCBA)F1, infectados com 10.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Linhagem e idade dos animais: (____) CBA, 90 dias; (.....) Híbrido (C57B1/10xBALB/c)F1, 85 dias; (----) Híbrido (C57B1/10xCBA)F1, 90 dias; (-...-) C57B1/10, 70 dias; (-.-.-) Swiss, 85 dias; (-...-.-) BALB/c, 90 dias. n = 10 no início da experiência.

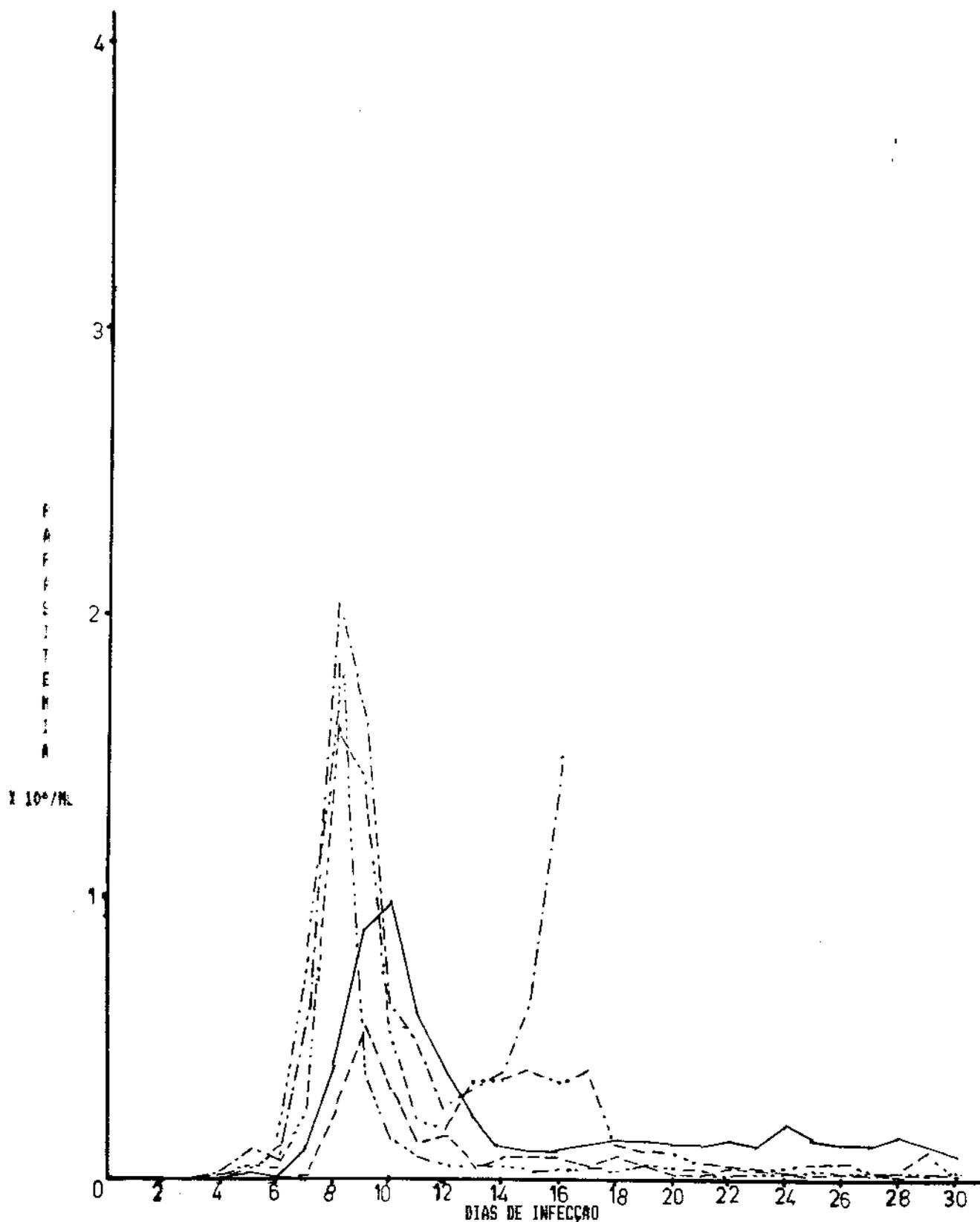


FIGURA 05. Comparação entre as Parasitemias das Linhagens C57Bl/10, BALB/c, CBA, Swiss e Híbridos (C57Bl/10xCBA)F1, infectados com 1.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Linhagem e idade dos animais: (—) CBA, 90 dias; (---) Híbrido (C57Bl/10xCBA)F1, 90 dias; (-.-.-) C57Bl/10, 90 dias; (-.-.-) Swiss, 80 dias; (-.-.-.-) BALB/c, 90 dias. n = 10 no início da experiência.

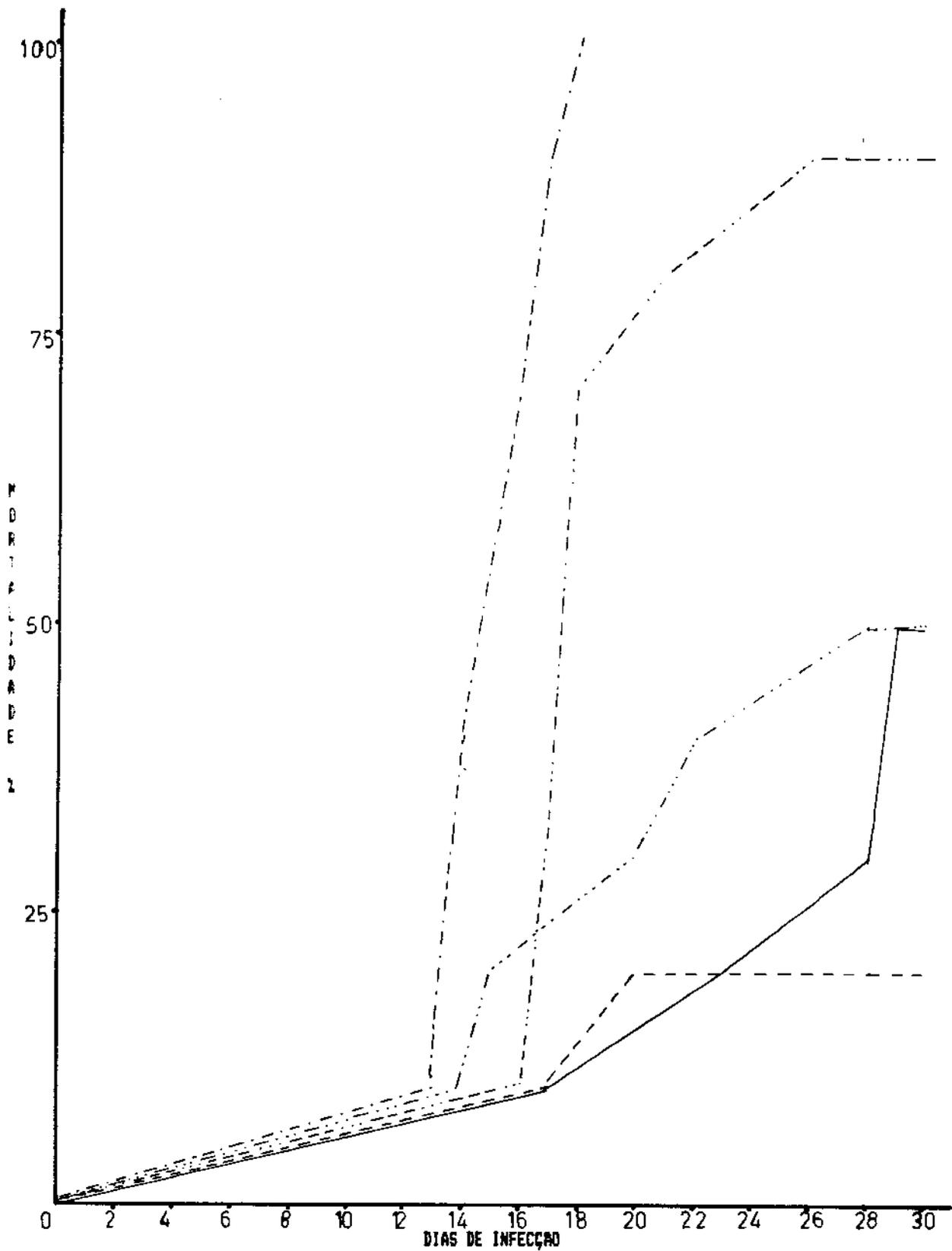


FIGURA 06. Comparação entre as Mortalidades das Linhagens C57Bl/10, BALB/c, CBA, Swiss e Híbridos (C57Bl/10xCBA)F1, infectados com 1.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Linhagem e idade dos animais: (____) CBA, 90 dias; (----) Híbrido (C57Bl/10xCBA)F1, 90 dias; (-.-.-) C57Bl/10, 90 dias; (-.-.-) Swiss, 80 dias; (---...---) BALB/c, 90 dias. n = 10 no início da experiência.

20%, para os híbridos (C57BL/10xCBA)F1, até o fim do ensaio, que também com este inóculo, mostraram-se mais resistentes que as demais linhagens testadas (Figura 6).

Com o inóculo de 100 tripanosomas, foram comparadas as linhagens BALB/c, C57BL/10 e Swiss. As curvas de parasitemia e a sobrevivência destes animais são mostradas na Figura 7. O período pré-patente foi de 5 dias para os camundongos BALB/c, 6 para os Swiss e 7 dias para os C57BL/10. Os picos de parasitemia máxima ocorreram no nono dia, para os camundongos C57BL/10 e só com 11 dias de infecção, para as outras duas linhagens. Nenhuma diferença significativa foi observada nas parasitemias das 3 linhagens testadas.

As taxas de sobrevivência destes animais são mostradas na Figura 7. Os camundongos Swiss mostraram mortalidade mais precoce (10%, com 16 dias de infecção), seguidos pelos BALB/c (10%, 19 dias após a inoculação). Ao cabo da experiência, os animais da linhagem BALB/c apresentaram 30% de sobrevivência, os Swiss, 40%, enquanto todos os camundongos C57BL/10 sobreviveram à fase aguda da infecção.

A comparação dos períodos pré-patentes, parasitemia e mortalidade de machos e fêmeas, das diferentes linhagens de camundongos testadas com esta cepa, não forneceu resultados conclusivos, que pudessem demonstrar uma resistência maior de um dos sexos.

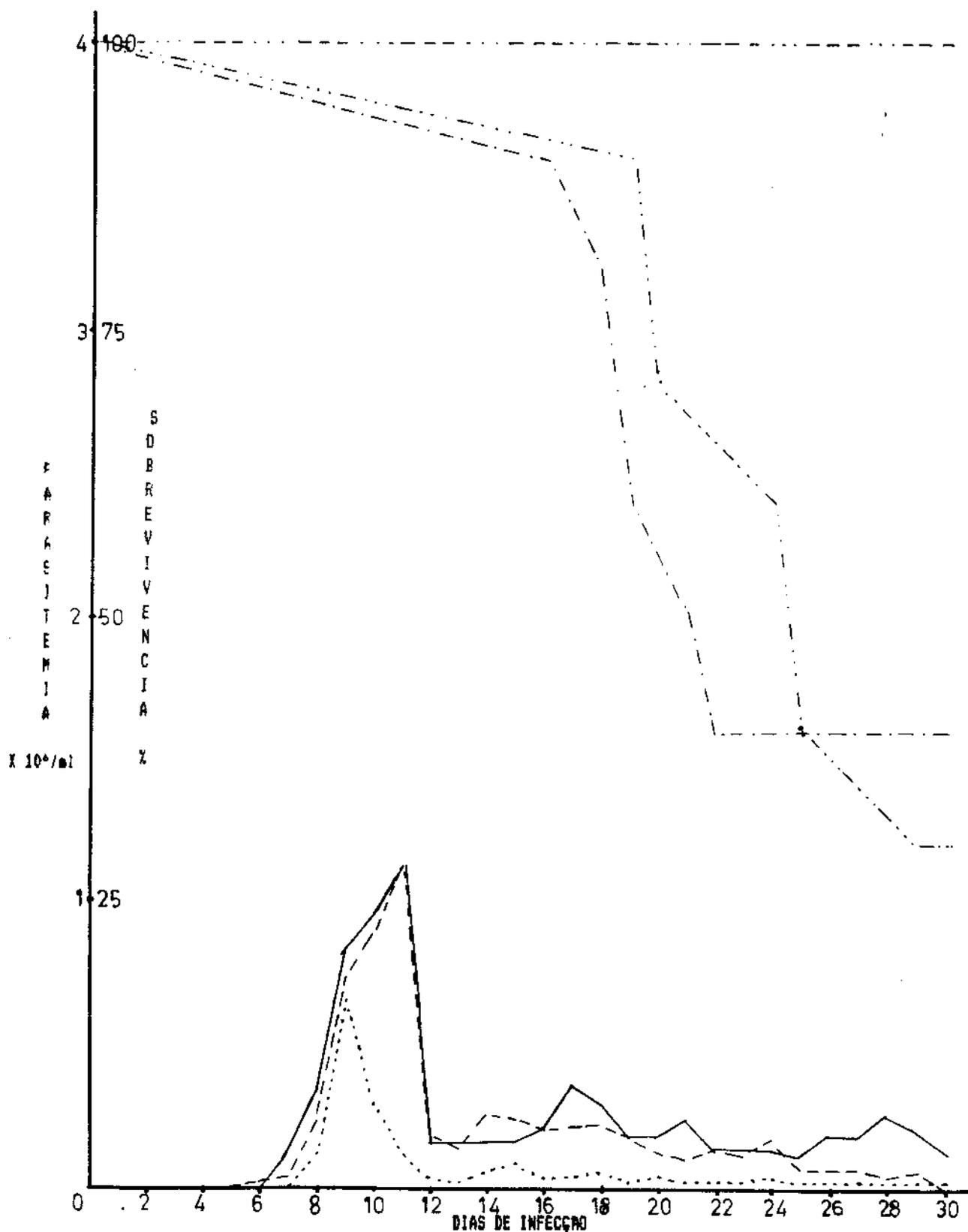


FIGURA 07. Comparação entre as Parasitemias e a Sobrevivência das Linhagens BALB/c, C57Bl/10 e Swiss, infectadas com 100 tripomastigotas do *Tripanosoma cruzi*, cepa Y. Linhagem e idade dos animais: parasitemia: (—) Swiss, 60 dias; (---) BALB/c, 60 dias; (....) C57Bl/10, 90 dias. Sobrevivência: (-.-.-) Swiss; (-...-) BALB/c; (-...-.-) C57Bl/10. n = 10 no início da experiência.

1.2. Camundongos Swiss - comparação entre idades

Observamos, algumas vezes, durante estas experiências, parasitemias ou mortalidades maiores em grupos de animais infectados com inóculos menores, que um outro grupo de sua mesma linhagem. Como a diferença entre estes grupos residia na idade, resolvemos, em um experimento isolado, verificar a importância deste fato.

Camundongos Swiss, com 1 mês e 2 meses de idade, foram infectados com um mesmo inóculo e acompanhados até a mortalidade dos dois grupos. A Figura 8 sumariza os resultados obtidos. Os animais com 1 mês de idade, apresentaram uma altíssima parasitemia, com a mortalidade atingindo 100%, já no décimo dia da infecção. No grupo com 2 meses, a parasitemia foi significativamente menor ($P < 0.05$), a mortalidade sobrevindo com 12 dias de infecção, sendo total com 17 dias de experimentação. Não houve diferença significativa no período pré-patente dos dois grupos.

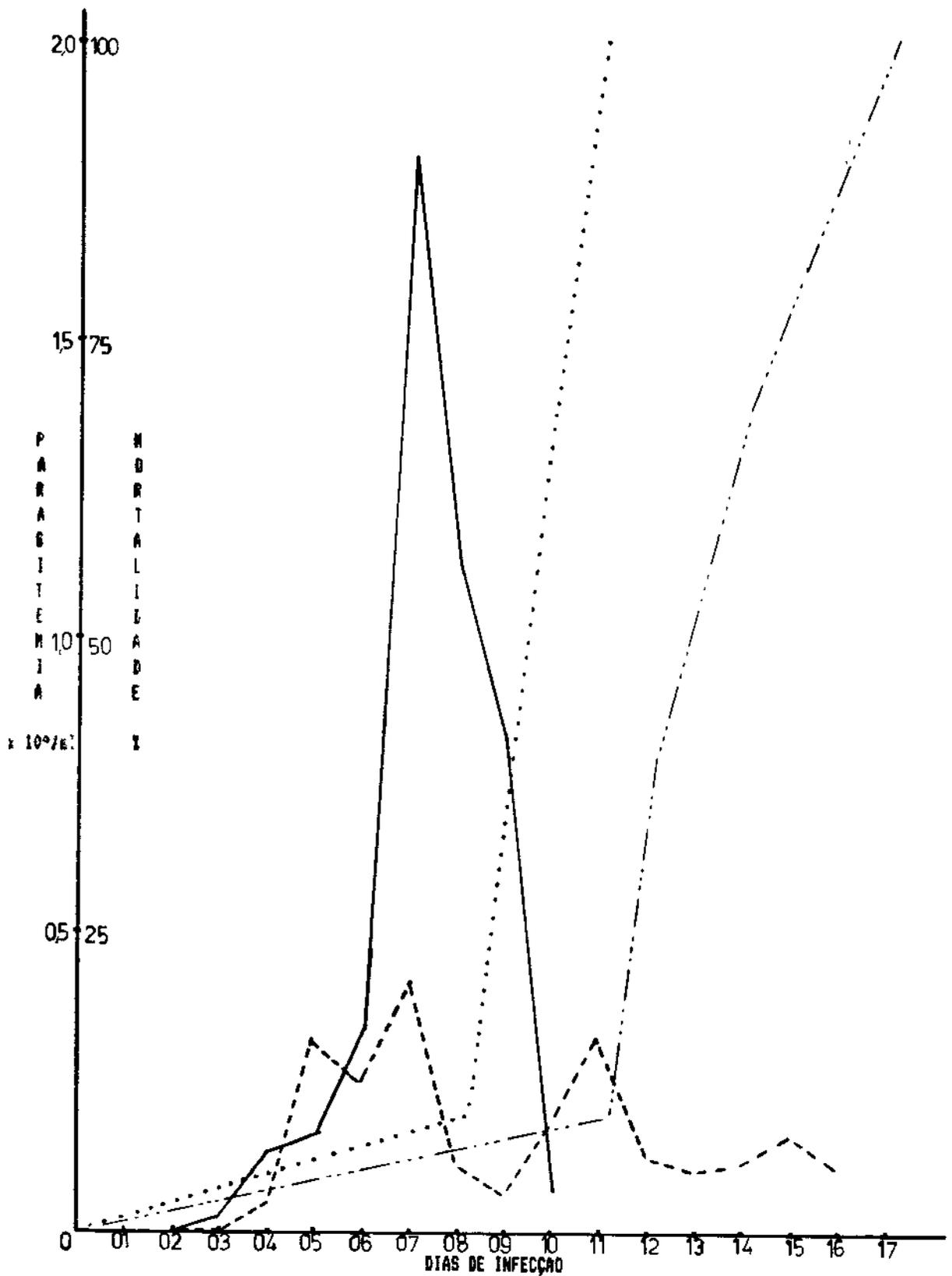


FIGURA 08. Parasitemia e Mortalidade de Camundongos Swiss, infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Comparação entre camundongos de diferentes idades. 1 mês de idade: parasitemia: (____); mortalidade: (.....); 2 meses de idade: parasitemia: (----); mortalidade: (-....-). n = 10 no início da experiência.

II. *Trypanosoma cruzi* - cepa CL

1. Parasitemia, Período Pré-Patente e Mortalidade

O decurso da infecção com a cepa CL do *Trypanosoma cruzi*, foi verificado nas diferentes linhagens de camundongos estudadas. Salvo quando especificado no texto, lotes de 10 camundongos (5 machos e 5 fêmeas), foram infectados, intraperitonealmente, com inóculos variando de 1.000 à 100.000 tripomastigotas. A parasitemia foi acompanhada diariamente, durante 30 dias, sendo verificado neste intervalo o período pré-patente e a mortalidade dos grupos experimentais testados.

1.1. Comparação entre Linhagens de Camundongos

Comparamos o comportamento das diversas linhagens de camundongos, infectadas com diferentes inóculos do *Trypanosoma cruzi*, cepa CL. A Figura 9 mostra as curvas

de parasitemia dos camundongos CBA, C57BL/10, BALB/c, Swiss, e híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1, inoculados com 100.000 tripomastigotas.

Em todas as linhagens foram detectados parasitos circulantes, desde o primeiro dia da infecção, o que dificultou a determinação do período pré-patente. Entretanto, observamos que a parasitemia nestes animais, começou a ascender entre o quarto e o sexto dias e atingiu níveis extremamente elevados, nos camundongos Swiss, com um pico de parasitemia máxima ocorrendo com 12 dias de infecção, quando o nível de parasitos circulantes começou a decrescer.

A linhagem CBA apresentou uma parasitemia crescentiforme, enquanto os camundongos BALB/c mostravam uma curva parasitêmica, caracterizada pela presença de sucessivos picos, com um pico máximo ocorrendo com 15 dias de infecção.

Dentre as linhagens estudadas, a C57BL/10 mostrou o menor índice parasitêmico, durante a maior parte da experimentação, com o máximo de parasitemia ocorrendo já no fim do ensaio. Os híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1, apresentaram uma parasitemia relativamente baixa, com um pico parasitêmico máximo ocorrendo com 22 dias de infecção, quando estes animais controlaram a onda parasitêmica.

Os camundongos Swiss, apresentaram parasitemia significativamente maior ($P < 0.05$), que todas as outras linhagens testadas. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0.05$), entre os níveis parasitêmicos dos camundongos CBA e BALB/c, entretanto, estes últimos

apresentaram uma parasitemia ligeiramente menor. Os animais C57BL/10, mostraram parasitemia de nível menor que os anteriores e os híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1, dos animais testados com este inóculo, foram os únicos que controlaram a parasitemia e chegaram ao fim da experiência, com níveis baixos de parasitos circulantes.

A mortalidade destes animais é mostrada na Figura 10. A infecção foi fatal para todas as linhagens, com exceção dos híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1, onde um pequeno número de supérstites (30%) passou para a fase crônica, sem nenhum sinal aparente de infecção.

As linhagens CBA, BALB/c e Swiss, apresentaram uma curva de mortalidade muito semelhante, enquanto os camundongos C57BL/10, mostraram-se mais resistentes, embora apresentassem também uma infecção de decurso fatal.

Os camundongos Swiss e CBA foram também ensaiados com inóculos de 10.000 tripomastigotas. A progressão da infecção foi comparada, nas duas linhagens, estando estes resultados sintetizados na Figura 11. Os camundongos Swiss, apresentaram um período pré-patente de 6 dias, ao fim do qual, a parasitemia elevou-se, atingindo um pico com 16 dias de infecção, quando a curva de parasitemia tornou-se descendente. Estes animais não conseguiram controlar a parasitemia, que voltou a elevar-se, configurando-se, a partir de então, por ascensões e quedas dos níveis de parasitos circulantes. Não foram realizadas as contagens de parasitos, nos dois últimos dias da experiência, uma vez que os animais sobreviventes, apresentaram necrose na cauda, impossibilitando a retirada de sangue para exame.

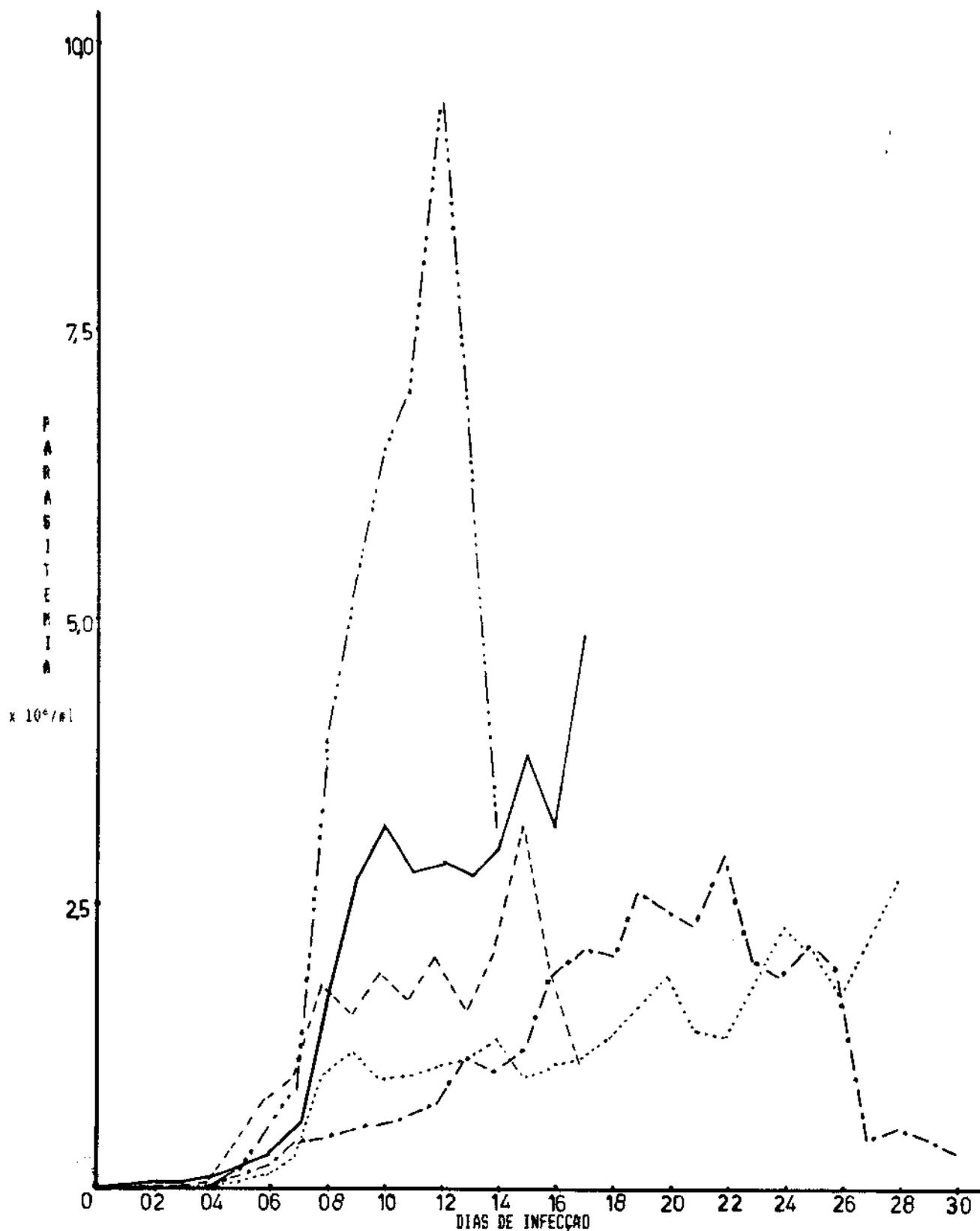


FIGURA 09. Comparação entre as Linhagens BALB/c, C57B1/10, CBA, Swiss e Híbridos (C57B1/10xBALB/c)F1, infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Cl. Linhagem e idade dos animais: (—) CBA, 90 dias; (----) BALB/c, 90 dias; (.....) C57B1/10, 70 dias; (-.-.-) Swiss, 60 dias; (-.-.-) Híbridos (C57B1/10xBALB/c)F1, 60 dias. n = 10 no início da experiência.

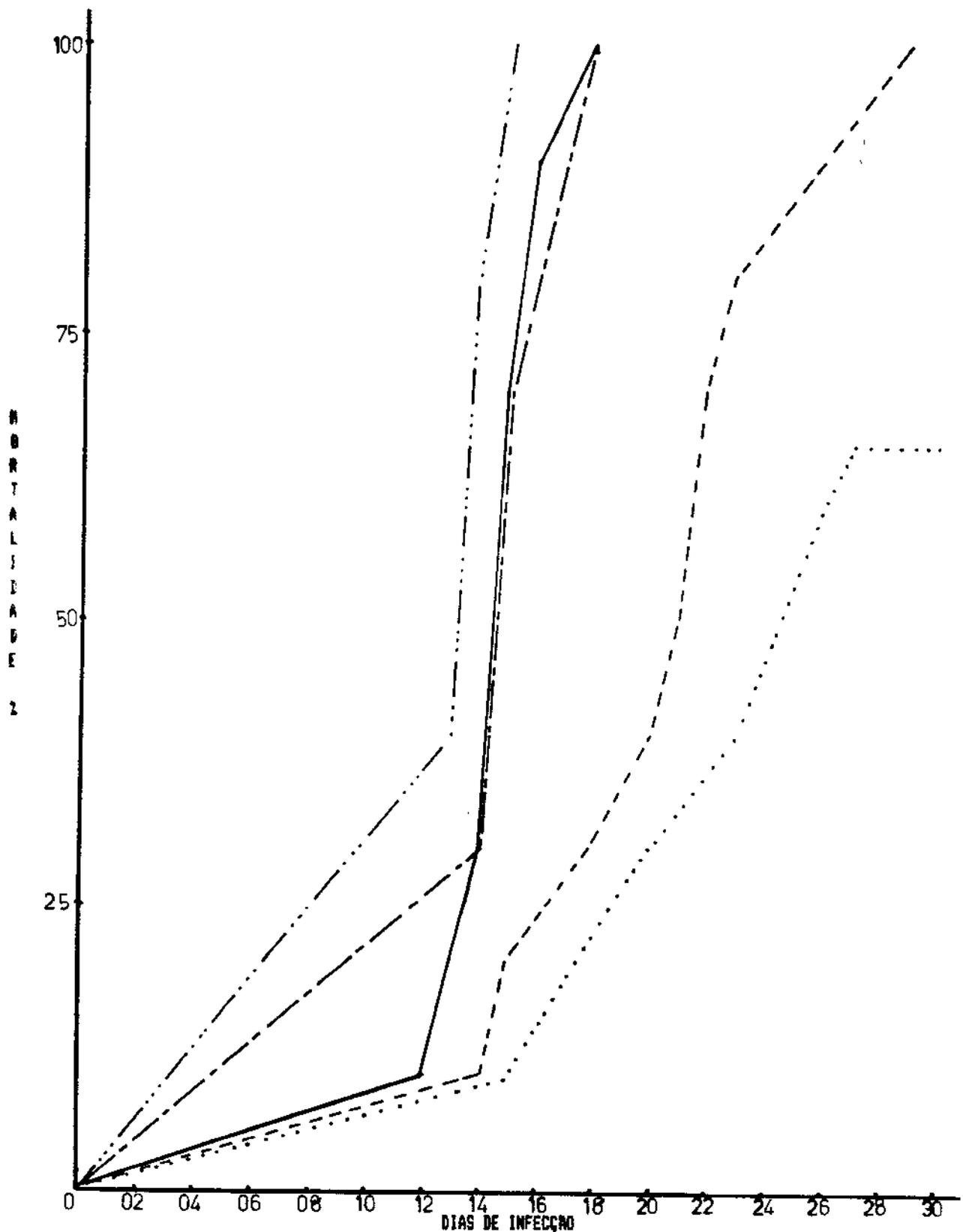


FIGURA 10. Comparação entre as Mortalidades das Linhagens BALB/c, C57B1/10, CBA, Swiss e Híbridos (C57B1/10xBALB/c)F1 infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa CL. Linhagem e idade dos animais: (____) BALB/C, 90 dias; (_____) CBA, 90 dias; (----) C57B1/10, 70 dias; (-.-.-) Swiss, 60 dias; (....) Híbridos (C57B1/10xBALB/c)F1, 60 dias. n= 10 no início da experiência.

Nos camundongos CBA, o período pré-patente foi de 7 dias e a parasitemia que teve lugar, a partir de então, caracterizou-se por uma ascensão lenta e gradual, cujos níveis máximos ocorreram no fim da experimentação. No terço médio da experiência, estes camundongos mostraram parasitemia significativamente menor ($P < 0.05$), que os Swiss, não havendo diferenças significativas no terço final do ensaio.

A mortalidade foi maior e mais precoce nos Swiss, que mostraram, no fim da experiência, 70% de óbitos, enquanto nos camundongos CBA, a taxa de mortalidade atingiu 40% ($P > 0.05$).

O estudo comparativo dos períodos pré-patentes, parasitemia e mortalidade de machos e fêmeas, das diferentes linhagens de camundongos testadas com esta cepa, não forneceu resultados conclusivos sobre uma maior resistência de um dos sexos.

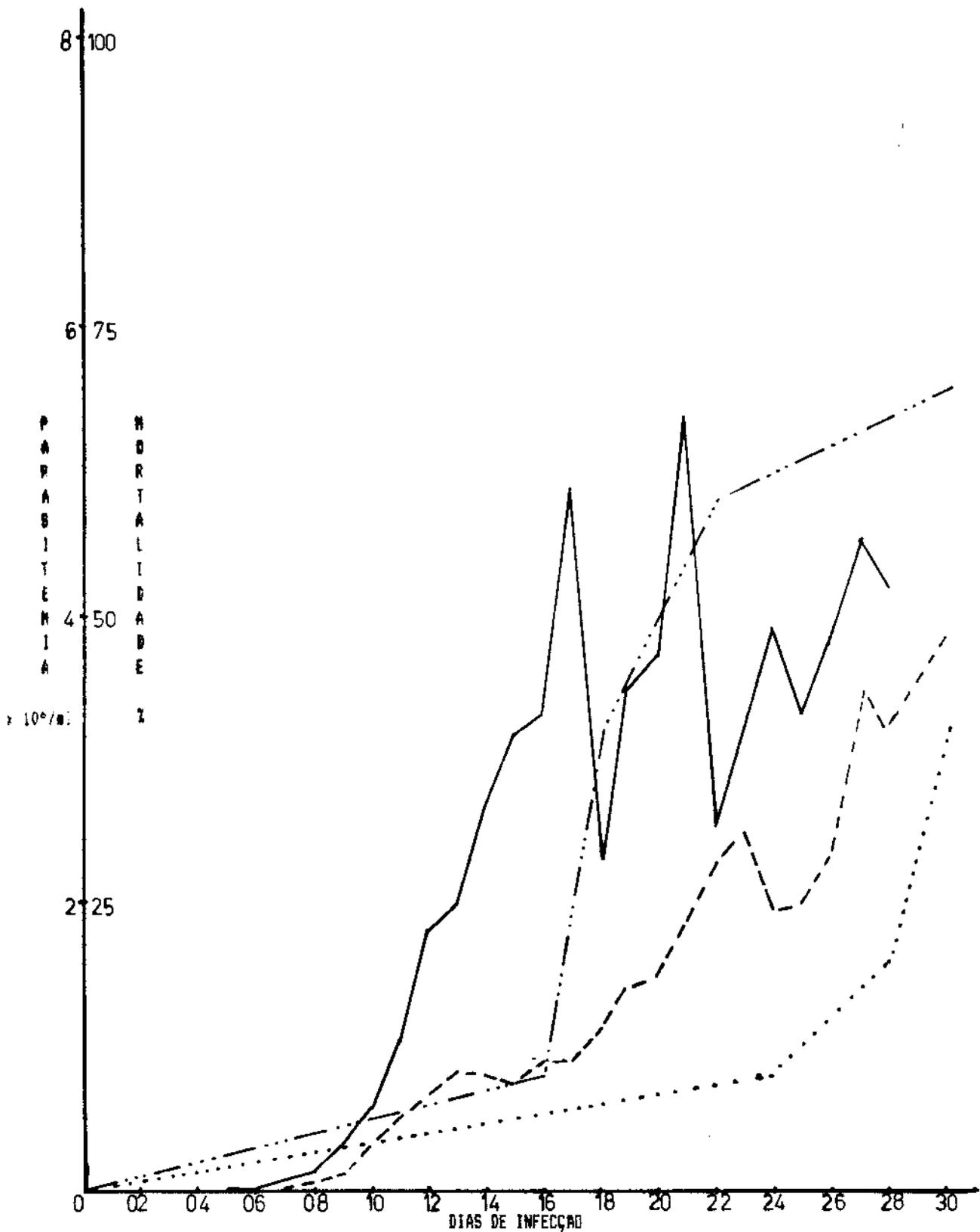


FIGURA 11. Comparação entre as Parasitemias e Mortalidades das Linhagens Swiss e CBA, infectadas com 10.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Parasitemia e idade dos animais: (—) Swiss, 60 dias; (----) CBA, 90 dias. Mortalidade (-...-) Swiss; (.....) CBA. n = 10 no início da experiência.

III. Comparação entre as Cepas Y e CL do *Trypanosoma cruzi*

Comparamos os resultados obtidos numa mesma linhagem de camundongos, inoculada com as cepas Y ou CL do *Trypanosoma cruzi*. Procuramos verificar se haviam diferenças nos períodos pré-patentes, parasitemias e mortalidades destes animais, quando submetidos a um mesmo inóculo das duas cepas do *Trypanosoma cruzi* em estudo. As Figuras 12 à 18, resumem as observações feitas com um inóculo de 100.000 tripomastigotas.

A Figura 12 mostra os resultados obtidos com a linhagem BALB/c. O período pré-patente foi de 3 dias para a cepa Y e de 4 dias para a cepa CL. A parasitemia com a cepa Y, ascendeu bruscamente, a partir do quarto dia e atingiu o seu máximo, no sexto dia, quando o nível de parasitos circulantes começou a cair e as primeiras mortes surgiram neste grupo.

A parasitemia causada pela cepa CL, ascendeu mais lentamente, a partir do quarto dia e atingiu o máximo com 15

dias de infecção. A mortalidade foi total nos dois grupos, sendo mais precoce nos camundongos inoculados com a cepa Y, com os primeiros animais perecendo, já no oitavo dia de infecção, e a taxa de mortalidade chegando a 100% com 12 dias de experimentação.

No grupo inoculado com a cepa CL, a mortalidade iniciou-se com 12 dias de infecção, mostrando uma curva de ascensão rápida que atingiu 100% com 18 dias de experiência.

Os resultados obtidos na linhagem CBA, são mostrados na Figura 13. A parasitemia começou a elevar-se a partir do terceiro dia, nos animais inoculados com a cepa Y, apresentando um primeiro pico no quinto dia e um pico de parasitemia máxima no sétimo dia, quando a onda parasitêmica foi controlada. Uma nova onda de parasitos circulantes começou a surgir no nono dia, levando à morte os animais deste grupo.

Com a cepa CL, a parasitemia apresentou uma elevação mais gradual, a partir do quarto dia, e manteve-se em ascensão até o décimo dia, quando os animais tentaram controlar a onda parasitêmica. Uma nova leva de parasitos circulantes surgiu, a partir de então, levando à morte os animais sobreviventes.

A mortalidade causada pela cepa Y ocorreu mais prematuramente, sobrevivendo já no oitavo dia e atingindo 100% com 11 dias de infecção enquanto no grupo inoculado com a cepa CL, a mortalidade começou a ocorrer com 14 dias de infecção e chegou a 100% com 18 dias de experimentação. Não houve, portanto, uma diferença significativa na mortalidade desta linhagem, em relação as duas cepas estudadas.

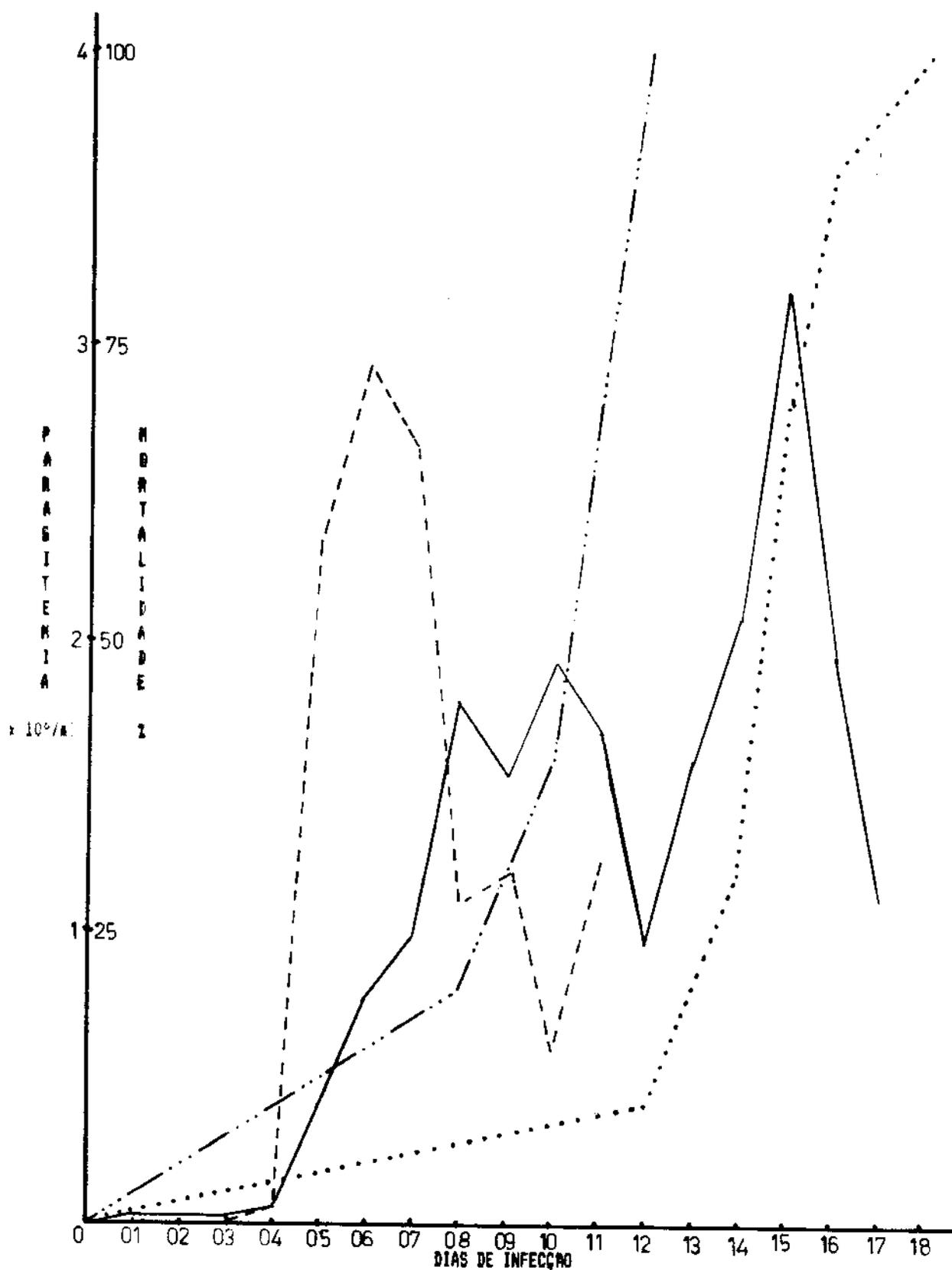


FIGURA 12. Comparação entre as Parasitemias e as Mortalidades de Camundongos BALB/c, infectados com 100.000 tripomastigotas das Cepas Y ou CL do *Trypanosoma cruzi*. Parasitemia e idade dos animais: (----) Y, 90 dias; (—) CL, 60 dias. Mortalidade: (-...-) Y; (.....) CL. n = 10 no início da experiência.

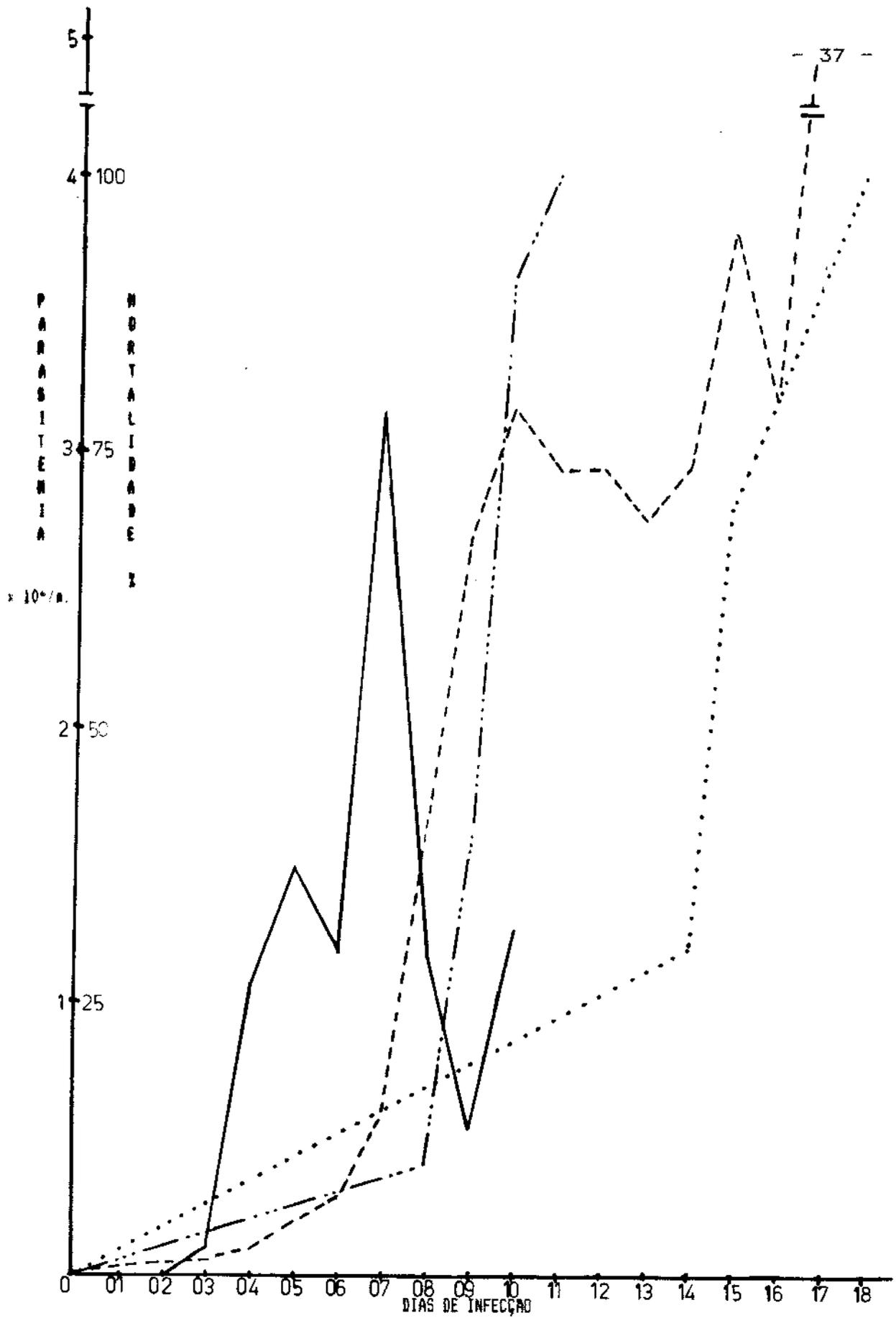


FIGURA 13. Comparação entre as Parasitemias e as Mortalidades de Camundongos CBA, infectados com 100.000 tripomastigotas das Cepas Y ou Cl do *Trypanosoma cruzi*. Parasitemia e idade dos animais: (—) Y, 80 dias; (----) CL, 90 dias. Mortalidade: (-...-) Y; (....) CL. n = 10 no início da experiência.

O estudo comparativo feito com a linhagem C57BL/10, é mostrado na Figura 14. O período pré-patente foi de 2 dias, para a cepa Y, a partir do qual a parasitemia elevou-se bruscamente, apresentando um pico de nível parasitêmico máximo, no quinto dia, quando a onda de parasitos circulantes foi controlada e manteve-se em níveis baixos, até o fim da experiência.

No grupo inoculado com a cepa CL, a parasitemia começou a aumentar a partir do sexto dia, configurando-se por uma sucessão de picos de níveis parasitêmicos cada vez maiores.

A mortalidade, nesta linhagem, iniciou-se com 11 dias, para a cepa Y e com 14 dias para a cepa CL, atingindo 100% nos animais inoculados com esta última cepa e, 50% nos camundongos infectados com a cepa Y, mostrando uma resistência aparentemente maior, desta linhagem, para a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*.

Os resultados obtidos nos camundongos Swiss, são apresentados na Figura 15. O período pré-patente foi de 3 e 4 dias, respectivamente, para as cepas Y e CL. A parasitemia dos animais inoculados com a cepa Y, mostrou um primeiro pico no quinto dia, seguido por outro de máxima parasitemia no sétimo dia, quando o nível de parasitos circulantes decresceu. Seguiu-se uma nova onda parasitêmica de menor intensidade, que foi controlada pelos animais, ao redor da segunda semana de infecção.

A parasitemia da cepa CL, apresentou uma discreta elevação, entre o quarto e o sétimo dia, quando uma ascensão acentuada teve início, ocorrendo um pico máximo com 12 dias.

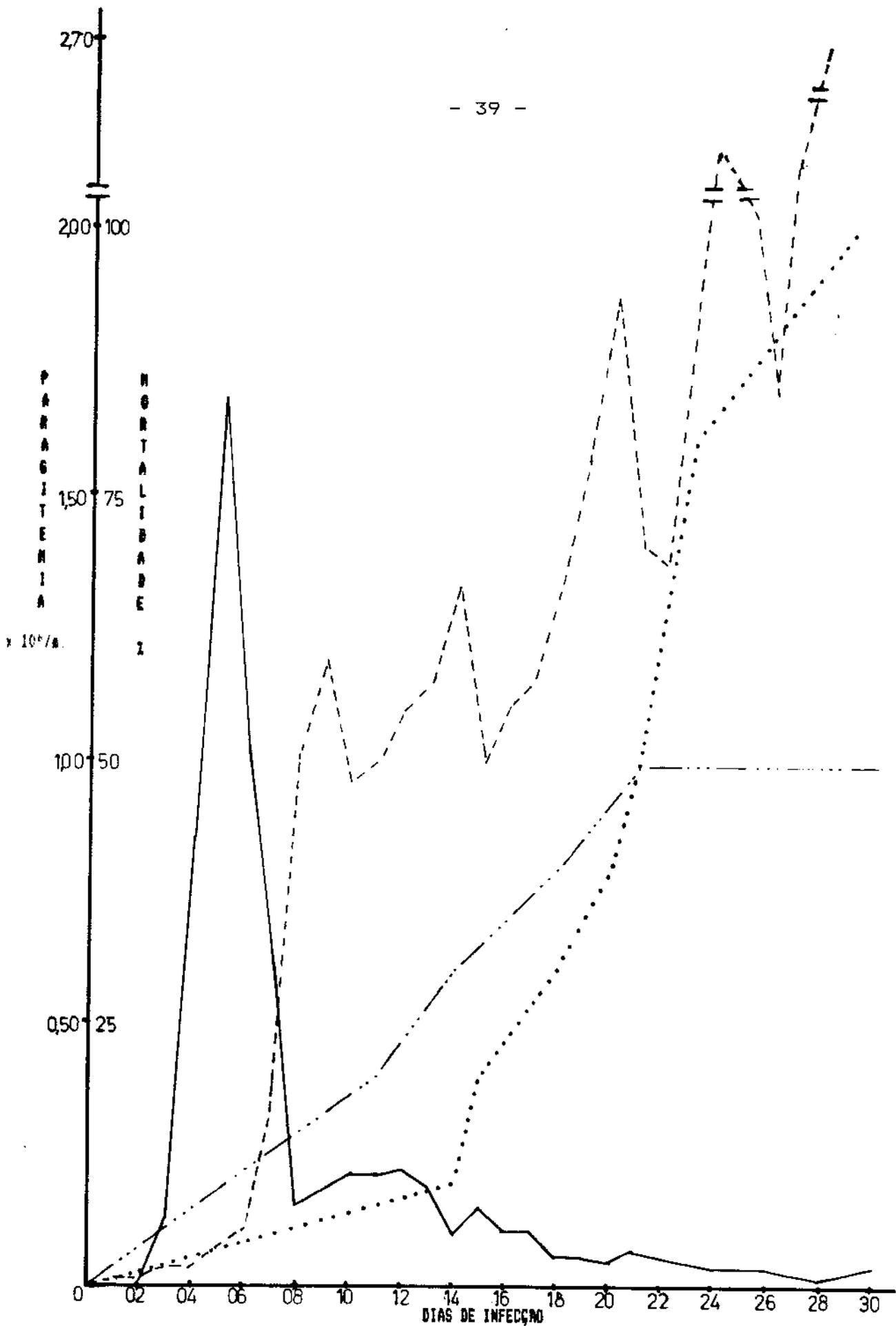


FIGURA 14. Comparação entre as Parasitemias e as Mortalidades de Camundongos C57B1/10, infectados com 100.000 tripomastigotas das Cepas Y e CL do *Trypanosoma cruzi*. Parasitemia e idade dos animais: (____) Y, 80 dias ; (----) CL, 70 dias. Mortalidade: (-...-) Y; (....) CL. n = 10 no início da experiência.

A mortalidade foi completa nos dois grupos, iniciando-se mais precocemente no grupo inoculado com a cepa Y e atingindo 100% com 15 e 17 dias de infecção, nos animais inoculados, respectivamente, com a cepa CL e Y, não havendo, portanto, diferenças marcantes entre as duas cepas, para estes animais, com o inóculo utilizado.

Os camundongos híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1, apresentaram comportamentos significativamente diferentes ($P < 0.05$), durante a infecção com as duas cepas estudadas (Figura 16). Com a cepa Y, o nível de parasitemia foi muito baixo, com um primeiro pico ocorrendo com 7 dias e um segundo com 12 dias de infecção, quando a onda parasitêmica foi controlada, mantendo-se, a parasitemia, em níveis baixíssimos, até o fim da experiência.

Já com a cepa CL, a parasitemia manteve-se em elevação, até atingir um nível de parasitemia máximo com 22 dias de infecção, quando os animais sobreviventes controlaram a onda parasitêmica.

A mortalidade foi significativamente diferente para os dois grupos, chegando à 70% nos animais infectados com a cepa CL e somente à 10% naqueles que receberam a cepa Y como inóculo. Entretanto, nestes resultados devem ser inferidas as idades dos animais, que no grupo inoculado com a cepa Y era de 90 dias, enquanto nos animais infectados com a cepa CL era de 60 dias. Por outro lado, apesar da diferença de idades, os dois grupos de camundongos eram constituídos de animais adultos, com peso oscilando entre 25 e 30 gramas, formados por igual número de machos e fêmeas (5 animais de cada sexo, por grupo).

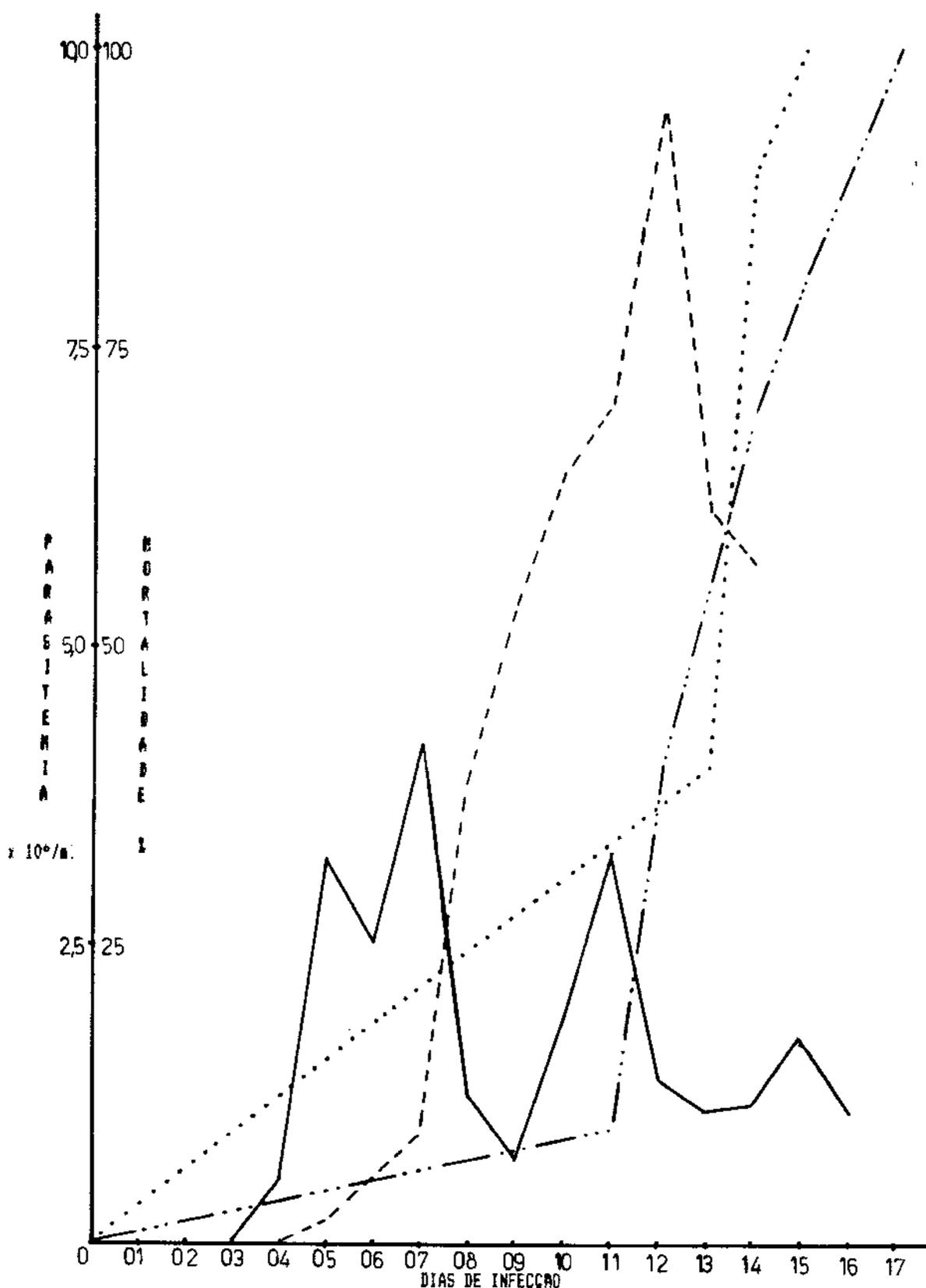


FIGURA 15. Comparação entre as Parasitemias e as mortalidades de Camundongos Swiss, infectados com 100.000 tripomastigotas das Cepas Y ou CL do *Trypanosoma cruzi*. Parasitemia e idade dos animais: (—) Y, 60 dias; (----) CL, 60 dias. Mortalidade: (-...-) Y; (....) CL. n = 10 no início da experiência.

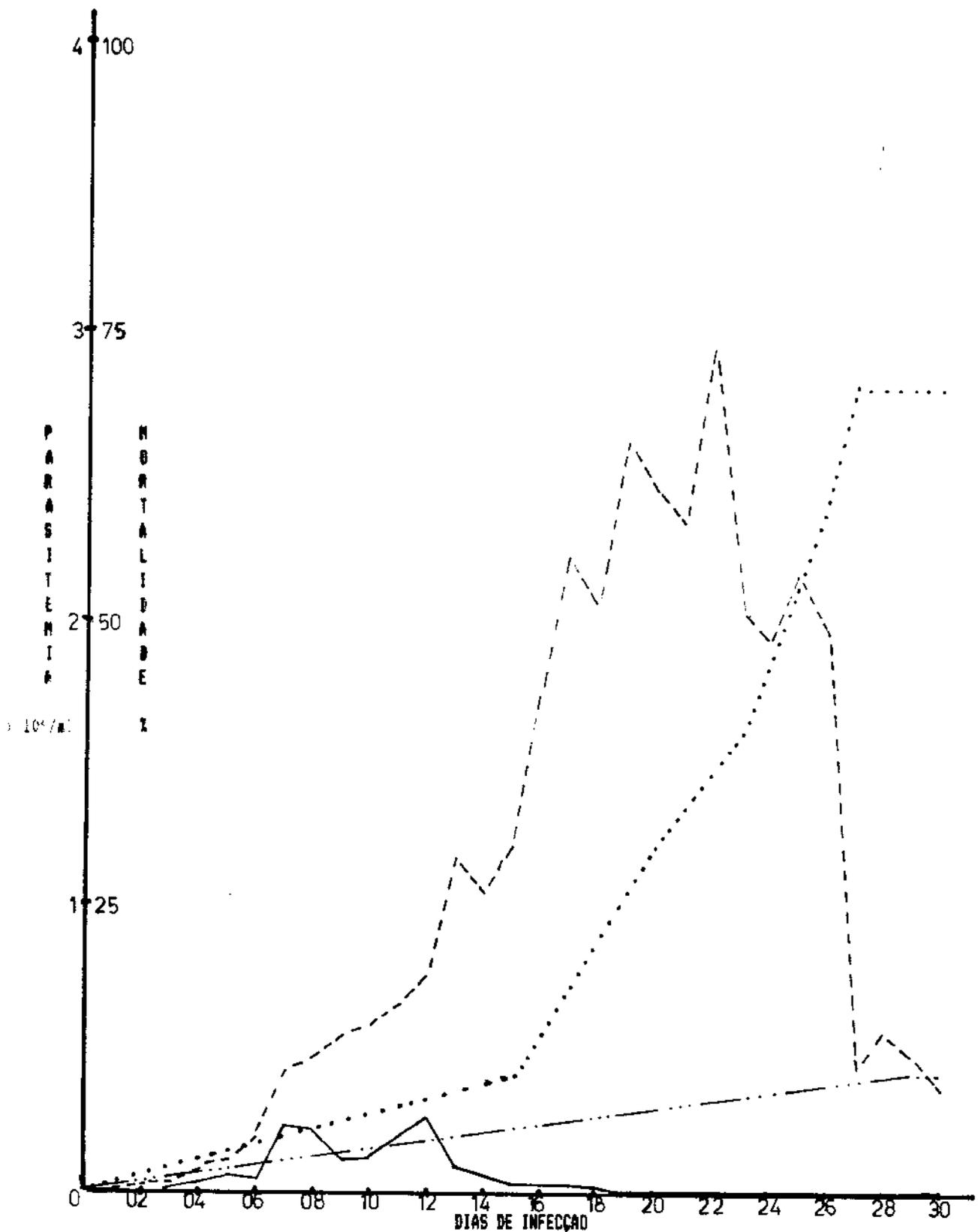


FIGURA 16. Comparação entre as Parasitemias e as Mortalidades de Camundongos Híbridos (C57B1/10xBALB/c)F₁, infectados com 100.000 tripomastigotas das Cepas Y ou CL do *Trypanosoma cruzi*. Parasitemia e idade dos animais: (—) Y, 90 dias; (---) CL, 60 dias. Mortalidade: (-...-) Y; (.....) CL. n = 10 no início da experiência.

A Figura 17 mostra o decurso da infecção em camundongos CBA, inoculados com 10.000 tripomastigotas das cepas Y ou CL. No grupo infectado com a cepa Y, um período pré-patente de 3 dias foi observado, ao qual seguiu-se uma curva de parasitemia, que apresentou pico máximo no sétimo dia. O número de parasitos circulantes decresceu até o nono dia, quando uma nova onda de parasitemia ocorreu, levando à morte os animais deste grupo.

O período pré-patente com a cepa CL, foi de seis dias, seguindo-se uma parasitemia de configuração sempre ascendente, até o término da experiência.

A mortalidade foi total nos animais inoculados com a cepa Y, iniciando-se com 12 dias de infecção e atingindo 100% com 18 dias de experiência, enquanto no grupo infectado com a cepa CL, atingiu 40% no fim do ensaio, mostrando, estes animais, uma maior suscetibilidade à cepa Y, no inóculo testado.

O desenvolvimento da infecção, na linhagem C57BL/10, foi comparada com um inóculo de 1.000 tripanosomas (Figura 18). Nos animais que recebem a cepa Y, o período pré-patente teve a duração de 3 dias, ao qual seguiu-se uma parasitemia de ascensão lenta, até o sexto dia, quando uma elevação abrupta ocorreu, até um pico máximo, verificado no oitavo dia da infecção. A partir de então, a onda parasitêmica foi controlada, apresentando os animais sobreviventes, baixos níveis de parasitos até o fim da experiência.

No grupo infectado com a cepa CL, o período pré-patente foi de 8 dias, seguindo-se uma parasitemia de

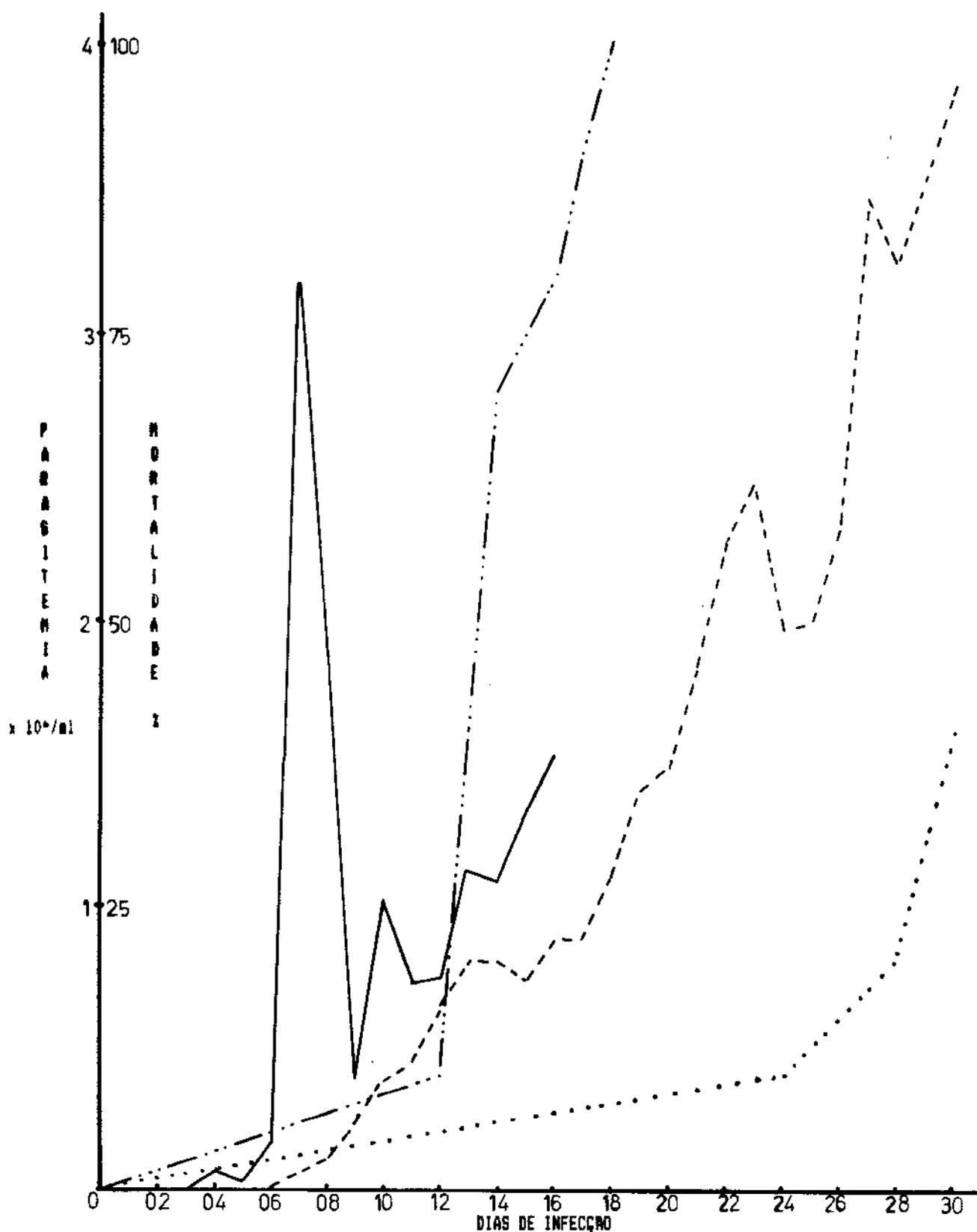


FIGURA 17. Comparação entre as Parasitemias e as Mortalidades de Camundongos CBA, infectados com 10.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Parasitemia e idade dos animais: (—) Y, 90 dias; (----) CL, 90 dias. Mortalidade: (-...-) Y; (.....) CL. n = 10 no início da experiência.

ascensão gradual, com níveis relativamente baixos de parasitos circulantes. Este grupo presentava 20% de mortalidade, com 28 dias de infecção, quando uma forte diarreia, seguida de prostração e inapetência ocorreu, levando à morte os animais sobreviventes.

A mortalidade nos animais infectados com a cepa Y sobreveio com 14 dias de infecção, chegando à 50% no fim da experiência.

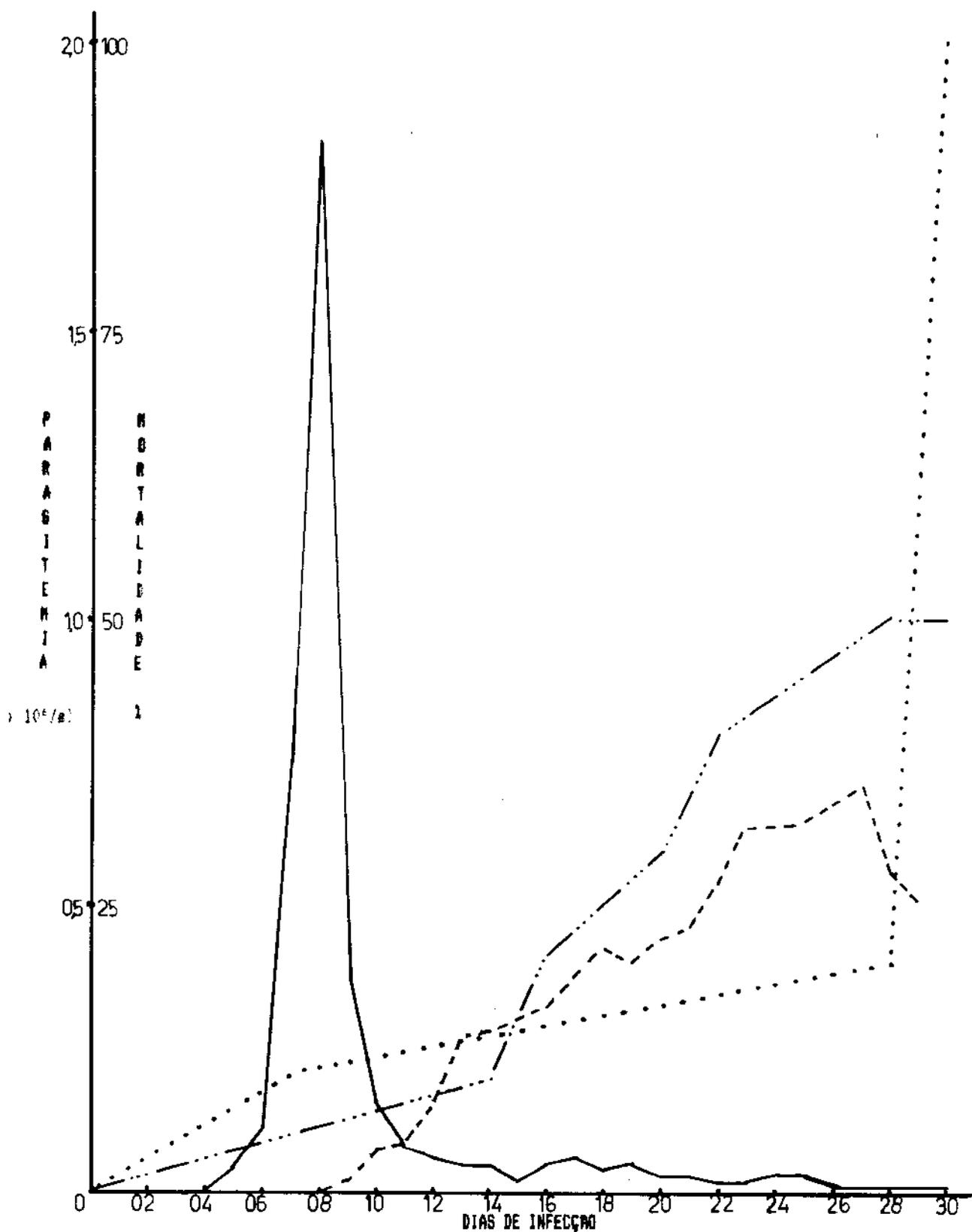


FIGURA 1B. Comparação entre as Parasitemias e as Mortalidades de Camundongos C57B1/10, infectados com 1.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Parasitemia e idade dos animais: (—) Y, 90 dias; (----) CL, 90 dias. Mortalidade: (-...-) Y; (.....) CL. n = 10 no início da experiência.

IV. Observações Hematológicas.

Com a finalidade de verificar as possíveis alterações hematológicas, no decurso da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, realizamos o hematócrito de algumas das linhagens de camundongos utilizadas nestas experiências e correlacionamos os resultados obtidos, com as curvas de mortalidade. Procuramos também verificar, em relação aos dados obtidos, se haviam diferenças entre as linhagens, entre machos e fêmeas de uma mesma linhagem e entre as cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas. Em algumas linhagens de camundongos, examinamos, diariamente, esfregaços de sangue corado, acompanhando as alterações da série vermelha.

Em todas as experiências, salvo se especificado no texto, utilizamos lotes de 10 animais, 5 machos e 5 fêmeas, de cada linhagem estudada e, diariamente, realizamos os hematócritos destes animais.

Os resultados destas observações, são sumarizados a seguir.

1. Comparação entre Hematócritos

Comparamos os resultados dos hematócritos das diversas linhagens de camundongos estudadas, infectadas com diferentes inóculos das cepas Y ou CL do *Trypanosoma cruzi*.

1.1. Camundongos C57BL/10 - cepa Y

Neste item, comparamos os hematócritos de camundongos C57BL/10, machos e fêmeas, infectados com diferentes inóculos da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. Os resultados são mostrados na Figura 19. Todos os animais estudados, apresentaram uma diminuição do percentual do hematócrito, logo no primeiro dia de infecção. Nos animais infectados com 10.000 tripomastigotas este decréscimo persistiu até o oitavo dia, quando uma ligeira recuperação ocorreu, seguida por uma nova queda do percentual, que atingiu o valor mínimo (17.50%), com 22 dias de infecção, quando a curva do hematócrito começou a ascender. A taxa de mortalidade neste grupo chegou a 70% ao fim da experiência.

O grupo inoculado com 1.000 tripanosomas apresentou uma curva em descenso, cujo valor mínimo (18.88%), ocorreu com 13 dias de infecção. A partir de então, os percentuais do hematócrito ascenderam, chegando a valores próximos dos normais. A mortalidade deste grupo foi de 50% ao cabo da experiência (Figura 19).

Os camundongos infectados com 100 parasitos, mostraram uma curva de hematócrito semelhante àquela dos

animais infectados com 1.000 tripomastigotas, embora de cinética ligeiramente diferente. Enquanto naqueles, o valor mínimo (18.88%), ocorreu com 13 dias de infecção, nestes, este valor (22.20%) ocorreu com 15 dias e, a partir de então, o percentual elevou-se para valores próximos dos normais. Nenhuma morte foi observada neste grupo, até o fim da experiência.

Em todas as experiências realizadas para acompanhar o hematócrito dos animais infectados, consideramos como valores normais, aqueles obtidos dos camundongos de cada linhagem, no dia "zero" da infecção. Neste grupo, acompanhamos o hematócrito de camundongos normais durante 30 dias, prazo pré-estabelecido para a duração de cada experiência. Estes resultados foram incluídos na Figura 19, onde pode ser observado que uma ligeira queda na curva do hematócrito, também ocorre, a partir do primeiro dia.

Entretanto, embora os valores percentuais do hematócrito destes animais permaneçam em níveis menores que os iniciais, não houve uma redução drástica, nestes valores, em nenhum momento da experiência, como foi sempre observado nos animais infectados. Nestes últimos, embora pequenas, é possível verificar diferenças dose dependente, nas curvas de hematócrito e de mortalidade. Com o inóculo de 10.000 tripomastigotas, 70% de mortalidade, hematócrito descendente até o dia 22 e valor mínimo de 17.50%; com 1.000 tripanosomas, mortalidade de 50%, hematócrito descendente até o dia 13 e valor mínimo de 18.88%; com 100 parasitos, cinética diferente dos demais, valor mínimo de 22.20%, com 15 dias e nenhuma mortalidade durante o ensaio.

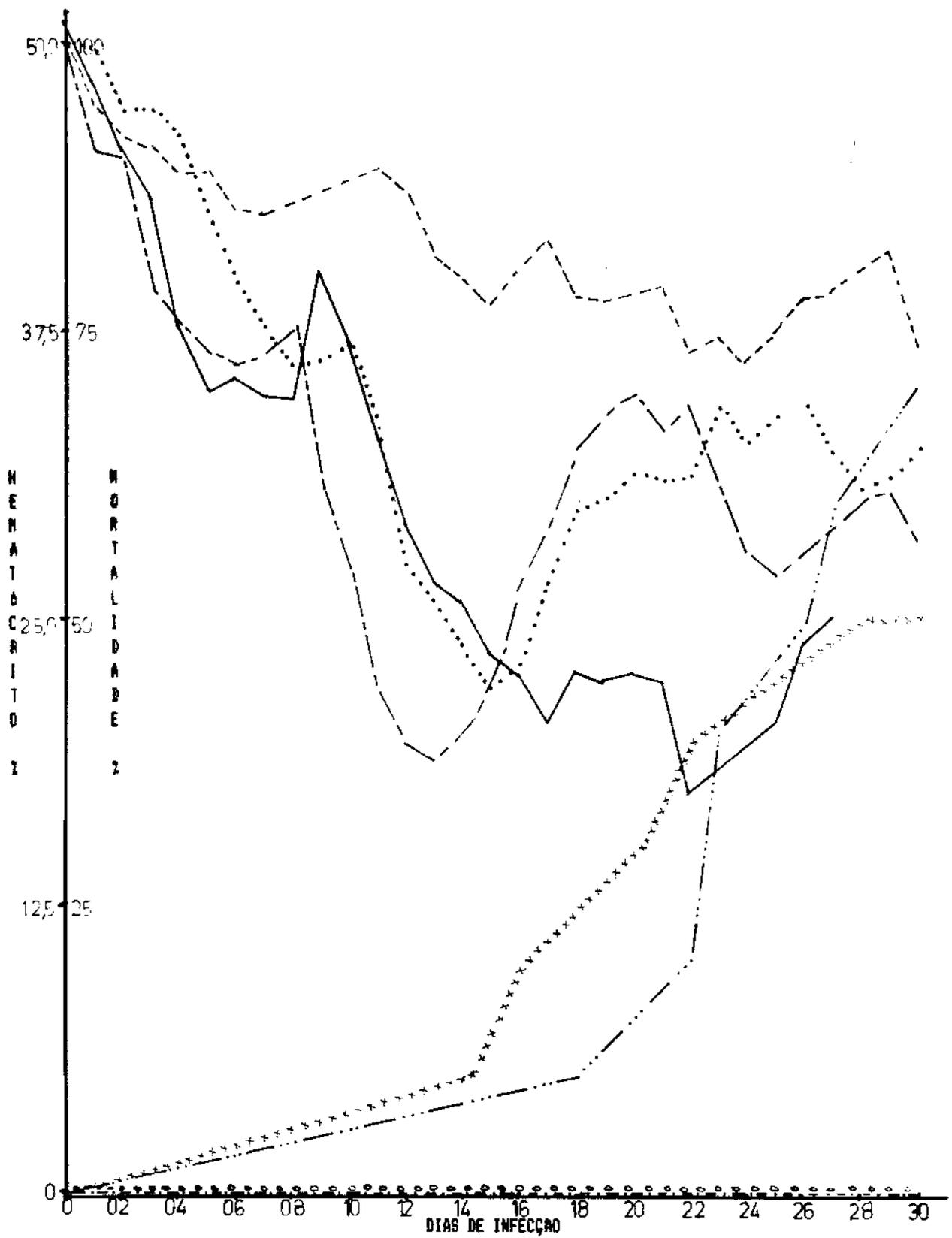


FIGURA 19. Hematócrito e Mortalidade de Camundongos C57Bl/10, infectados com diferentes inóculos do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Hematócrito: 10.000 (____) 1.000 (___); 100 (....); não infectado (----). Mortalidade: 10.000 (-...-); 1.000 (xxxx); 100 (oooo); não infectado (-.-.-). n = 10 por grupo, no início do ensaio.

Não obstante a queda nos valores do hematócrito dos animais normais, comparando-se os percentuais mínimos de cada curva, observamos diferenças significativas ($P < 0.05$), entre o resultado dos animais normais e aqueles dos animais infectados com os diferentes inóculos da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, mostrando, aparentemente, um mecanismo de causa e efeito entre Doença de Chagas e percentual de hematócrito.

1.2. Camundongos (C57BL/10xCBA)F1 - cepa Y

Camundongos híbridos de geração F1, obtidos pelo cruzamento das linhagens C57BL/10 e CBA, foram comparados nos valores dos seus hematócritos e nas suas taxas de mortalidade. A Figura 20 apresenta os resultados obtidos com inóculos de 10.000 e 1.000 tripomastigotas.

Nenhuma diferença significativa foi observada nas curvas do hematócrito ou de mortalidade destes dois grupos, que apresentaram 20% de mortalidade ao fim da experiência e curvas de hematócrito de padrão semelhante, no decorrer de toda experiência, com valores mínimos de 22.90% e 23.50%, para os animais infectados, respectivamente, com 10.000 e 1.000 tripomastigotas.

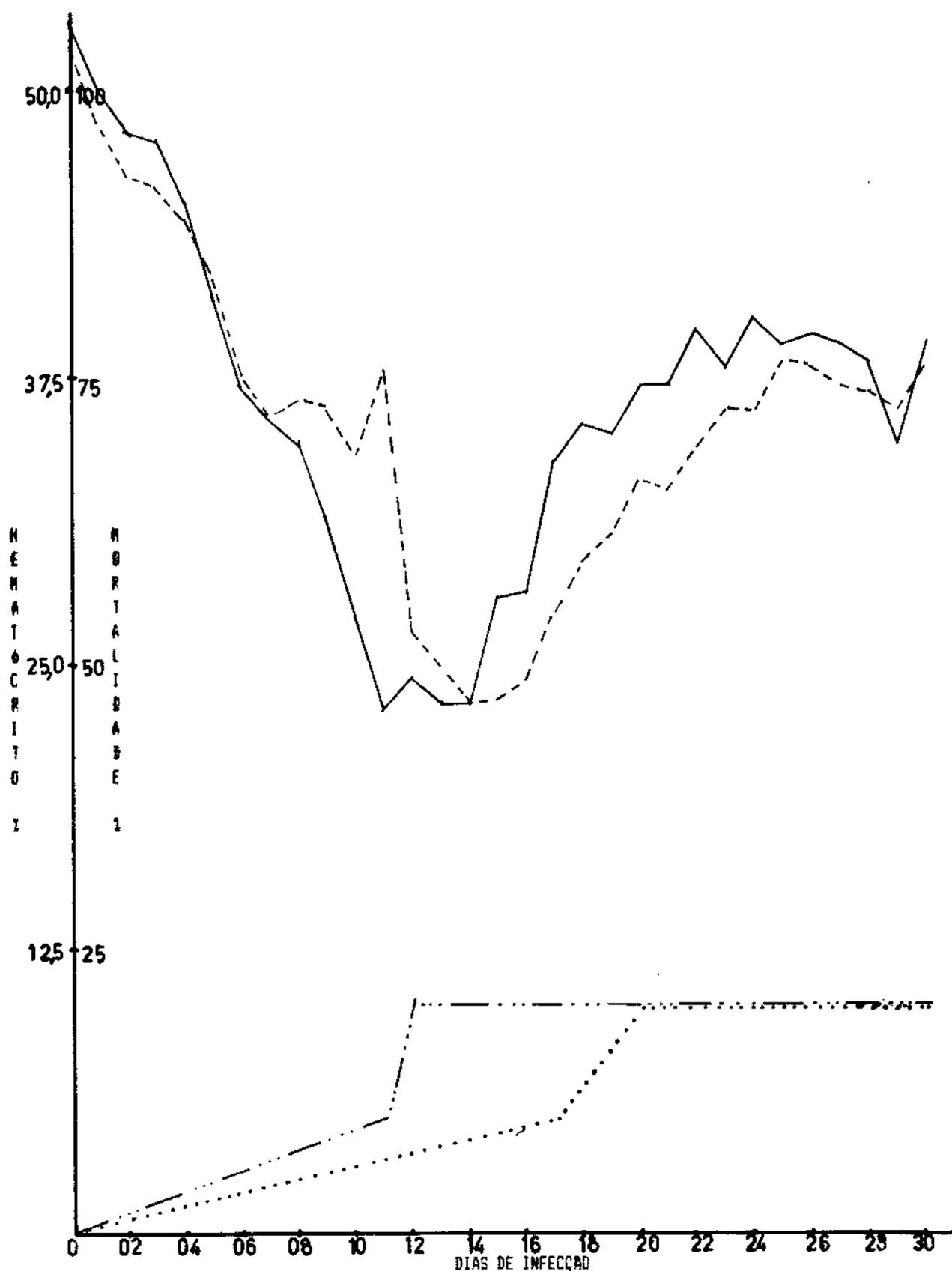


FIGURA 20. Hematócrito e Mortalidade de Camundongos Híbridos (C57B1/10xCBA)F1, infectados com diferentes inóculos do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Hematócrito: 10.000 (____); 1.000 (----). Mortalidade: 10.000 (-...-); 1.000 (.....). n = 10 por grupo, no início da experiência.

1.3. Camundongos (C57BL/10xBALB/c)F1 - Cepas Y ou CL

Comparamos os resultados obtidos numa mesma linhagem de camundongos, infectada com um mesmo inóculo das cepas Y ou CL do *Trypanosoma cruzi*. Os resultados observados nos camundongos híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1, inoculados com 100.000 tripomastigotas, são exibidos na Figura 21.

As curvas do hematócrito começaram a decrescer no primeiro dia da infecção, nos dois grupos, que apresentaram hematócritos de padrões diferentes, no decorrer do ensaio. Os animais inoculados com a cepa Y, mostraram um valor mínimo de 32.70%, com 13 dias de experiência, enquanto os camundongos infectados com a cepa CL, apresentavam 22.50%, com 19 dias de infecção. Entretanto, no trecho final da curva, os hematócritos dos animais sobreviventes, dos dois grupos, mostravam resultados semelhantes.

A mortalidade dos dois grupos foi significativamente diferente, tanto na cinética da curva, como na taxa final de mortalidade. Enquanto os camundongos infectados com a cepa Y, apresentavam apenas 10% de mortalidade, sobrevivendo a morte no fim da experimentação, aqueles inoculados com a cepa CL mostravam 70% de óbitos, ao término da experiência, com a primeira morte sobrevivendo com 15 dias de infecção. Os animais sobreviventes dos dois grupos, apresentavam hematócrito normal e parasitemia negativa, quando foram sacrificados 60 dias depois (resultados não mostrados).

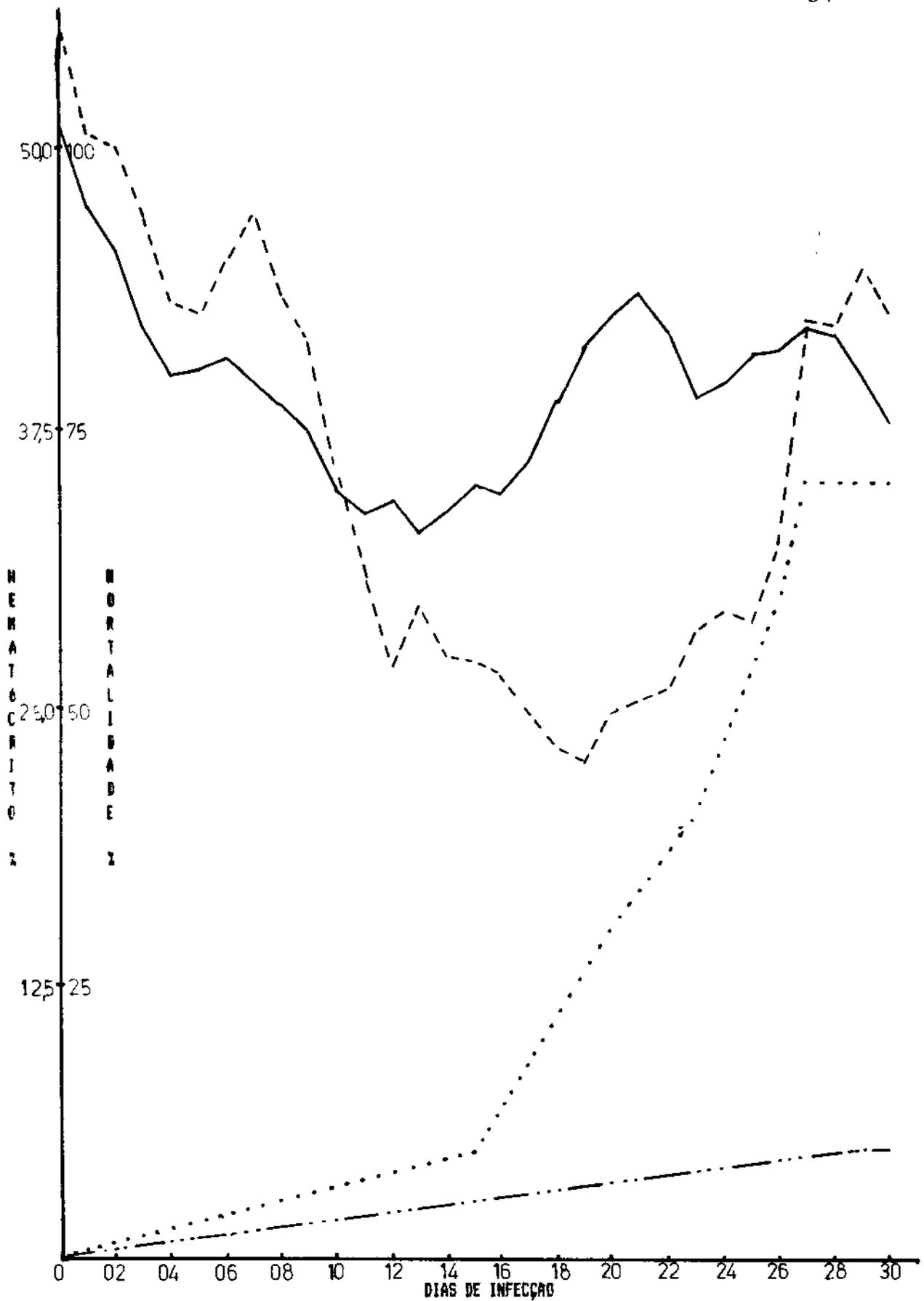


FIGURA 21. Hematócrito e Mortalidade de Camundongos Híbridos (C57B1/10xBALB/c)F1, infectados com 100.000 tripomastigotas das cepas Y ou CL do *Trypanosoma cruzi*. Hematócrito: cepa Y (____); cepa CL (----). Mortalidade: cepa Y (-...-); cepa CL (.....). n = 10 por grupo, no início da experiência.

1.4. Diferentes Linhagens de Camundongos - cepa Y

Comparamos os hematócritos e as taxas de mortalidade de diferentes linhagens de camundongos, infectadas com um mesmo inóculo da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. Os resultados obtidos com as linhagens C57BL/10, CBA e híbridos (C57BL/10xCBA)F1, infectadas com 10.000 tripomastigotas, são mostrados na Figura 22.

Os camundongos CBA, apresentaram uma curva de padrão descendente, desde o primeiro dia, com o percentual mínimo do hematócrito chegando à 15.00%, com 13 dias de infecção, quando a curva começou a apresentar um padrão ascendente. Entretanto, a mortalidade sobreveio nesta fase, e atingiu 100% com 18 dias de experiência.

A linhagem C57BL/10, apresentou curva de padrão descendente até o oitavo dia, quando um ligeiro aumento no percentual do hematócrito ocorreu, seguindo-se um novo decréscimo deste percentual, que atingiu um valor mínimo (17.50%), com 22 dias de infecção, quando a curva começou a ascender. A mortalidade deste grupo foi alta, chegando à 70%, no fim da experiência.

Os camundongos híbridos (C57BL/10xCBA)F1, também apresentaram curva descendente, com valor mínimo de hematócrito (22.90%), ocorrendo com 11 dias de infecção, quando a curva começou a ascender e os percentuais do hematócrito mantiveram-se relativamente estáveis, até o fim da experiência. A mortalidade do grupo foi baixa, atingindo apenas 20% ao término da experimentação.

Dos três grupos apresentados aqui, os híbridos

(C57BL/10xCBA)F1 apresentaram a menor taxa de mortalidade, bem como curva de hematócrito com melhor recuperação da anemia inicial.

Comparamos também os percentuais do hematócrito e a taxa de mortalidade, obtidos com os camundongos C57BL/10 e híbridos (C57BL/10xCBA)F1, inoculados com 1.000 tripomastigotas e estes resultados são mostrados na Figura 23. As curvas dos hematócritos dos dois grupos, mostraram padrões semelhantes, no decorrer da experiência. Os camundongos C57BL/10, apresentaram o índice mínimo (18.88%) com 13 dias de infecção e os híbridos (C57BL/10xCBA)F1, um percentual mínimo, ligeiramente superior (23.50%), com 15 dias de experimentação.

A taxa de mortalidade, nos dois grupos, foi distinta, embora não apresentasse diferenças significativas. Nos camundongos híbridos (C57BL/10xCBA)F1, foi de 20%, enquanto na linhagem C57BL/10 chegava a 50% no término da experiência.

Embora as diferenças, tanto no hematócrito como na taxa de mortalidade não fossem significativas, os híbridos (C57BL/10xCBA)F1 apresentaram uma conduta superior no decurso da infecção.

1.5. Diferentes Linhagens de Camundongos - cepa CL

Confrontamos os hematócritos e as taxas de mortalidade dos camundongos CBA, C57BL/10 e

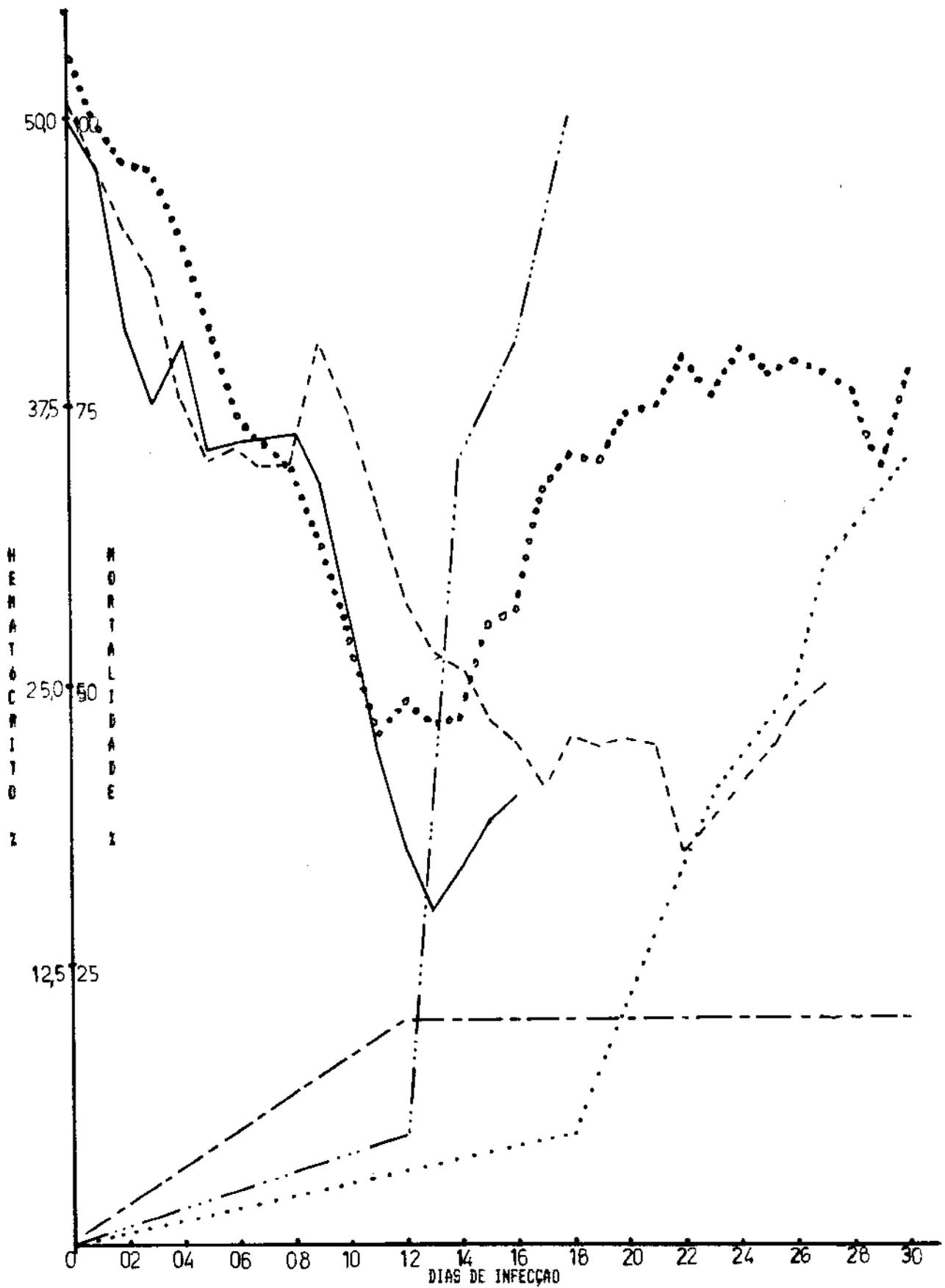


FIGURA 22. Hematócrito e Mortalidade de Camundongos CBA, C57Bl/10 e híbridos (C57Bl/10xCBA)F1, infectados com 10.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Hematócrito: CBA (—); C57Bl/10 (---); (C57Bl/10xCBA)F1 (oooo). Mortalidade: CBA (-...-); C57Bl/10 (.....); (C57Bl/10xCBA)F1 (___). n = 10 por grupo, no início da experiência.

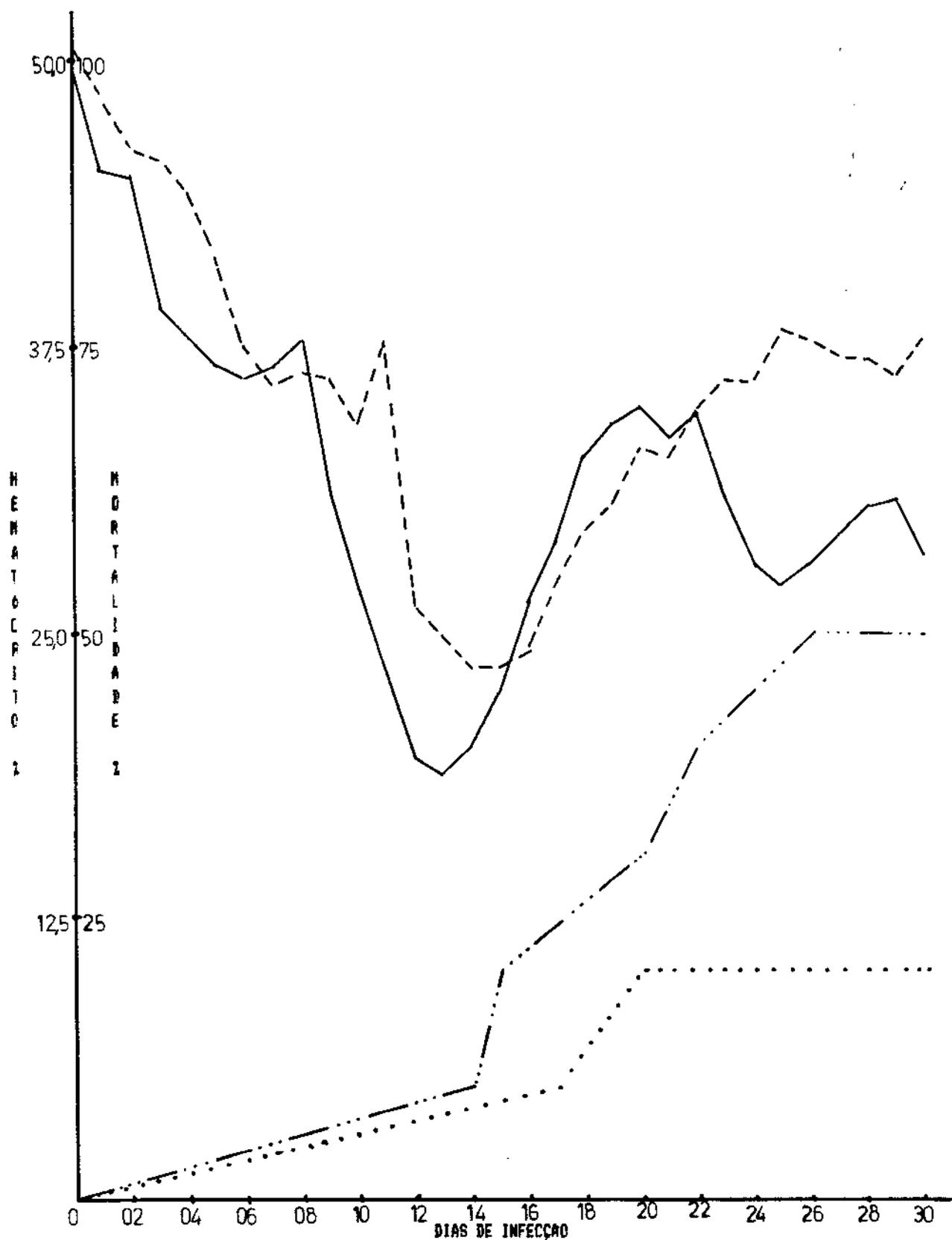


FIGURA 23. Hematócrito e Mortalidade de Camundongos C57B1/10 e híbridos (C57B1/10xCBA)F1, infectados com 1.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Hematócrito: C57B1/10 (—); (C57B1/10xCBA)F1 (---). Mortalidade: C57B1/10 (-...-); (C57B1/10xCBA)F1 (.....). n = 10 por grupo, no início da experiência.

híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1, inoculados com 100.000 tripomastigotas da cepa CL, do *Trypanosoma cruzi*. Os resultados destas observações são fornecidos na Figura 24.

Os camundongos CBA, apresentaram no decorrer da experiência, uma curva sempre descendente, com valor mínimo de hematócrito ocorrendo com 16 dias de infecção (10.00%). A taxa de mortalidade destes animais, atingiu 100% já com 18 dias de experiência, iniciando-se na fase em que os animais apresentavam profunda anemia.

Nos animais da linhagem C57BL/10, a curva foi descendente até o quinto dia, quando tornou-se ascendente até o oitavo dia. A partir de então, os valores do hematócrito mantiveram-se em descenso, atingindo o valor mínimo (18.00%), com 18 dias de experiência. A taxa de mortalidade do grupo atingiu 100%, com o primeiro óbito ocorrendo com 14 dias de infecção.

Os camundongos híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1, mostraram uma curva de hematócrito descendente, de padrão semelhante àquela dos camundongos C57BL/10, embora com valores ligeiramente superiores. O percentual mínimo deste grupo (22.50%), ocorreu com 19 dias de infecção. A partir de então, os valores do hematócrito deste grupo tornaram-se ascendentes, chegando a valores próximos dos normais, ao cabo da experiência. A taxa de mortalidade destes híbridos, chegou à 70%, ao fim do ensaio, com o primeiro óbito ocorrendo com 16 dias de experimentação.

Comparando-se os três grupos no decorrer da experiência, verifica-se um comportamento superior dos híbridos, em relação às duas linhagens testadas.

Com referência aos valores mínimos dos hematócritos, que definem o maior grau de anemia, os camundongos CBA apresentaram 10.00%, os C57BL/10, 18.00% e os híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1 mostraram 22.50%, recuperando-se a partir de então, apresentando valores próximos dos normais, ao término da experiência.

A taxa de mortalidade dos camundongos CBA e C57BL/10, foi de 100%, mas de cinética diferente; enquanto nos primeiros este índice foi atingido com 18 dias, nestes últimos, só ocorreu com 28 dias de infecção. Os camundongos híbridos, foram os únicos a apresentarem sobreviventes (30%), que perduraram até 90 dias, quando foram sacrificados. O exame semanal destes superstites, mostrou ausência de parasitos circulantes e hematócrito normal, 44 dias após o início da experiência (resultados não mostrados).

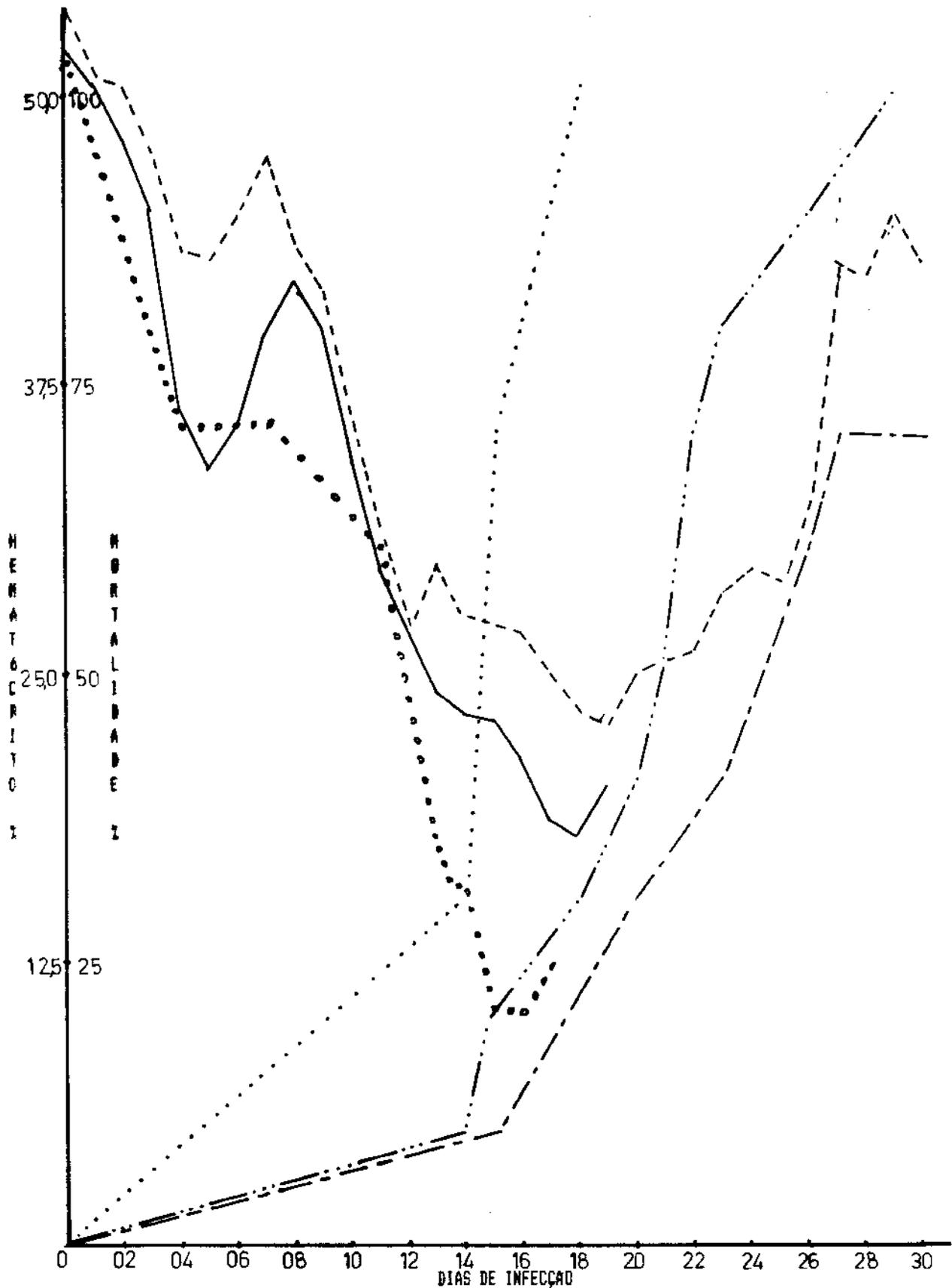


FIGURA 24. Hematócrito e Mortalidade de Camundongos CBA, C57B1/10 e Híbridos (C57B1/10xBALB/c)F1, infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa CL. Hematócrito: CBA (ooo); C57B1/10 (___); Híbridos (C57B1/10xBALB/c)F1 (....). Mortalidade: CBA (....); C57B1/10 (-...-); Híbridos (C57B1/10xBALB/c)F1 (___). n = 10 por grupo no início da experiência.

1.6. Alterações da Série Vermelha

Para verificar as possíveis alterações da série vermelha, no decorrer da Doença de Chagas Experimental, fizemos diariamente esfregaços de sangue de camundongos infectados com as cepas Y ou Cl do *Trypanosoma cruzi*. Utilizamos nestes ensaios, camundongos Swiss, BALB/c e C57BL/10, infectados, os dois primeiros com 100.000 tripomastigotas e os C57BL/10, com 10.000 tripomastigotas da cepa Y e, camundongos BALB/c e C57BL/10 infectados com 100.000 tripomastigotas, da cepa CL. Cada grupo era constituído por 10 animais, 5 machos e 5 fêmeas.

Todas as três linhagens ensaiadas, tanto machos como fêmeas, apresentaram graves alterações hematológicas. Nos animais inoculados com a cepa Y, estas alterações começaram a ocorrer a partir do terceiro ou quarto dias de infecção e caracterizavam-se por discreta policromasia. Nos animais infectados com a cepa CL, as alterações começaram a ser detectadas entre o quarto e o sexto dias e caracterizavam-se também, por policromasia discreta. A partir de então e até a morte dos animais, o quadro hematológico se complicou, caracterizando-se pelo surgimento de policromasia acentuada, hipocromia, anisopeilocitose, presença de corpúsculos de Jolly e de pontilhado basófilo e o aparecimento de eritroblastos no percurso laminar.

Não foram observadas diferenças significativas entre as três linhagens testadas, que apresentaram taxa de mortalidade de 100% antes do término da experiência,

em virtude dos elevados inóculos utilizados nos ensaios. Entretanto, nos camundongos C57BL/10, as alterações hematológicas ocorreram um pouco mais tardiamente.

As cepas Y e CL provocaram o aparecimento de quadro hematológico idêntico, surgindo as alterações observadas, mais prematuramente nos animais inoculados com a cepa Y, provavelmente, devido a característica da cepa, que em camundongos apresenta curva de parasitemia com pico inicial mais precoce que a cepa CL. Estas observações são mostradas nas Figuras 25 à 33.

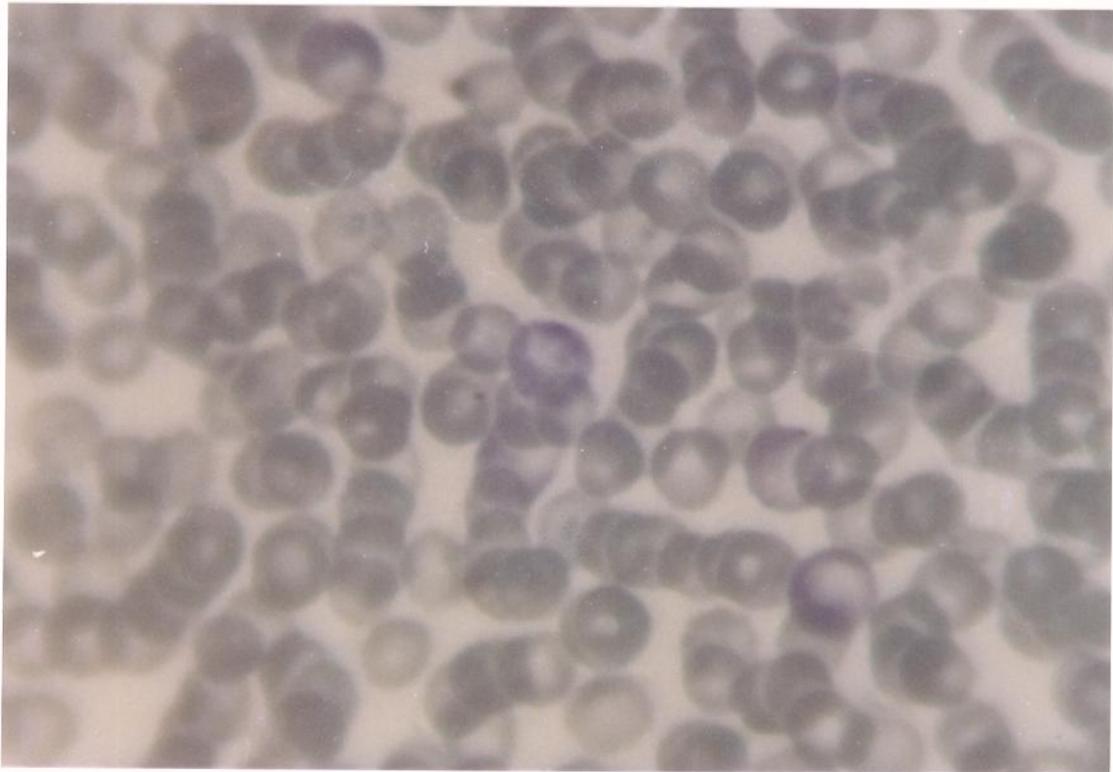


FIGURA 25. Amostra de Sangue de Camundongo BALB/c, não infectado. Aumento: 800 x.

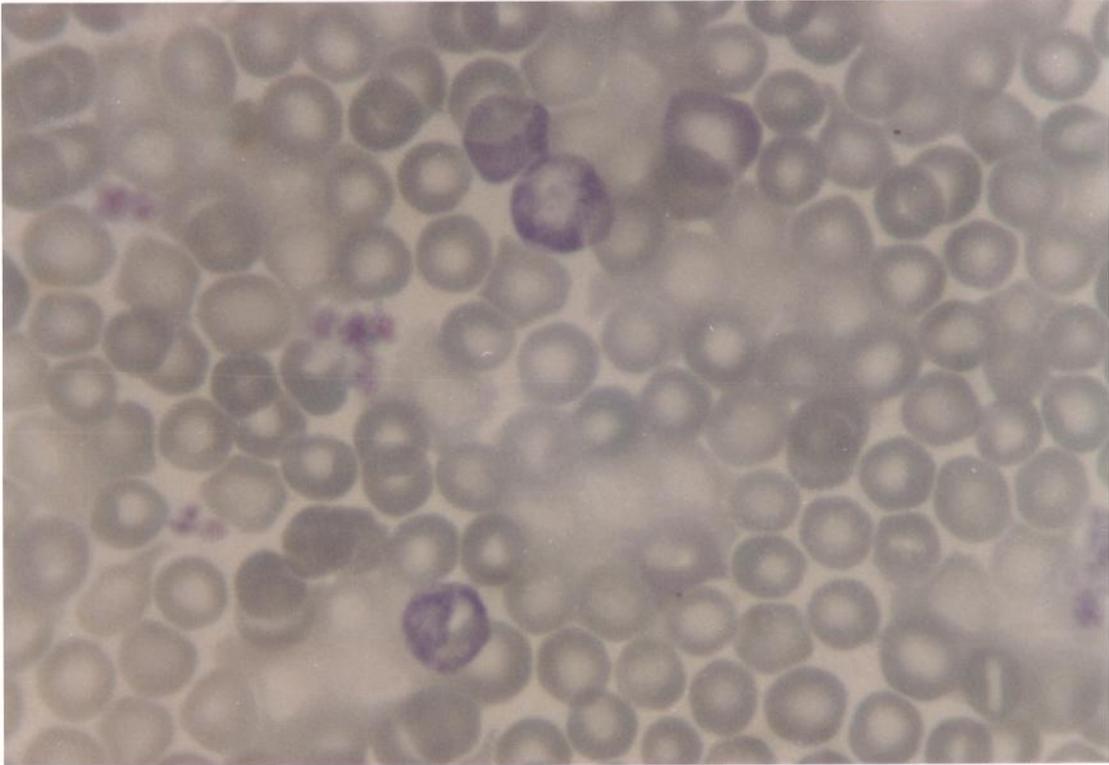


FIGURA 26. Esfregaço de Sangue de Camundongo BALB/c, infectado com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa CL, 4 dias após inoculação. Presença de discreta policromasia. Aumento: 800 x.

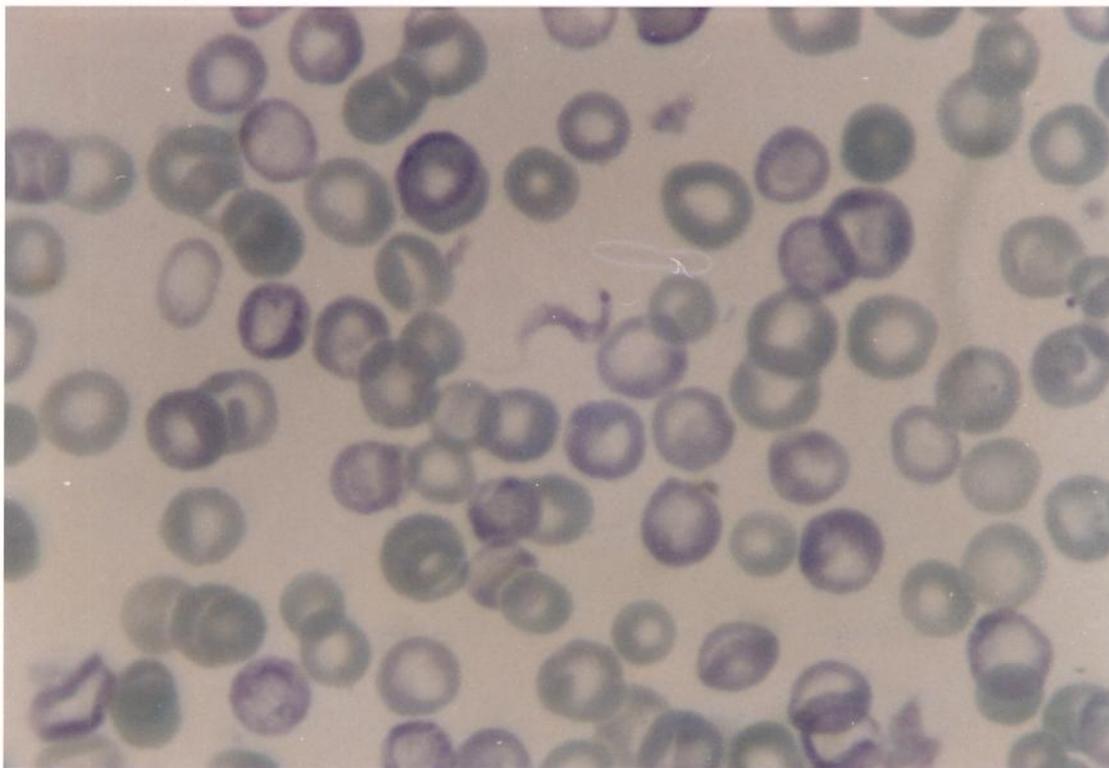


FIGURA 27. Esfregaço de Sangue de Camundongo BALB/c, infectado com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa CL, 8 dias após inoculação. Presença de acentuada policromasia. Aumento: 800 x

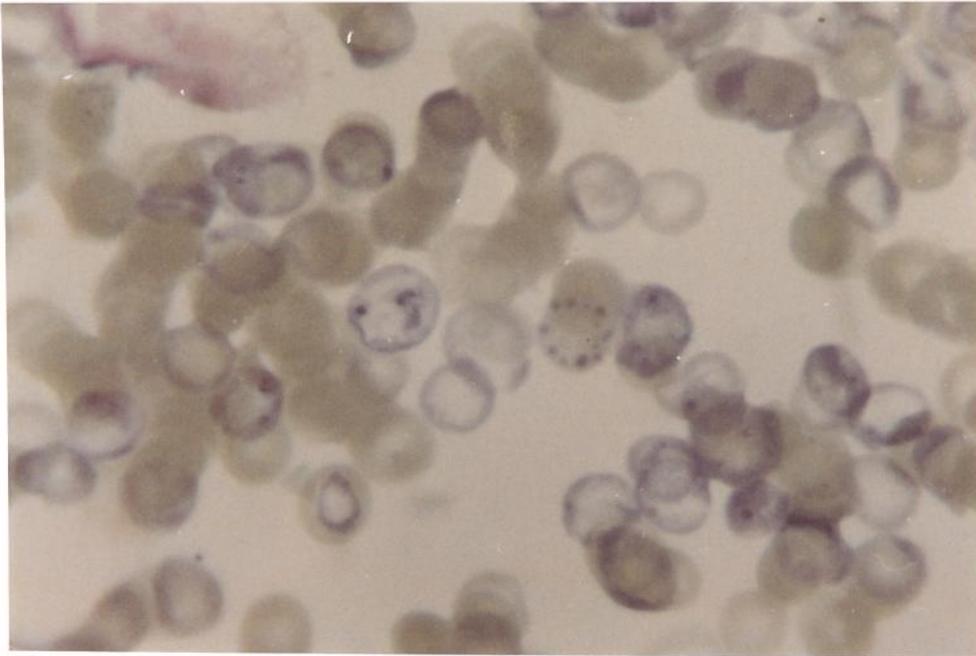


FIGURA 28. Esfregaço de Sangue de Camundongo BALB/c, infectado com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa CL, 11 dias após inoculação. Presença de acentuada policromasia, hipocromia, pontilhado basófilo e corpúsculos de Jolly. Aumento: 800 x.

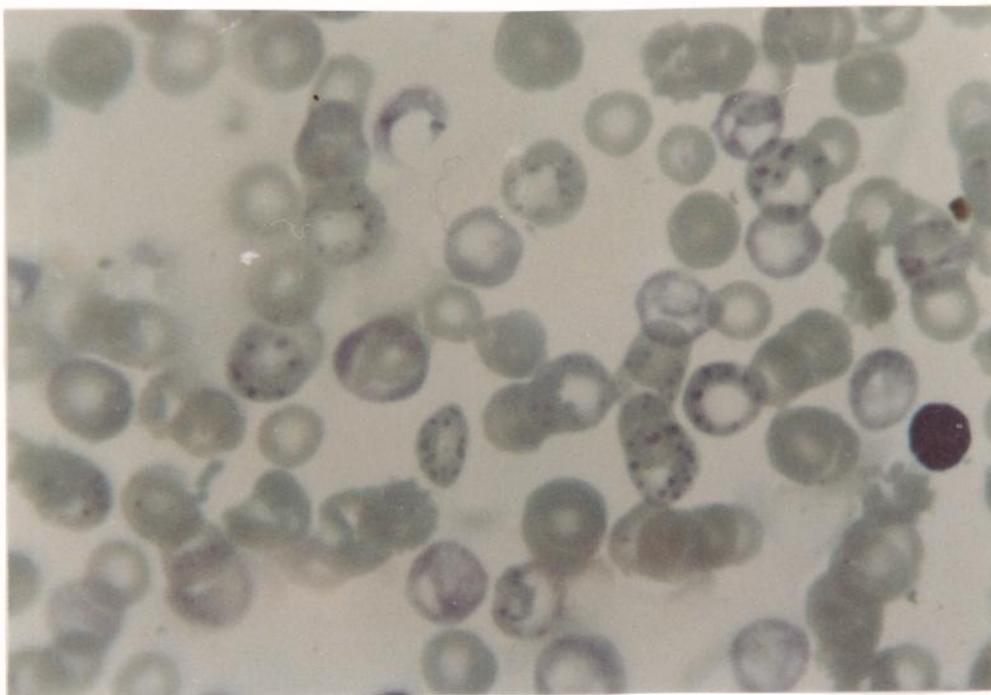


FIGURA 29. Esfregaço de Sangue de Camundongo BALB/c, infectado com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa CL, 14 dias após inoculação. Presença de acentuada policromasia, anisocitose, pontilhado basófilo e corpúsculos de Jolly. Aumento: 800 x.

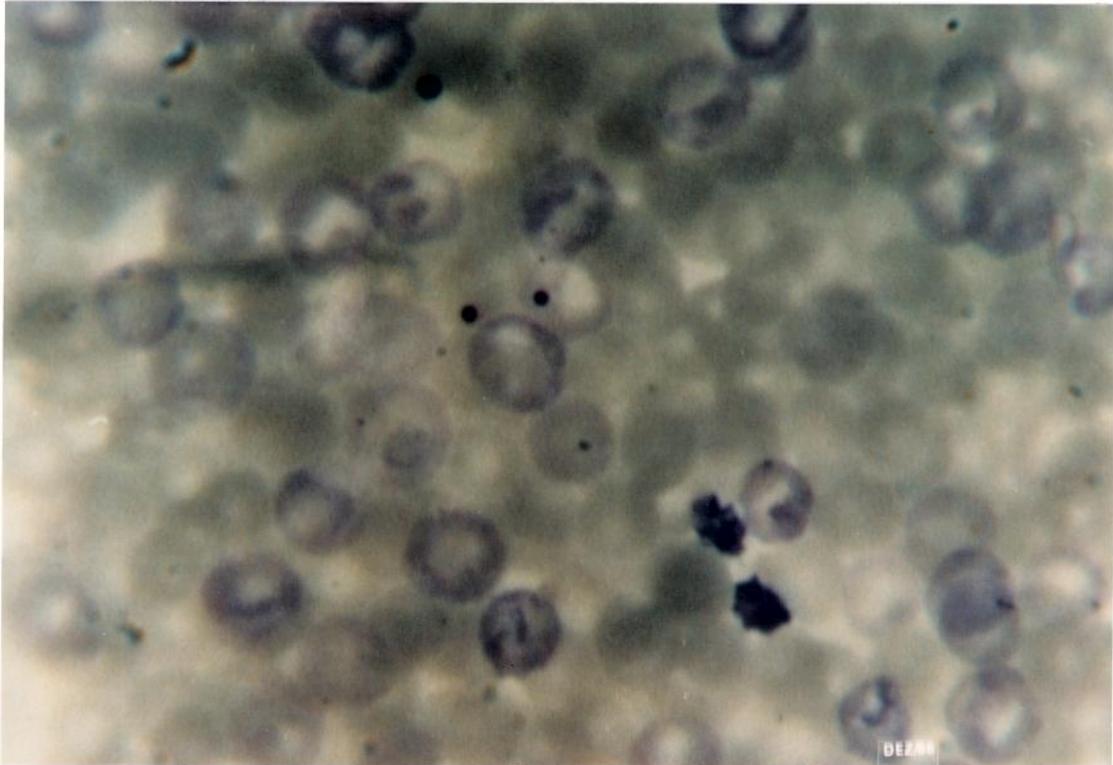


FIGURA 30. Esfregaço de Sangue de Camundongo C57BL/10, infectado com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa CL, 20 dias após inoculação. Presença de acentuada policromasia, hipocromia e anisopecilocitose evidente. Aumento: 800 x.

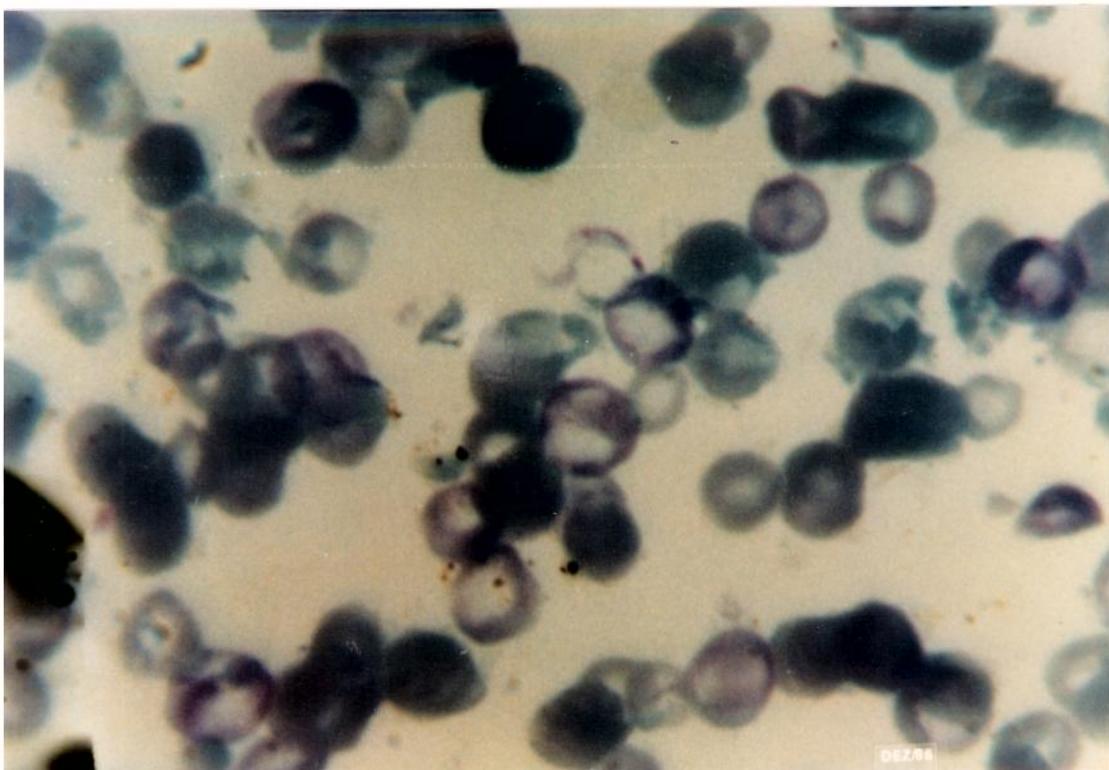


FIGURA 31. Esfregaço de Sangue de Camundongo C57BL/10, infectado com 10.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, 21 dias após inoculação. Presença de acentuada policromasia, anisopecilocitose, pontilhado basófilo, corpúsculos de Jolly, hipocromia e eritroblasto no percurso laminar. Aumento: 800x.

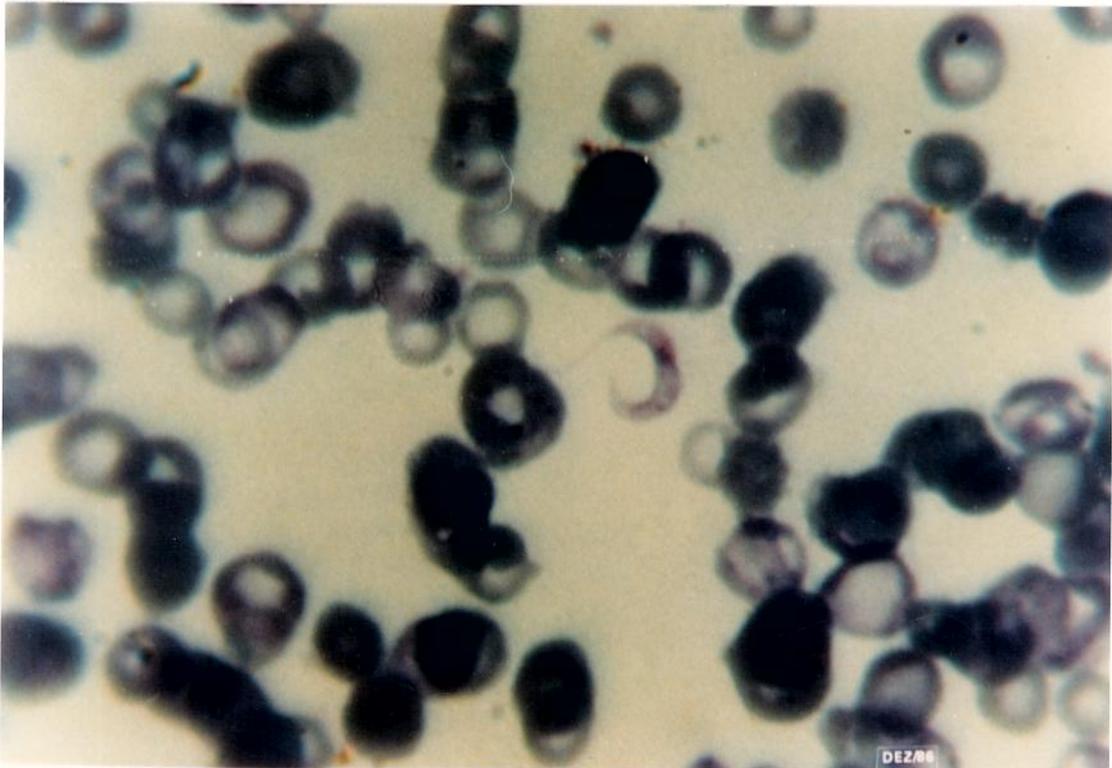


FIGURA 32. Esfregaço de Sangue de Camundongo C57BL/10, infectado com 10.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, 22 dias após inoculação. Presença de acentuada policromasia, hipocromia, pontilhados basófilos, corpúsculos de Jolly, anisopecilocitose e eritoblastos no percurso laminar. Aumento: 800 x.

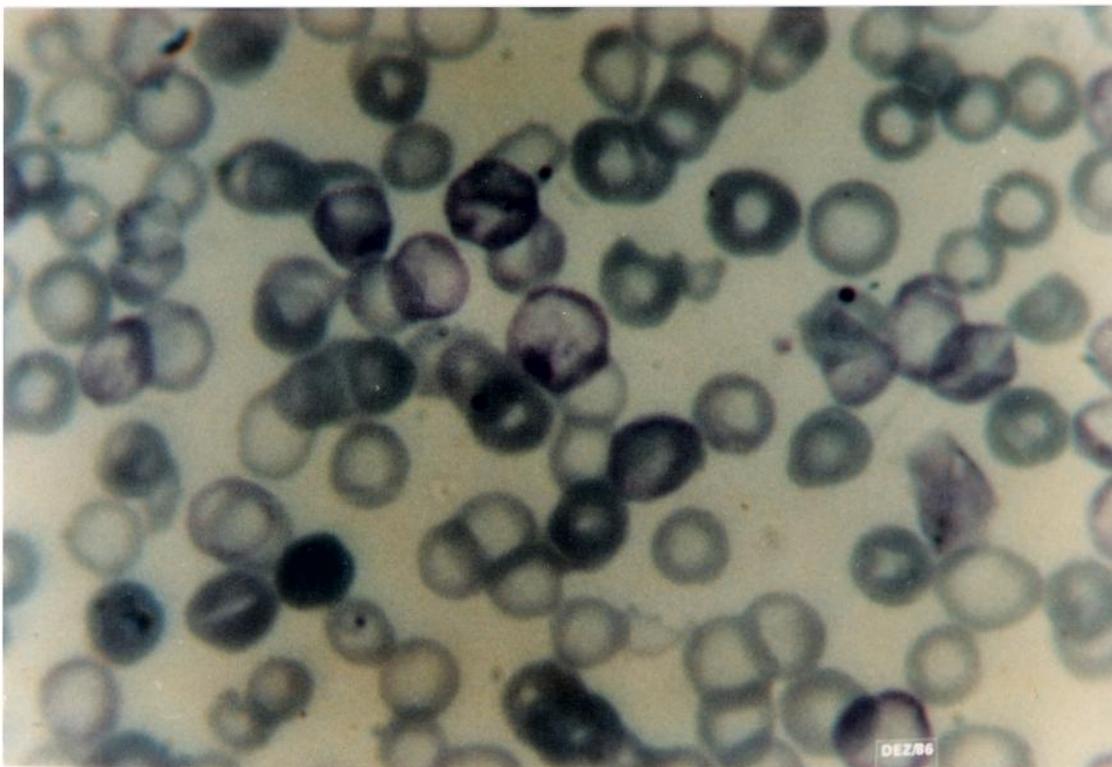


FIGURA 33. Esfregaço de Sangue de Camundongo C57BL/10, infectado com 10.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, 29 dias após inoculação. Presença de acentuada policromasia, anisopecilocitose, hipocromia e corpúsculos de Jolly. Aumento: 800 x.

V. Observações Esplênicas

1. Observações Macroscópicas

Para este ensaio, um grupo de 20 camundongos C57BL/10, todos machos, com 90 dias de idade, foram inoculados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. A intervalos regulares, 2 animais aleatoriamente escolhidos, foram sacrificados após determinação do hematócrito e da parasitemia. Os baços destes animais foram retirados, fixados em formol e examinados macroscopicamente.

A parasitemia e o hematócrito deste grupo, apresentaram os padrões anteriormente descritos neste trabalho. O exame macroscópico dos baços, mostrou esplenomegalia evidente, a partir do quinto dia de inoculação, que começou a regredir com 21 dias de infecção. A presença de nódulos linfáticos evidentes, foi verificada a partir do oitavo dia de infecção (Figuras 34 e 35).

2. Observações Microscópicas

Nestas observações foram utilizados 52 camundongos C57BL/10, 26 machos e 26 fêmeas, com idade variando entre 2 e 3 meses. A intervalos pré-determinados, lotes de 4 camundongos de ambos os sexos, escolhidos aleatoriamente, foram sacrificados e seus baços examinados histologicamente.



FIGURA 34. Aspecto macroscópico de baços de camundongos C57BL/10, infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Da esquerda para a direita: normal, 3, 5, 8, 11, 14, 17, 21, 24, 27 e 30 dias após infecção.



FIGURA 35. Aspecto macroscópico de baço de camundongo C57BL/10, infectado com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, mostrando nódulos linfáticos evidentes.

Os camundongos normais, mostraram baços de tamanho padrão, apresentando nódulos linfáticos bem delimitados pela polpa vermelha (Figura 36). Após 3 dias de infecção, os nódulos apresentaram-se aumentados devido a proliferação da coroa perinodular, havendo perfeita distinção entre as polpas branca e vermelha (Figura 37).

As observações feitas com 6 e 7 dias após a inoculação, mostraram acentuada hipertrofia dos nódulos linfáticos, havendo ainda nítida delimitação entre as polpas branca e vermelha (Figura 38).

Os exames realizados nos cortes histológicos dos animais sacrificados com 9 dias de infecção, revelaram uma sensível mudança na organização do órgão. A polpa branca perde os seus contornos, anteriormente tão nítidos, e parece espalhar-se por todo o órgão (Figura 39).

Com 12 dias de infecção, o baço mostra-se completamente diferente do seu padrão organizativo, com toda a polpa vermelha invadida pela polpa branca (Figura 40).

As observações das preparações, 14 dias após a inoculação, mostraram o baço ainda desorganizado. Entretanto, verifica-se em diversos pontos do órgão acúmulo de células que aparentam migrar para determinados setores do baço (Figura 41).

Com 16 dias de infecção, a aparência do órgão sugere uma reorganização das polpas branca e vermelha. O acúmulo de células que com 14 dias era discreto, nesta fase é bem evidente, sugerindo a formação de novos nódulos linfáticos (Figura 42).

Com 19 dias de infecção, o órgão torna a desorganizar-se, não havendo delimitação entre a polpa branca e a vermelha (Figura 43). Entretanto, todos os animais sobreviventes até então, morreram no vigésimo dia, não sendo possível acompanhar a evolução esplênica até o surgimento da fase crônica.

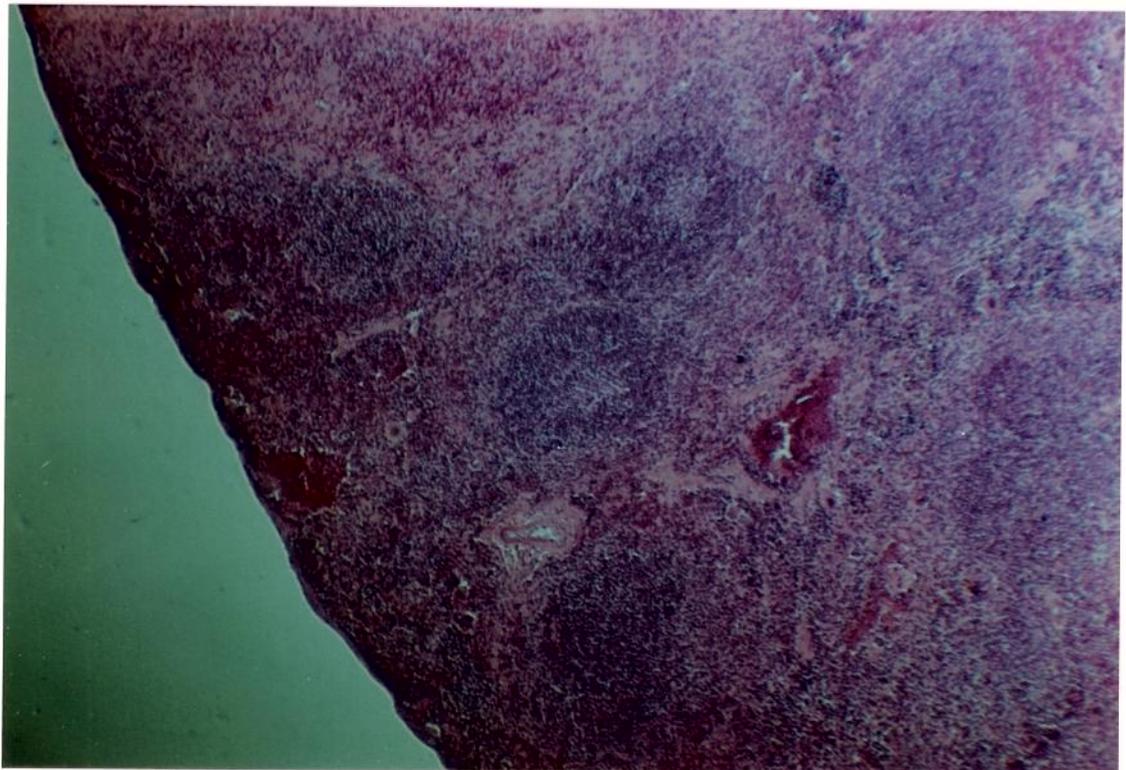


FIGURA 36. Aspecto histológico de baço normal de camundongo C57BL/10. Aumento: 80x.

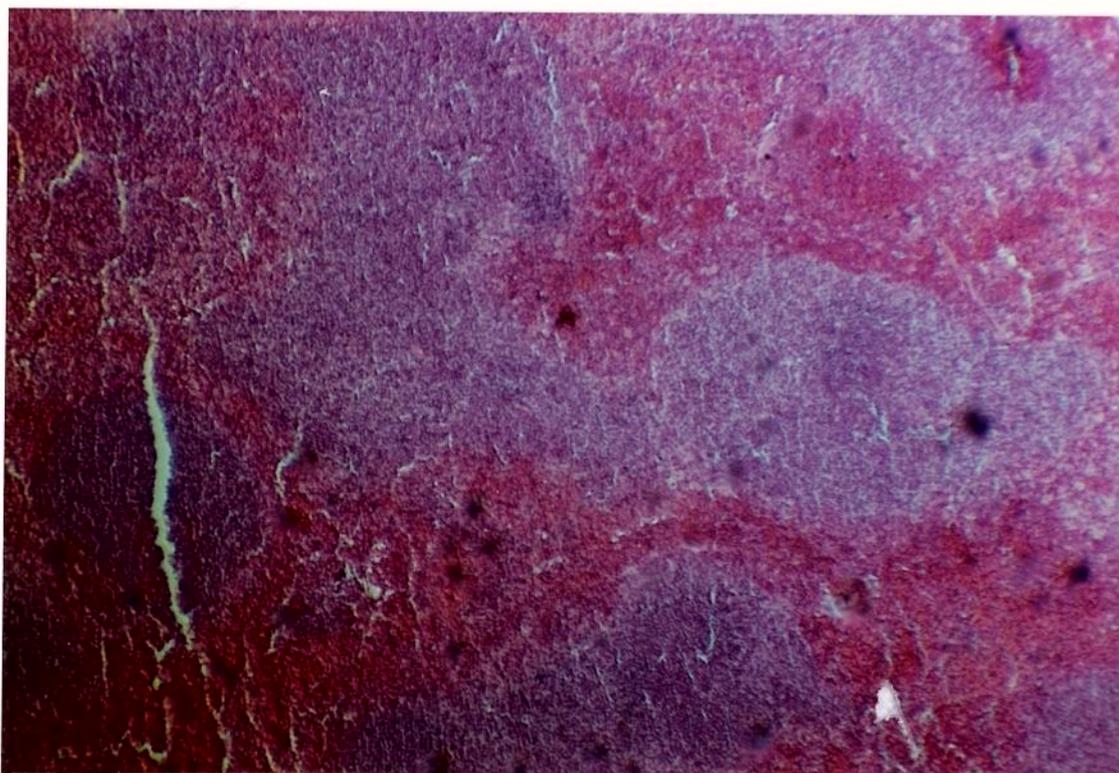


FIGURA 37. Aspecto histológico de baço de camundongo C57BL/10, 3 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Aumento: 80 x.

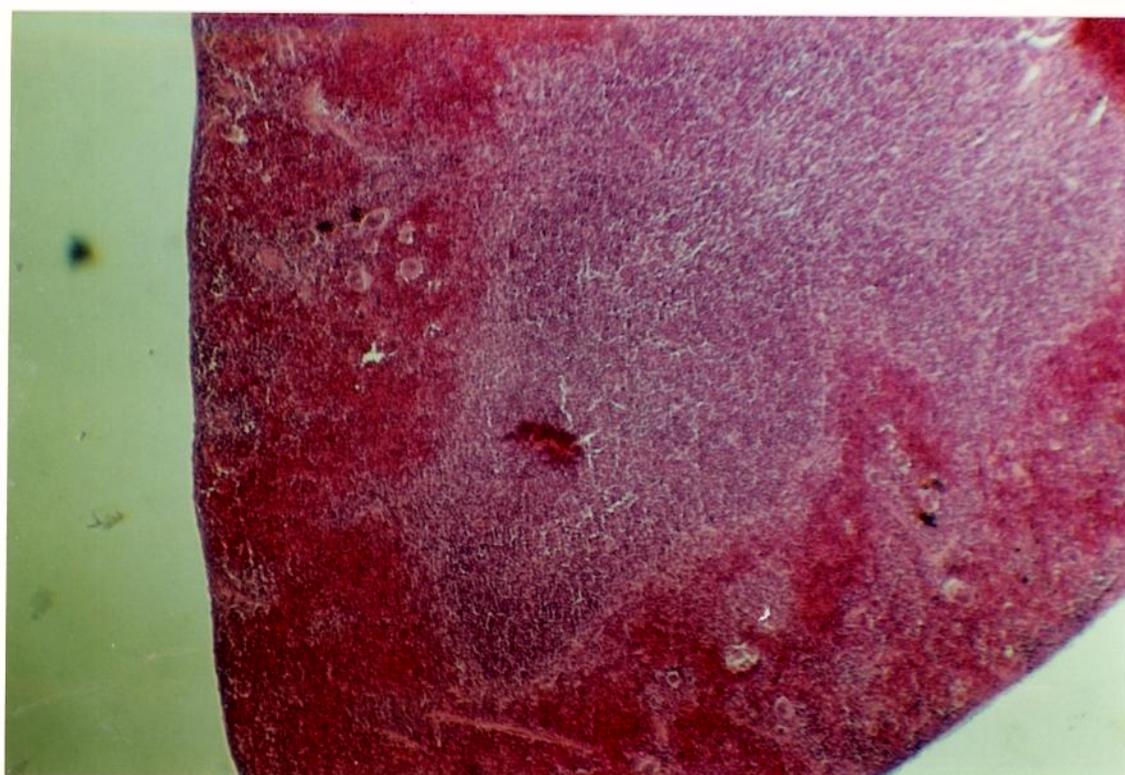


FIGURA 38. Aspecto histológico de baço de camundongo C57BL/10, 6 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Aumento: 80 x.

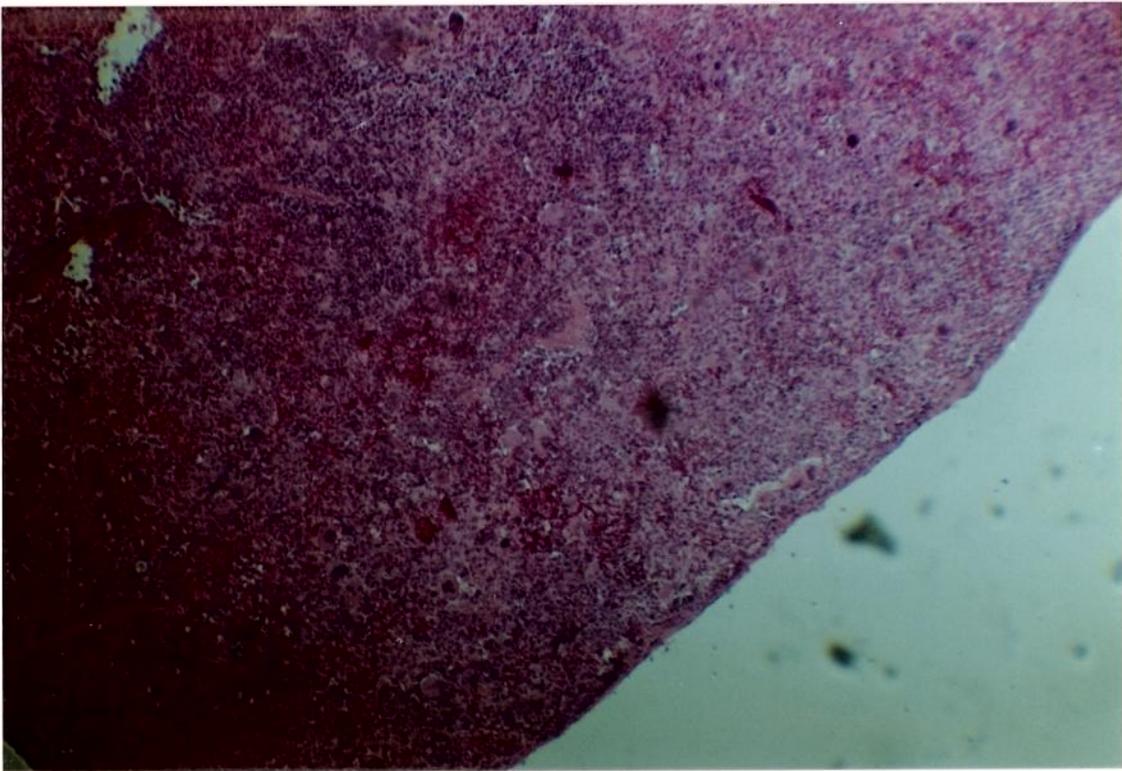


FIGURA 39. Aspecto histológico de baço de camundongo C57BL/10, 9 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Aumento: 80 x.

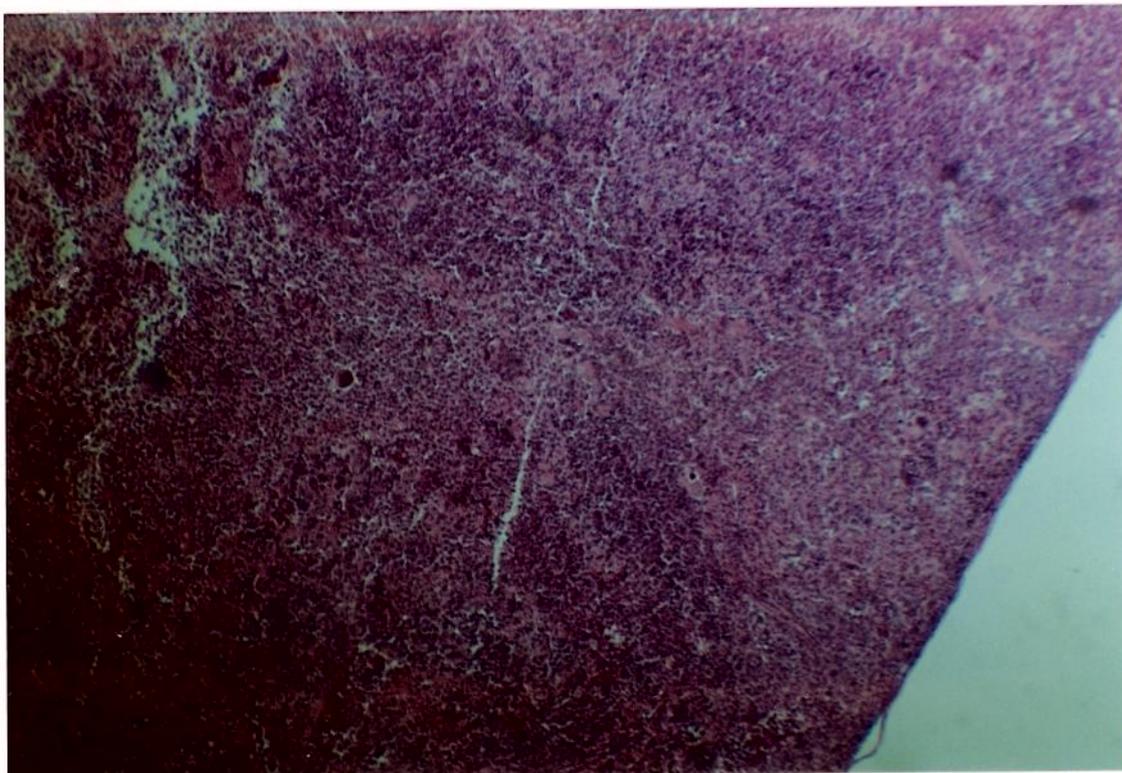


FIGURA 40. Aspecto histológico de baço de camundongo C57BL/10, 12 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Aumento: 80 x.

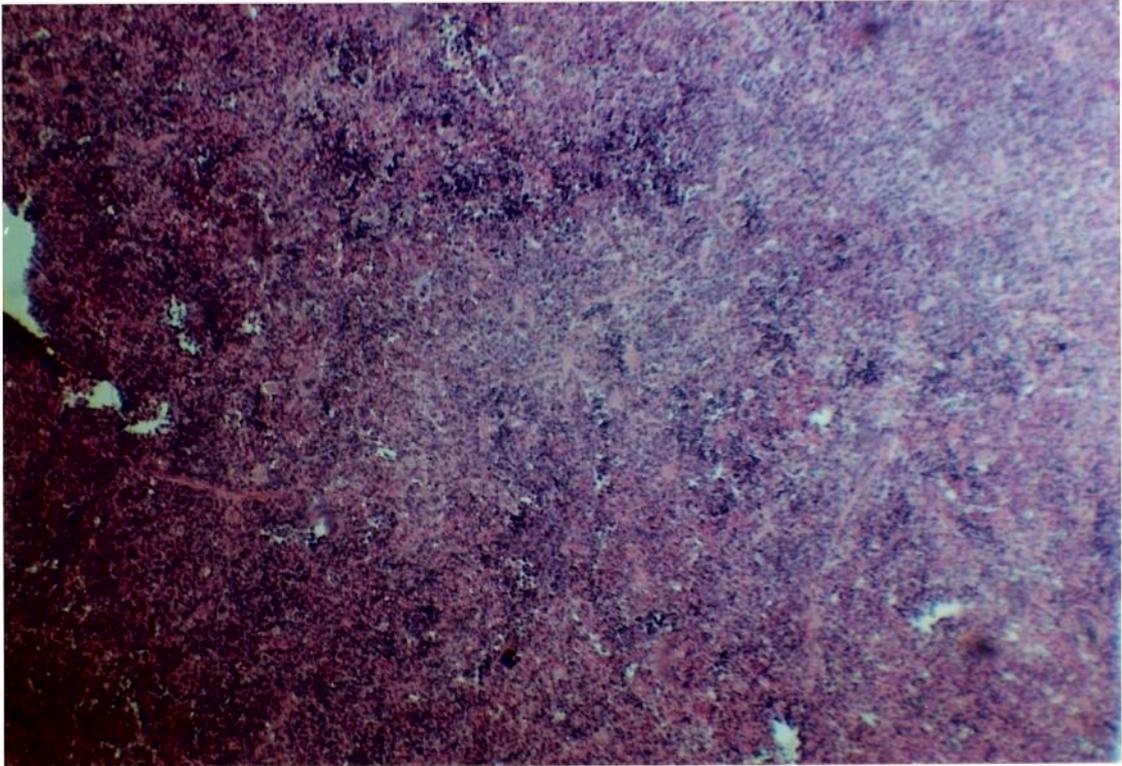


FIGURA 41. Aspecto histológico de baço de camundongo C57BL/10, 14 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Aumento: 80 x.

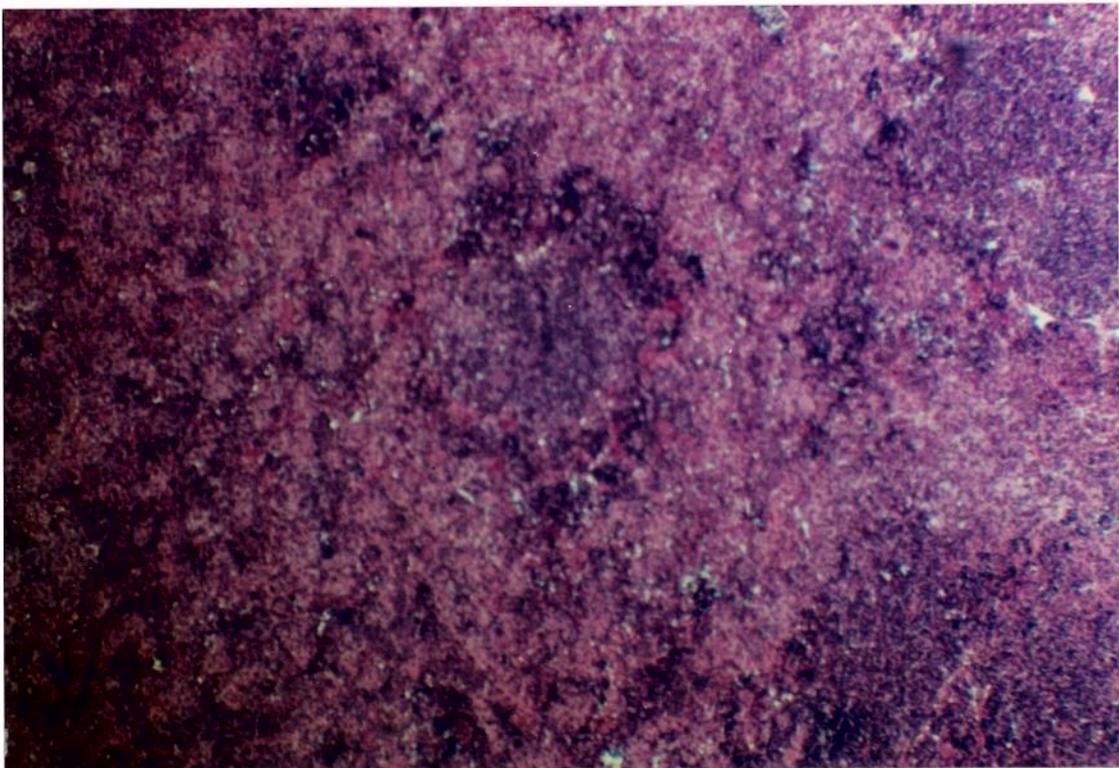


FIGURA 42. Aspecto histológico de baço de camundongo C57BL/10, 16 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Aumento: 80 x.

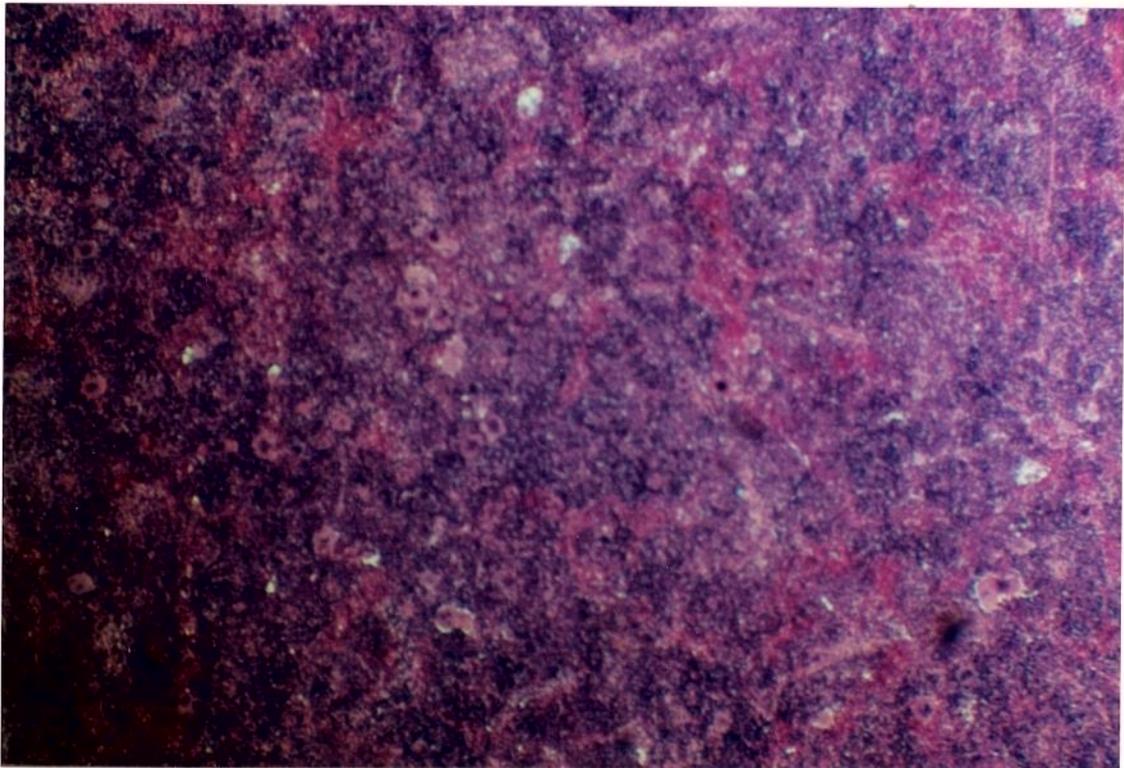


FIGURA 43. Aspecto histológico de baço de camundongo C57BL/10, 19 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Aumento: 80 x.

Em virtude dos resultados obtidos com esfregaços de sangue corados e com preparações histológicas de baço, resolvemos repetir estas experiências, com algumas modificações. Para isto, foram utilizados 32 camundongos C57BL/10 (16 machos e 16 fêmeas), com idade variando entre 2 e 3 meses, que foram inoculados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Diariamente foram realizados esfregaços de sangue destes animais, que desta vez, foram corados com um corante supra-vital: o Azul de Cresil Brilhante.

Os resultados obtidos com estas colorações são mostrados nas Figuras 44 a 48. Nos animais normais (Figura 44), a contagem diferencial de reticulócitos apresentou 1 a 3% destas células. Com 3 dias de infecção, o número médio de reticulócitos nas preparações coradas, elevou-se para cerca de 10% (Figura 45), surgindo também no percurso laminar, células com corpúsculos de Jolly. No quinto dia após a inoculação, este número chegou a cerca de 30% (Figura 46), caindo para 10% no sexto dia (Figura 47) e voltando aos valores normais deste então. A partir da segunda semana de infecção, os animais voltaram a apresentar crise reticulocitária, com percentuais de cerca de 30% de reticulócitos, nas preparações realizadas com 16 dias de infecção (Figura 48).

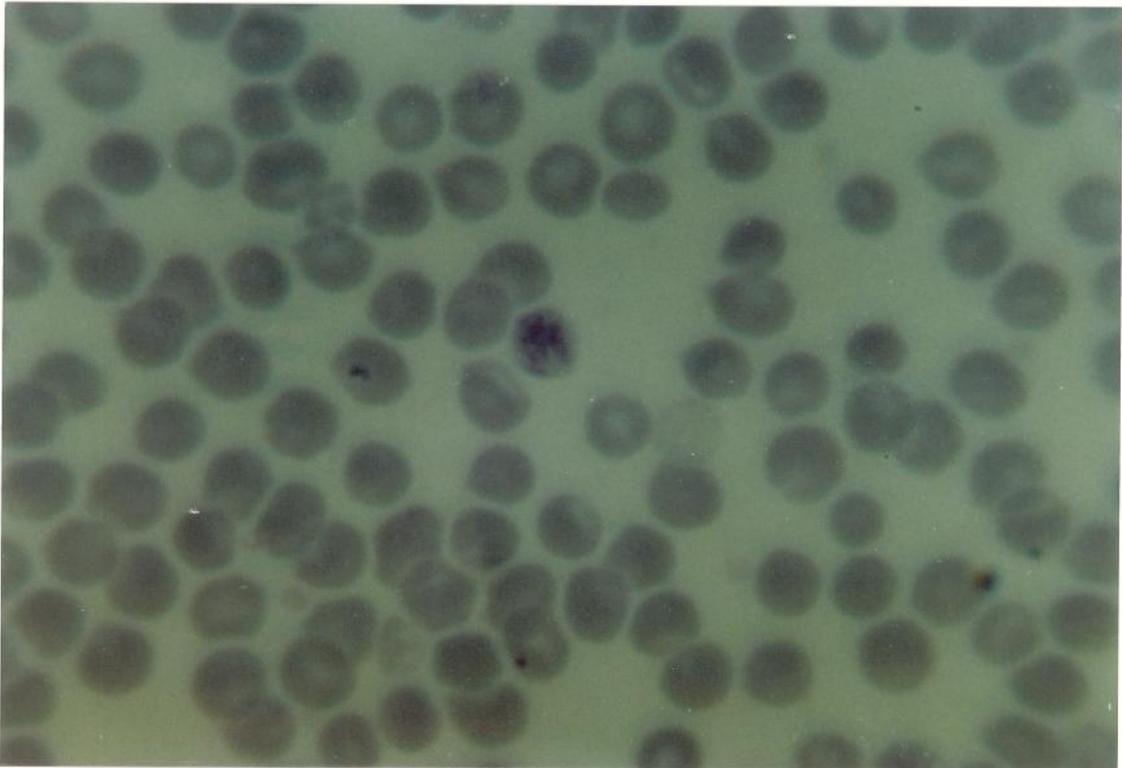


FIGURA 44. Esfregaço de Sangue de Camundongo C57BL/10, não infectado (1 a 3% de reticulócitos). Aumento: 800 x.

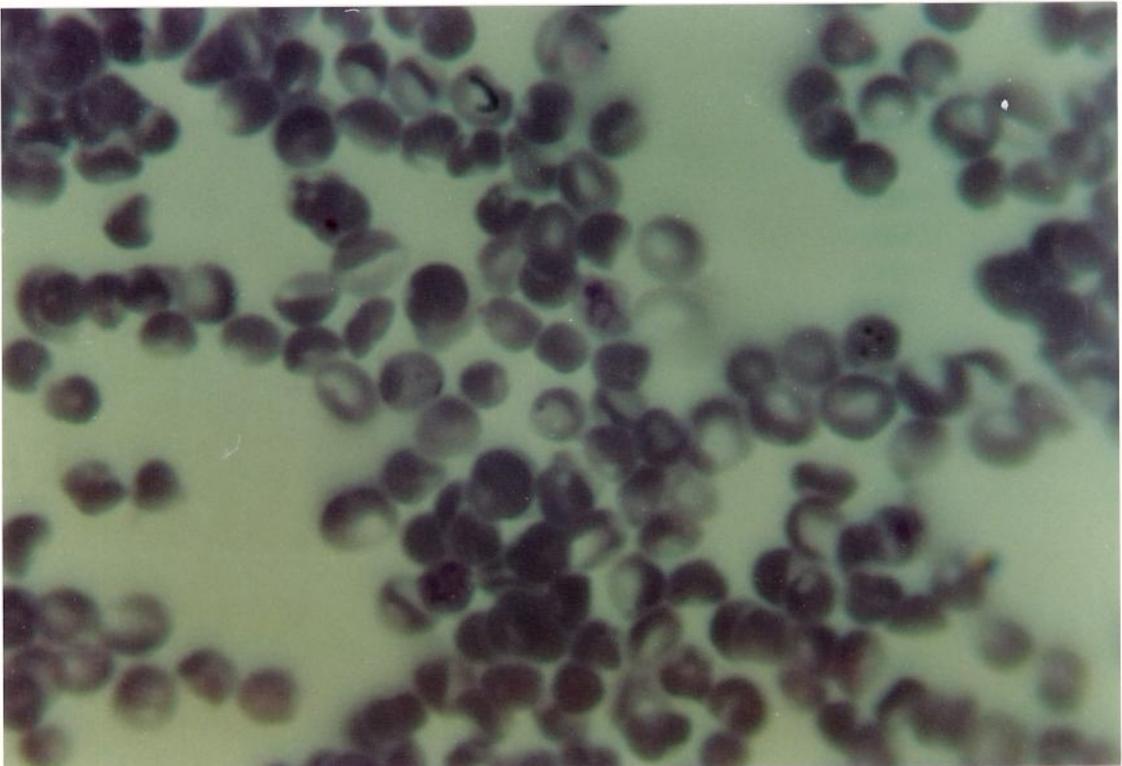


FIGURA 45. Esfregaço de Sangue de Camundongo C57BL/10, 3 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y (cerca de 10% de reticulócitos e presença de células com corpúsculos de Jolly). Aumento: 800 x.

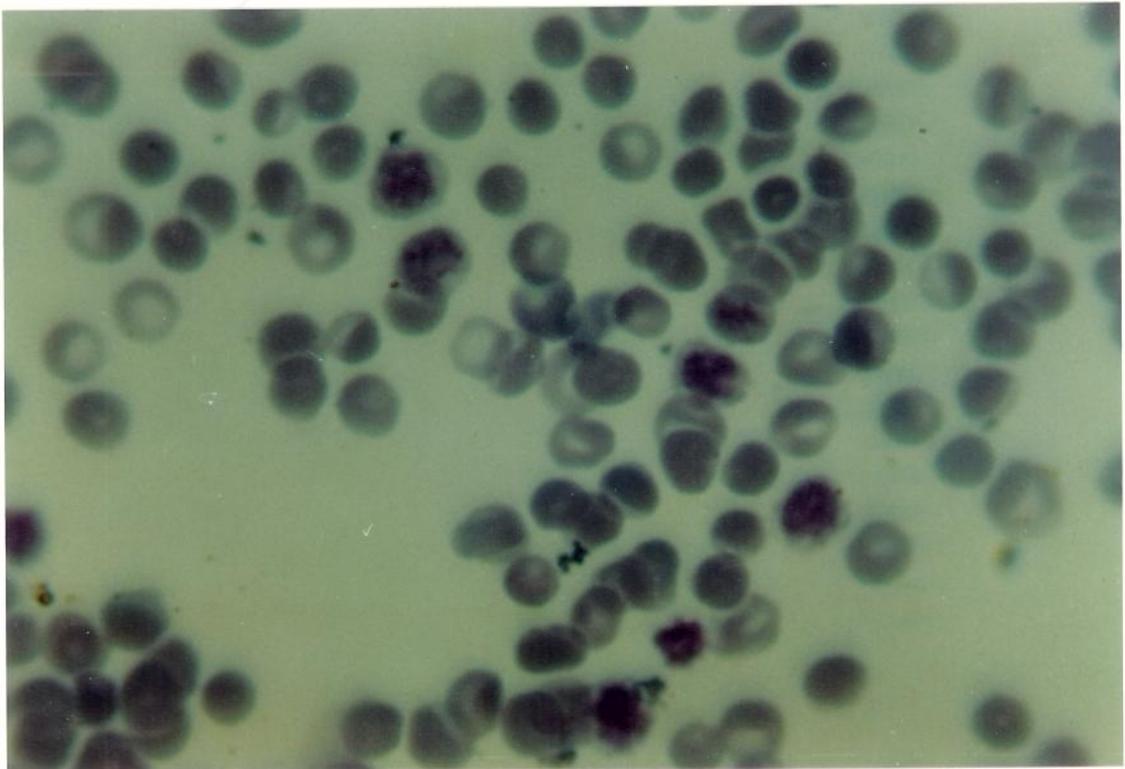


FIGURA 46. Esfregaço de Sangue de Camundongo C57BL/10, 5 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y (cerca de 30% de reticulócitos). Aumento: 800 x.

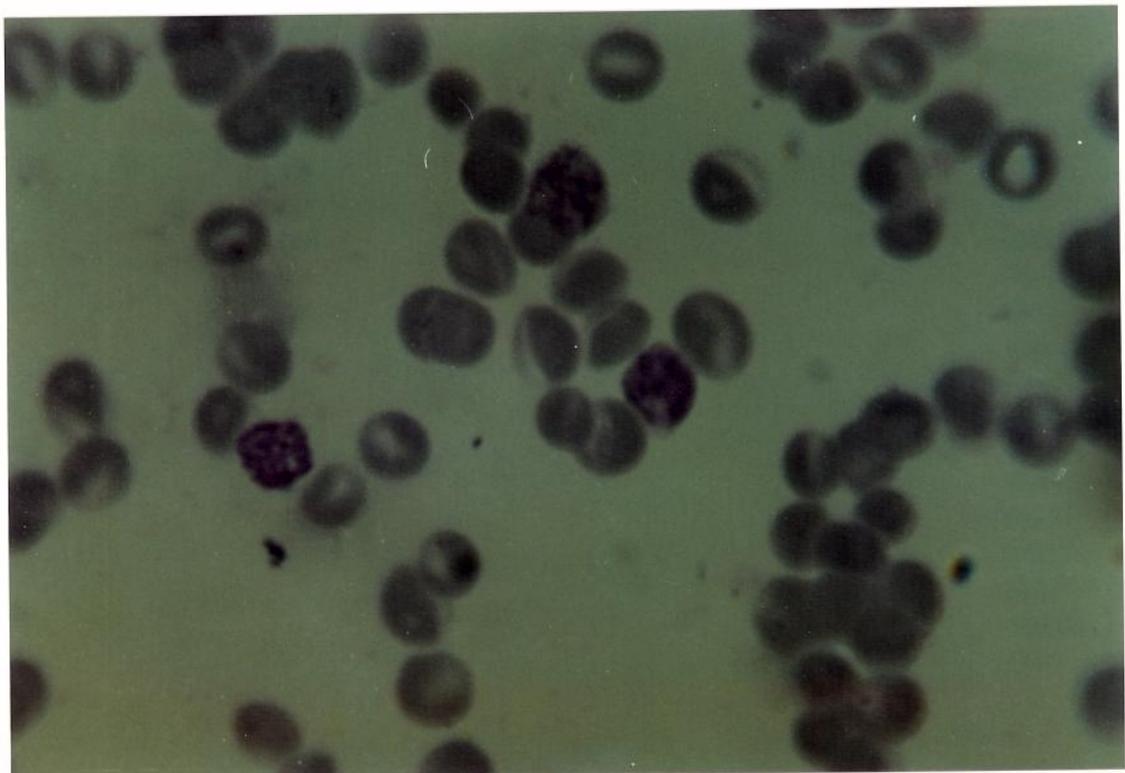


FIGURA 47. Esfregaço de Sangue de Camundongo C57BL/10, 6 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y (cerca de 10% de reticulócitos). Aumento: 800 x.

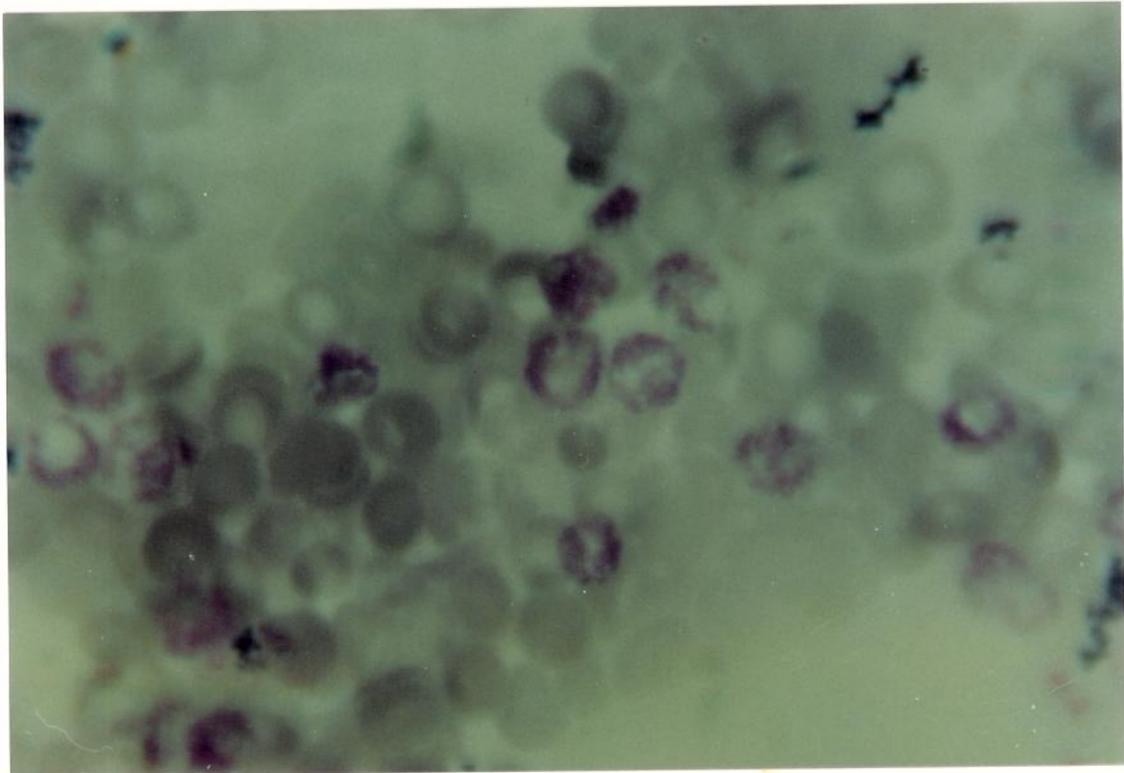


FIGURA 48. Esfregaço de Sangue de Camundongo C57BL/10, 16 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y (cerca de 30% de reticulócitos). Aumento: 800 x.

Os mesmos animais usados para a feitura dos esfregaços de sangue, descritos acima, foram utilizados para as observações citológicas dos baços. Os camundongos foram sacrificados por exanguinação, seus baços retirados e processados pela técnica de imprint. Os resultados são mostrados nas Figuras 49 a 58.

A Figuras 49 mostra o imprint de baço de camundongo não infectado, apresentando padrão citológico normal, constituído na sua maioria por linfócitos maduros, com algumas formas intermediárias e alguns granulócitos neutrófilos e eosinófilos.

No terceiro dia de infecção, começa a alterar-se o padrão citológico dos baços (Figura 50). Observa-se uma discreta infiltração granuloeritroblástica, mas predominando o conteúdo linfocitário. A partir de então, as estruturas linfóides foram gradativamente substituídas por formas mielóides granulocíticas e eritroblásticas (Figura 51, 5 dias de infecção).

No sexto e sétimo dias após a inoculação, a metaplasia mielóide se acentua e observa-se um desvio da curva para a esquerda, ou seja: há predominância de formas intermediárias, principalmente granulocíticas neutrofilicas (Figura 52).

As observações feitas com 9 dias de infecção, mostraram aumento da metaplasia mielóide, que era constituída, principalmente, por granulócitos intermediários e eritroblastos, notando-se, inclusive, a presença de precursor granulocítico em processo de mitose (Figura 53).

Com 12 dias de infecção, a metaplasia mielóide continua evidente, com aumento do número de eritroblastos (Figuras 54, 55 e 56), observando-se a presença de precursor neutrofilico (Figura 54) e de megacariócito (Figura 56).

Com 14 dias de infecção, os baços continuam apresentando estrutura mielóide, mostrando infiltração evidente de precursores granulocíticos (Figura 57).

Dezesseis dias após a inoculação, observa-se acentuada presença de granulócitos intermediários e indiferenciados, além de grande quantidade de eritroblastos (Figura 58).

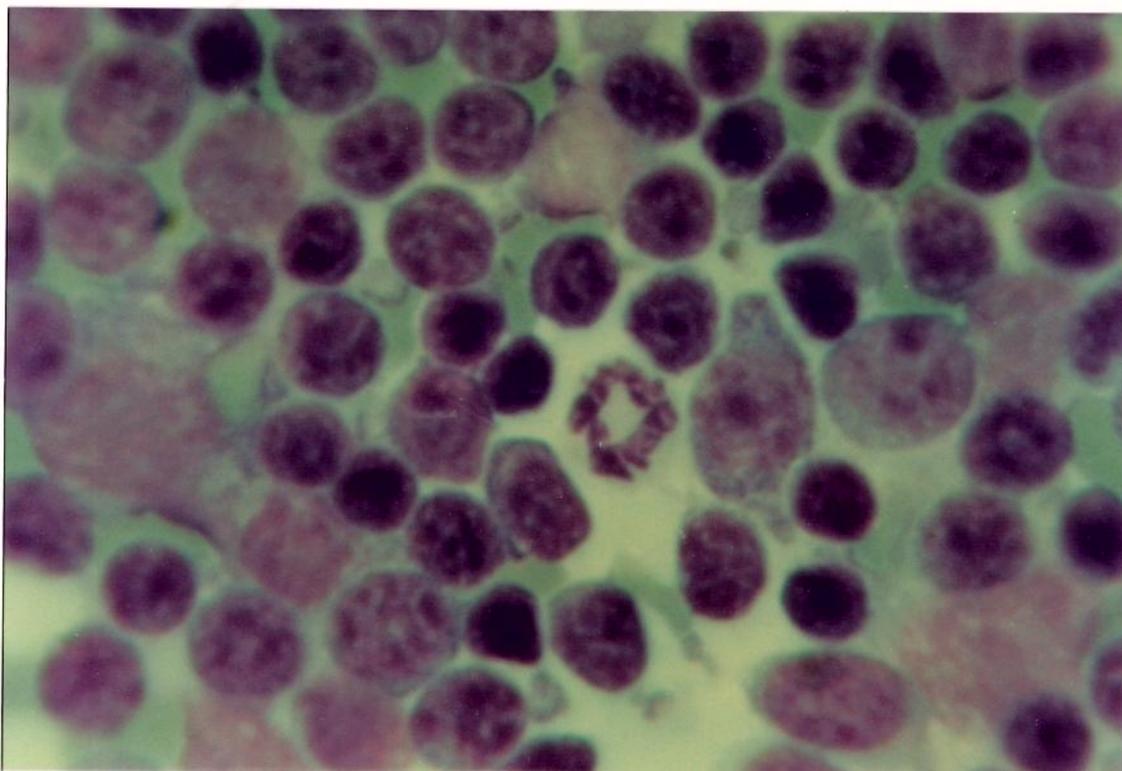


FIGURA 49. Imprint de Baço de Camundongo C57BL/10, não infectado. Padrão citológico linfóide normal. Presença de linfócitos maduros, algumas formas intermediárias e alguns granulócitos neutrófilos e eosinófilos. Aumento: 800 x.

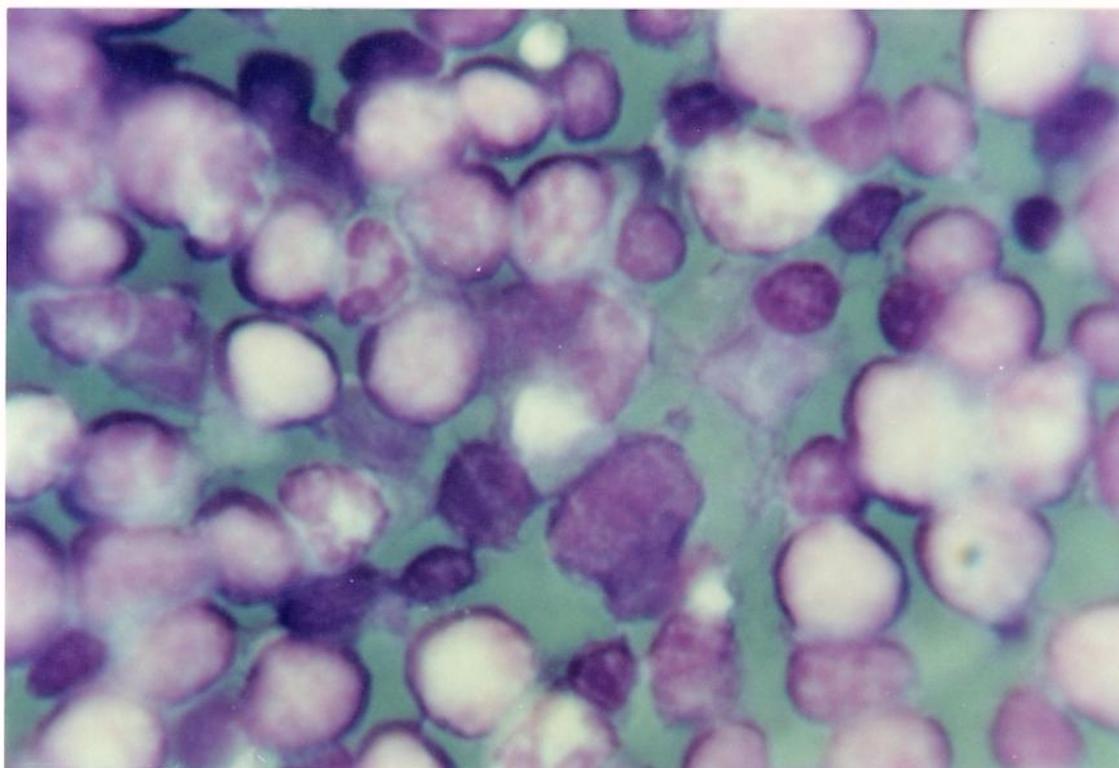


FIGURA 50. Imprint de Baço de Camundongo C57BL/10, 3 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Presença de discreta infiltração granuloeritroblástica. Aumento: 800 x.

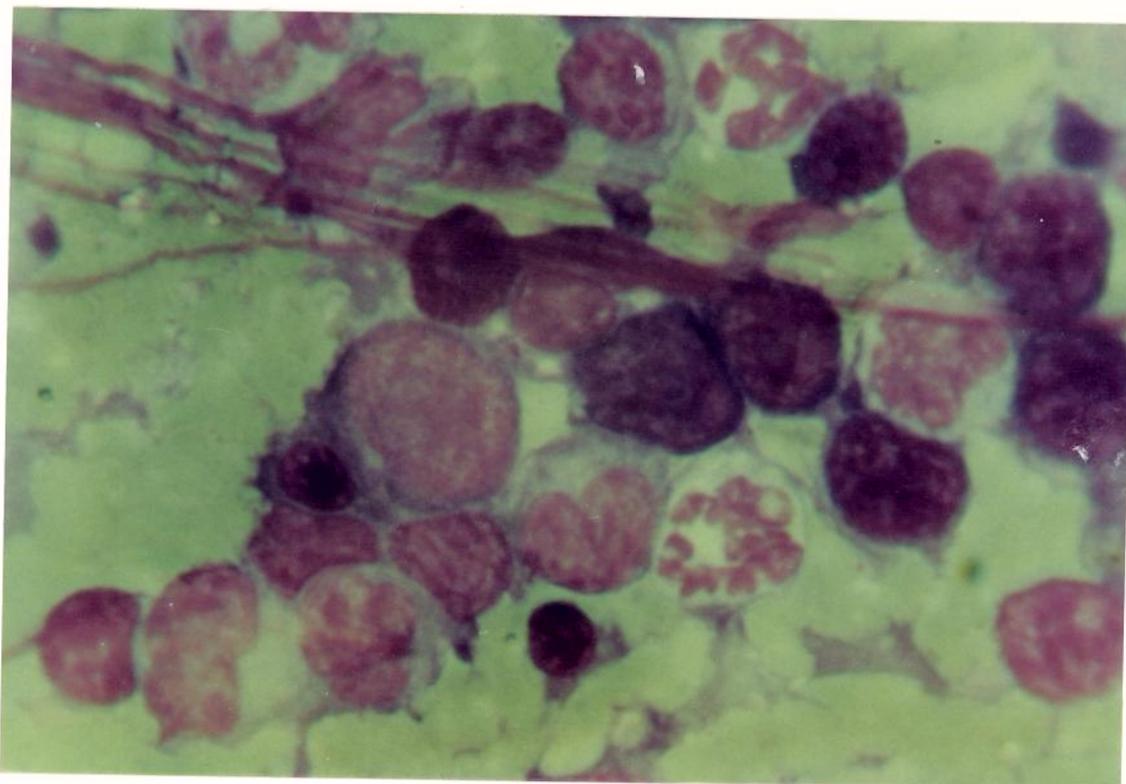


FIGURA 51. Imprint de Baço de Camundongo C57BL/10, 5 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Presença de formas mielóides granulocíticas e eritroblásticas. Aumento: 800 x.

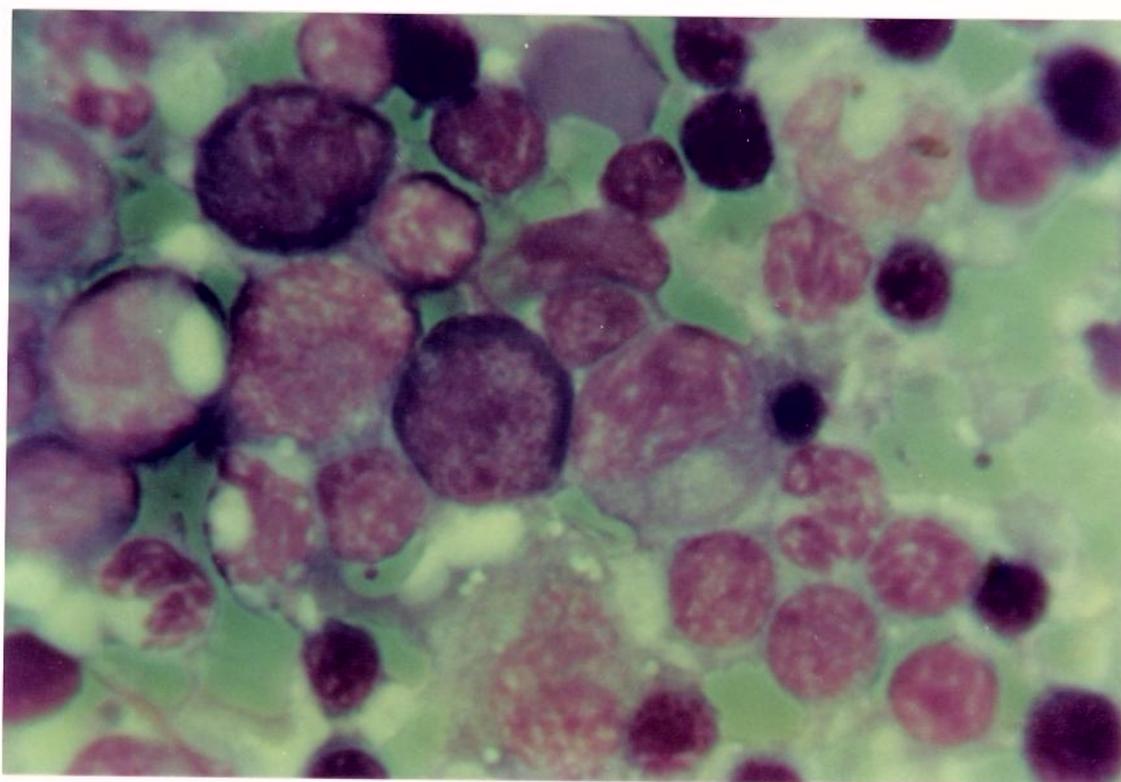


FIGURA 52. Imprint de Baço de Camundongo C57BL/10, 6 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Presença de acentuada metaplasia mielóide, com predominância de formas intermediárias, principalmente neutrofílicas. Aumento: 800 x.

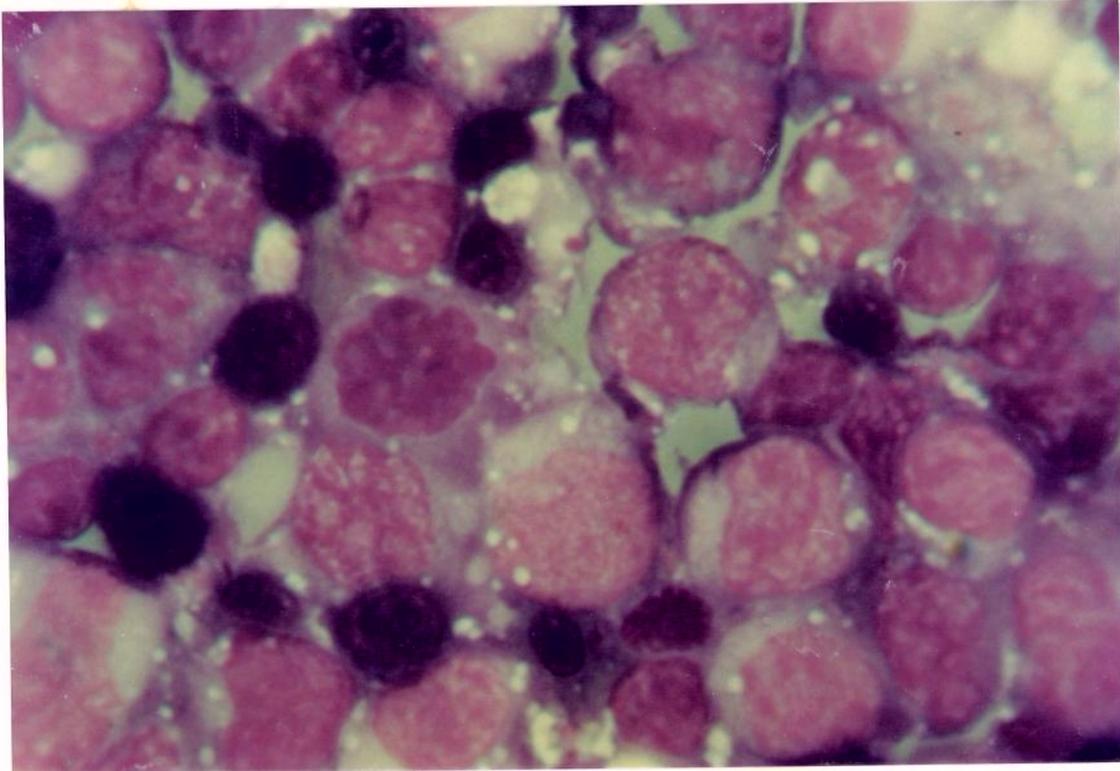


FIGURA 53. Imprint de Baço de Camundongo C57BL/10, 9 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Acentuada metaplasia mielóide, com predominância de granulócitos intermediários e eritroblastos. Presença de precursor granulocítico em processo de mitose. Aumento: 800 x.

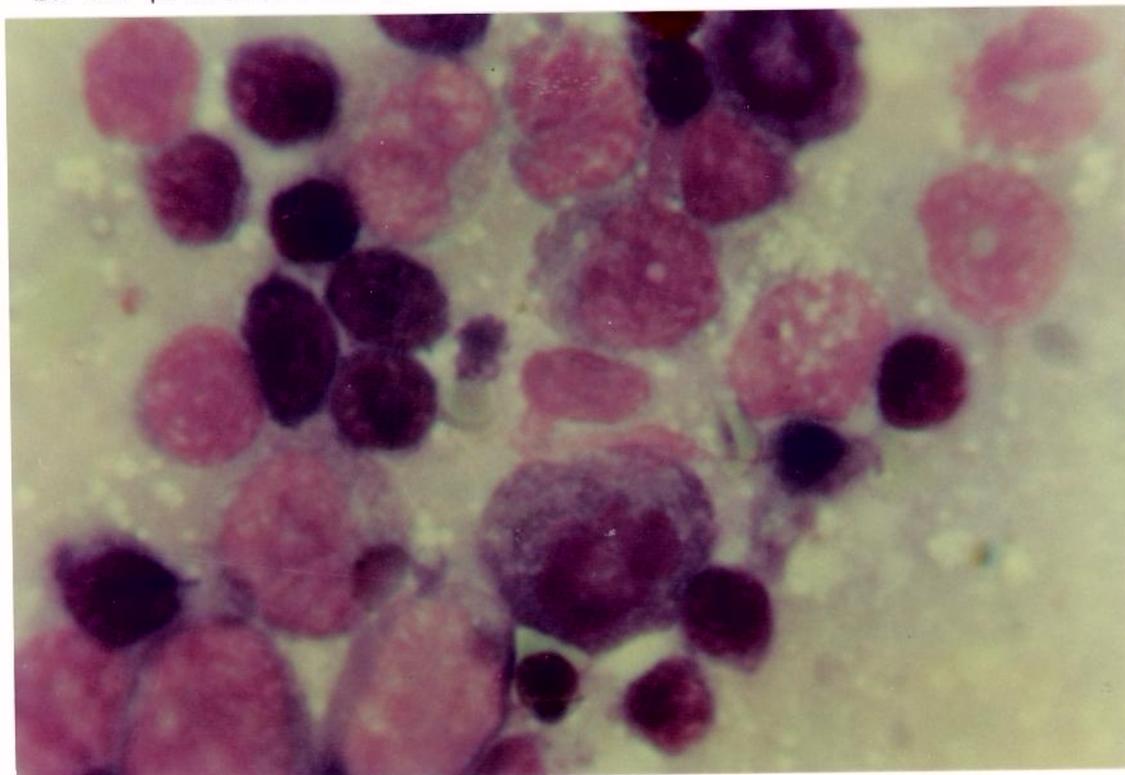


FIGURA 54. Imprint de Baço de Camundongo C57BL/10, 12 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Acentuada metaplasia mielóide, com grande aumento do número de eritroblastos. Presença de precursor neutrofílico em processo de mitose. Aumento: 800 x.

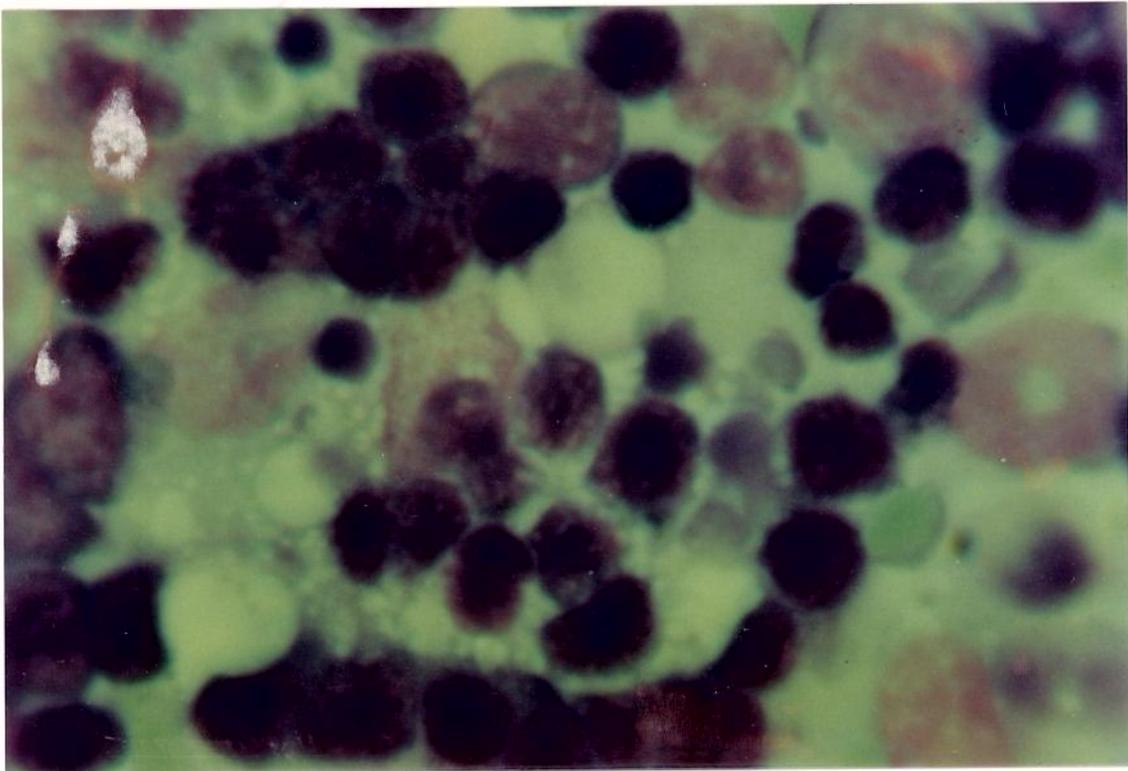


FIGURA 55. Imprint de Baço de Camundongo C57BL/10, 12 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Acentuada metaplasia mielóide, com aumento exacerbado do número de eritroblastos. Aumento: 800 x.

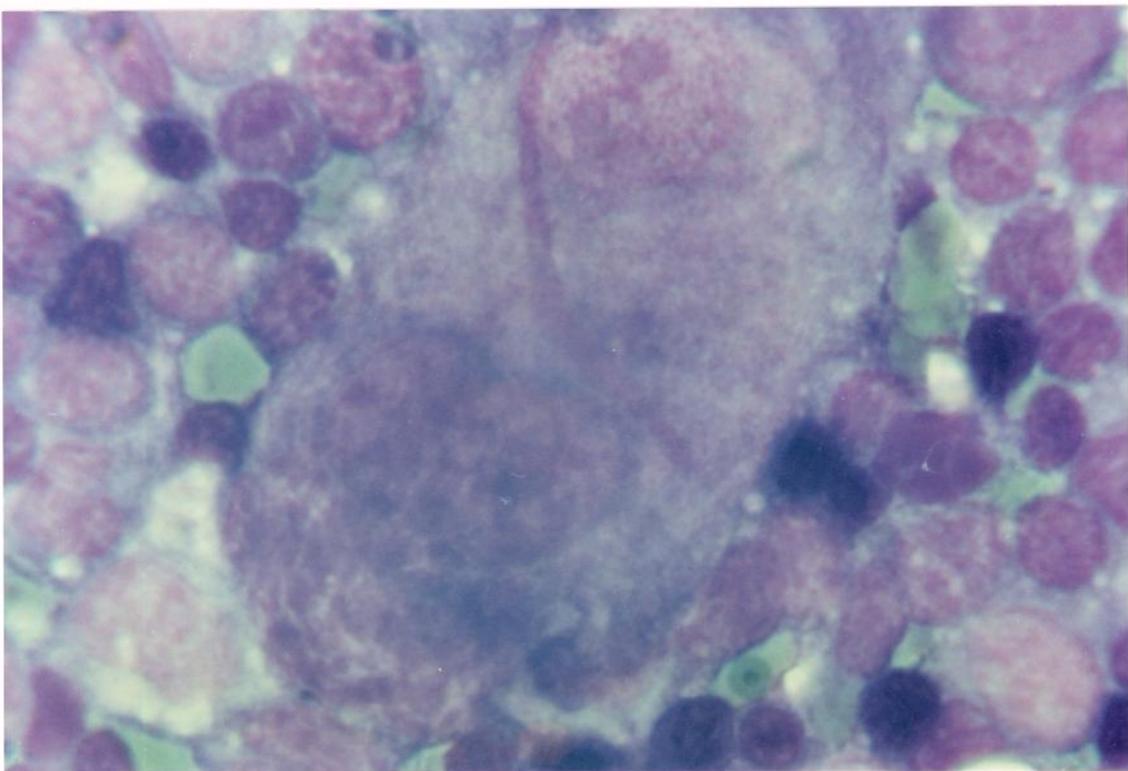


FIGURA 56. Imprint de Baço de Camundongo C57BL/10, 12 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Acentuada metaplasia mielóide, com grande aumento do número de eritroblastos. Presença de megacariócito no percurso laminar. Aumento: 800 x.

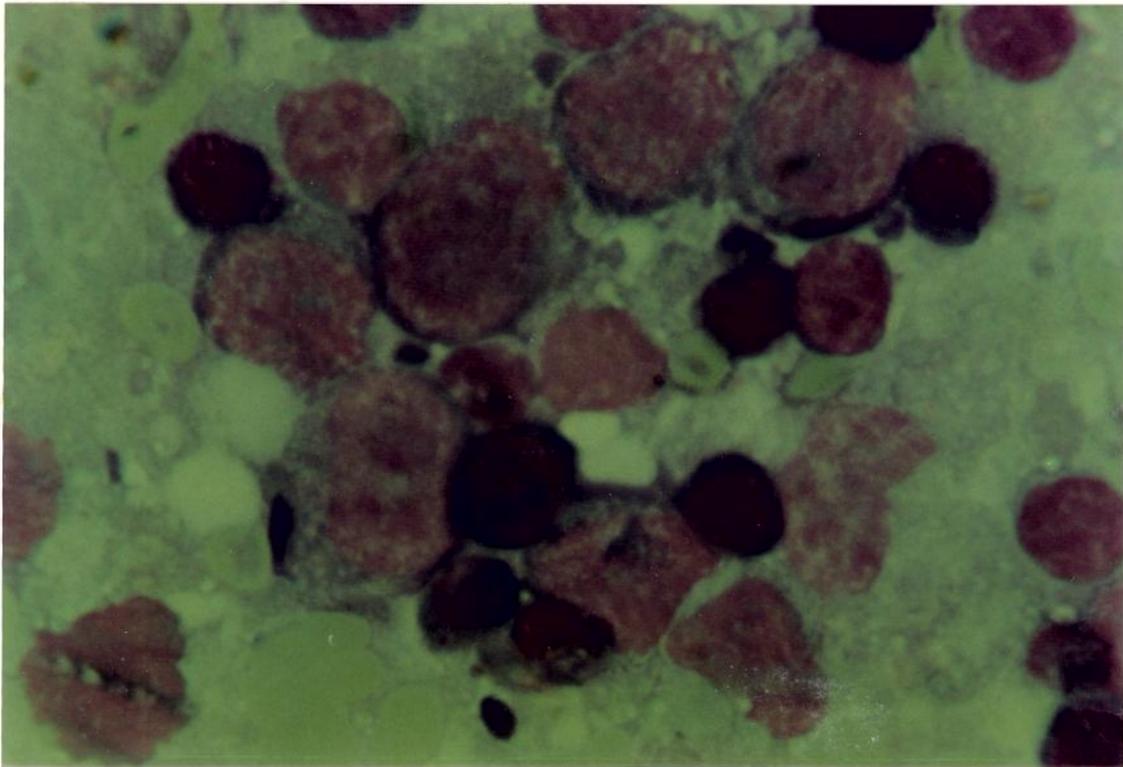


FIGURA 57. Imprint de Baço de Camundongo C57BL/10, 14 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Acentuada metaplasia mielóide, com infiltração evidente de precursores granulocíticos. Aumento: 800 x.

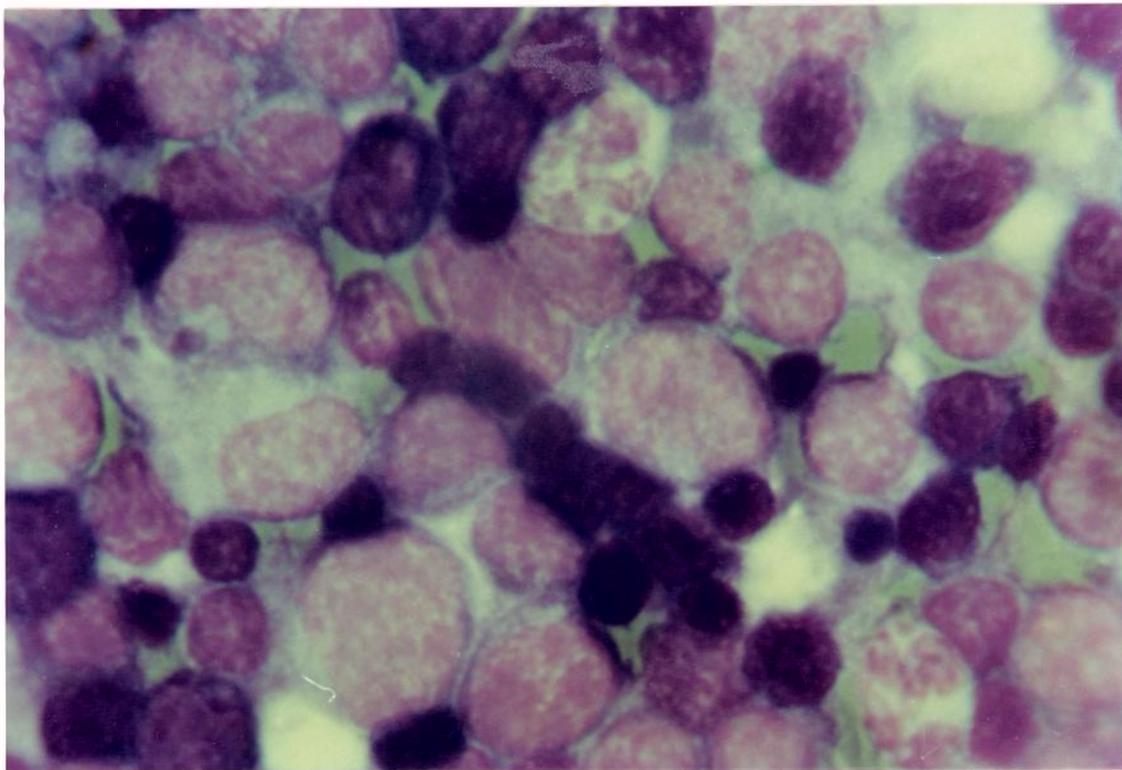


FIGURA 58. Imprint de Baço de Camundongo C57BL/10, 16 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Acentuada metaplasia mielóide, com grande número de granulócitos intermediários e indiferenciados e de eritroblastos. Aumento: 800 x.

VI. Observações Medulares

Camundongos CBA, com idade variando entre dois e três meses, inoculados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, foram utilizados nestes estudos. Os resultados são mostrados nas Figuras 59 a 64.

Os animais não infectados, apresentaram a medula óssea com padrão mielóide normal, constituído pela linhagem eritrocítica, apresentando vários graus de maturidade e, leucopoesse, mostrando todas as formas maturativas, predominando as intermediárias e maduras e a presença normal de um baixo número de linfócitos (Figura 59 e 60) e megacariócitos, alguns com função plaquetogênica e outros com maturação intermediária (Figura 60).

O exame das medulas ósseas dos camundongos infectados não revelou a presença de qualquer forma do tripanosoma, até o sétimo dia após a inoculação. A partir do oitavo dia de infecção, foram observadas formas semelhantes a amastigotas nas células mielóides destes animais. Inicialmente, discreto, o número de células parasitadas foi aumentando gradativamente com o decorrer da infecção.

Com oito dias de infecção, observamos formas semelhantes a amastigotas extracelulares (Figura 61). Nove dias após a inoculação, verificamos formas semelhantes a amastigotas intracelulares, em granulócitos maduros e intermediários (Figura 62).

As observações realizadas onze dias após a inoculação, mostram grande quantidade de formas semelhantes

a amastigotas dentro de precursores granulocíticos e de macrófago (Figura 63), circundado por estruturas granulocíticas, ainda mais jovens.

Ainda com onze dias de infecção, observamos macrófago, fagocitando várias formas semelhantes a amastigotas. Ao redor do macrófago, pode ser observado granulócitos com formas semelhantes a amastigotas presentes no citoplasma (Figura 64).

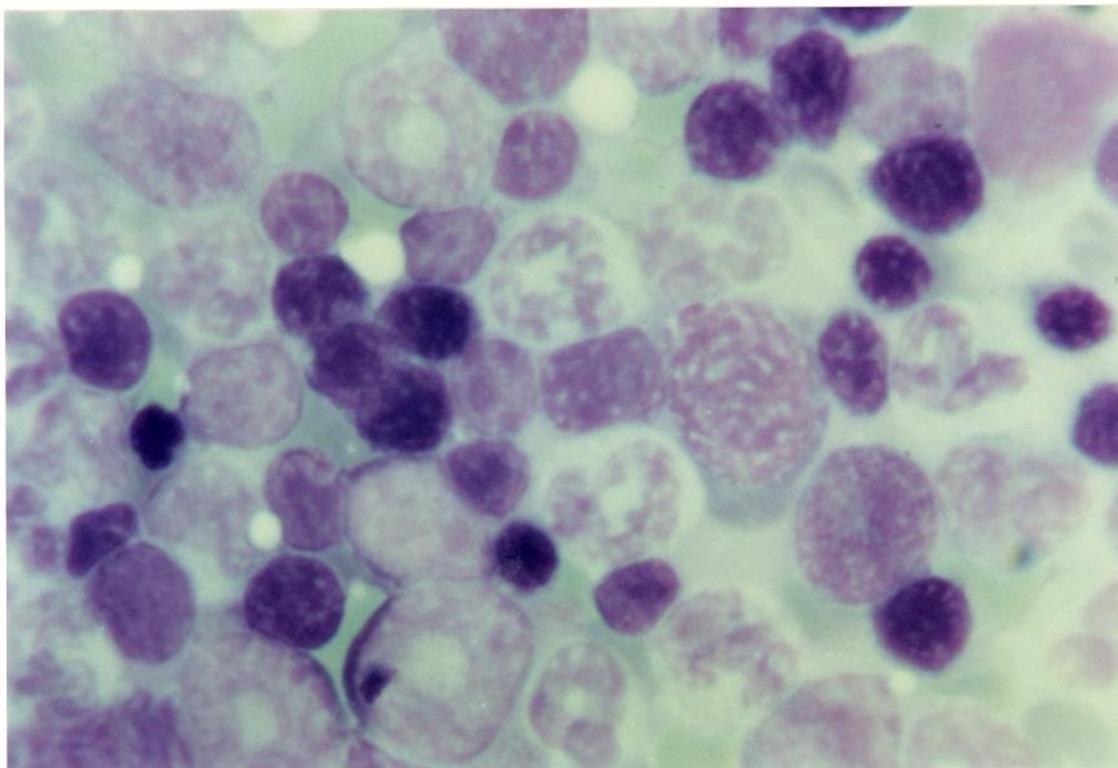


FIGURA 59. Medula Ossea de Camundongo CBA, não infectado. Padrão mielóide normal, constituído pelas séries eritrocítica e granulocítica. Aumento: 800 x.

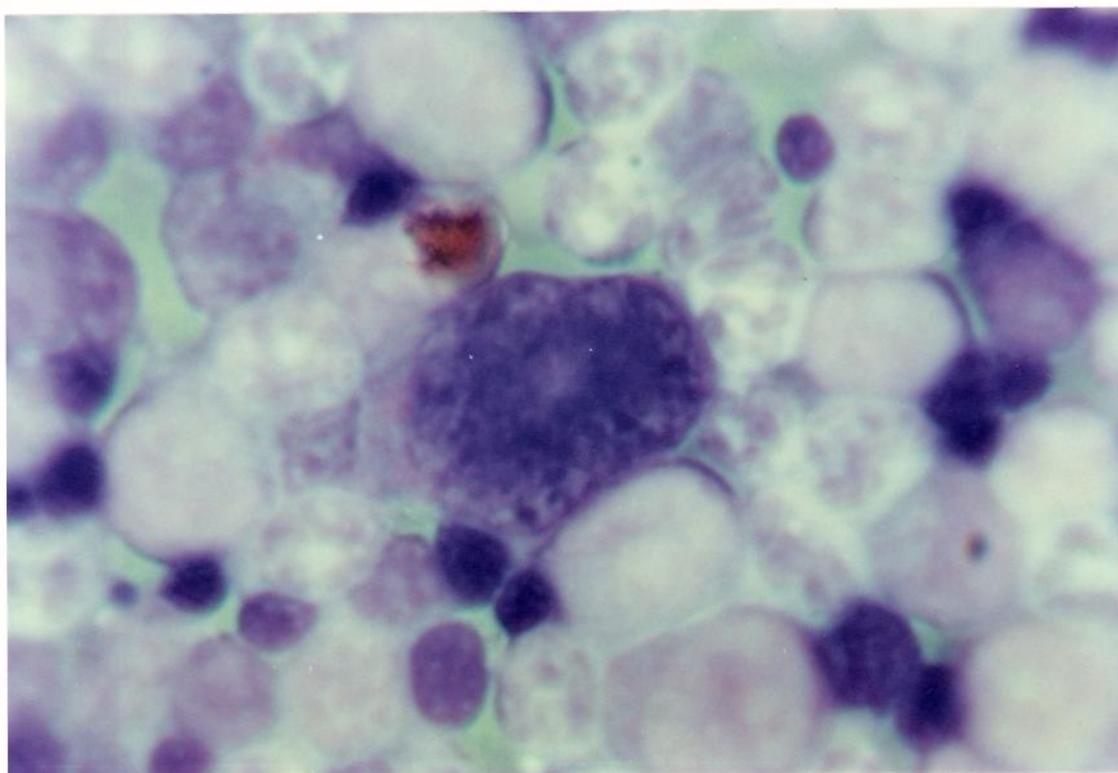


FIGURA 60. Medula Ossea de Camundongo CBA, não infectado. Padrão mielóide normal, constituído pelas séries eritrocítica, granulocítica e megacariocítica. Presença de um pequeno linfócito. Aumento: 800 x.

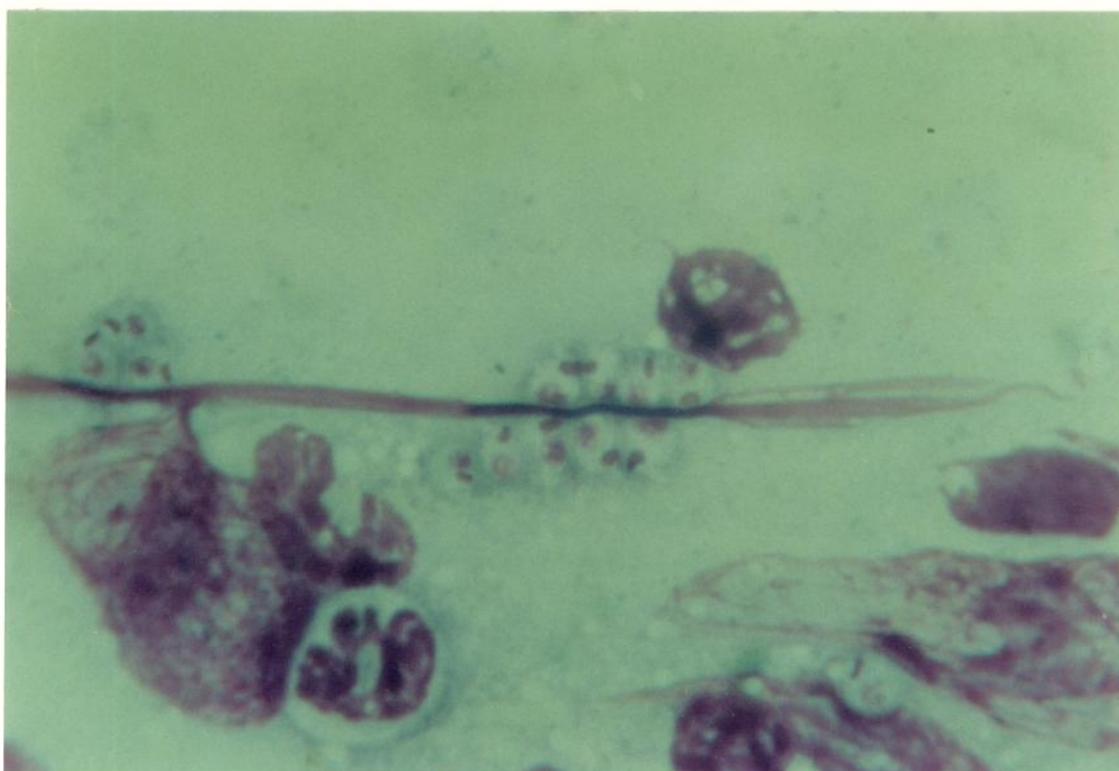


FIGURA 61. Medula Ossea de Camundongo CBA, 8 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Presença extracelular de estruturas semelhantes a amastigotas. Aumento: 800 x.

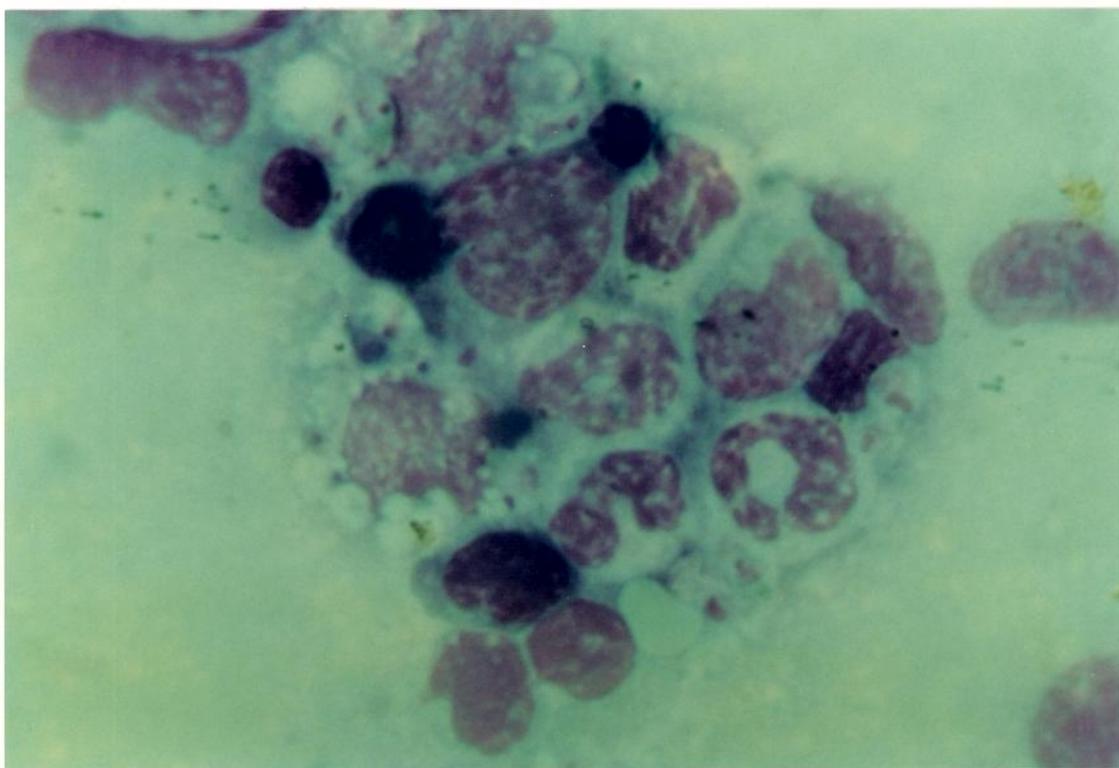


FIGURA 62. Medula Ossea de Camundongo CBA, 8 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Presença de estruturas semelhantes a amastigotas em granulócitos maduros e intermediários. Aumento: 800 x.

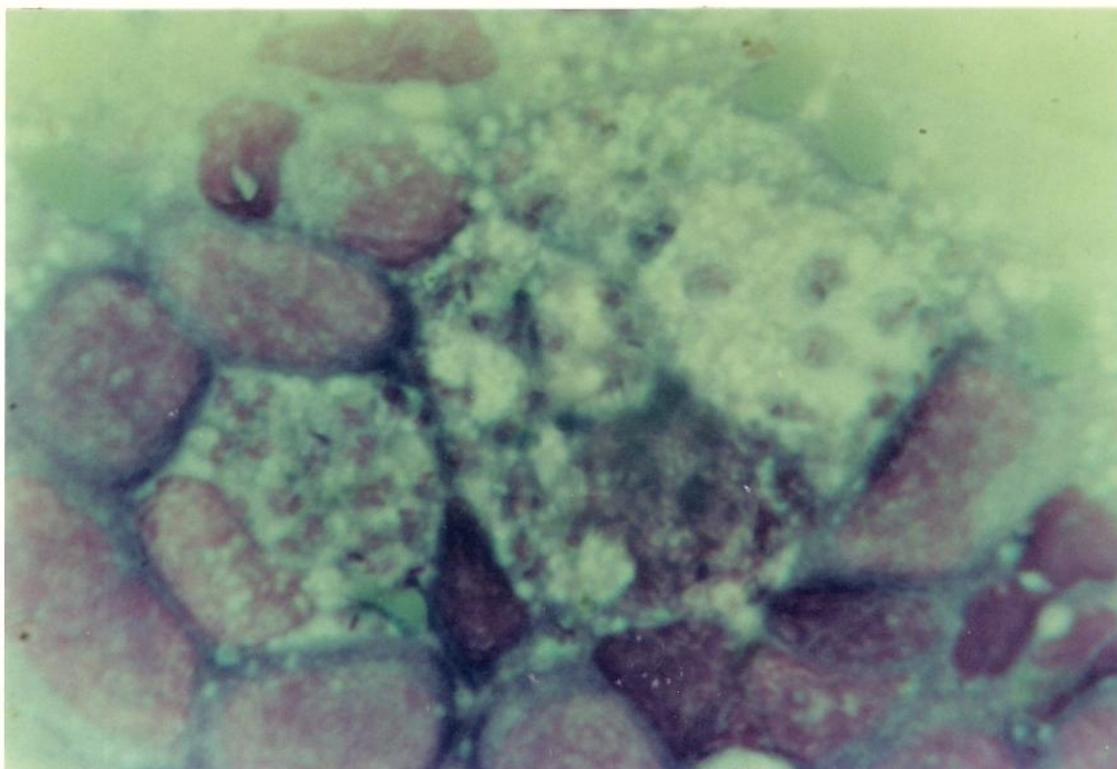


FIGURA 63. Medula Ossea de Camundongo CBA, 10 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Presença de estruturas semelhantes a amastigotas em precursores granulocíticos e em macrófagos. Aumento: 800 x.

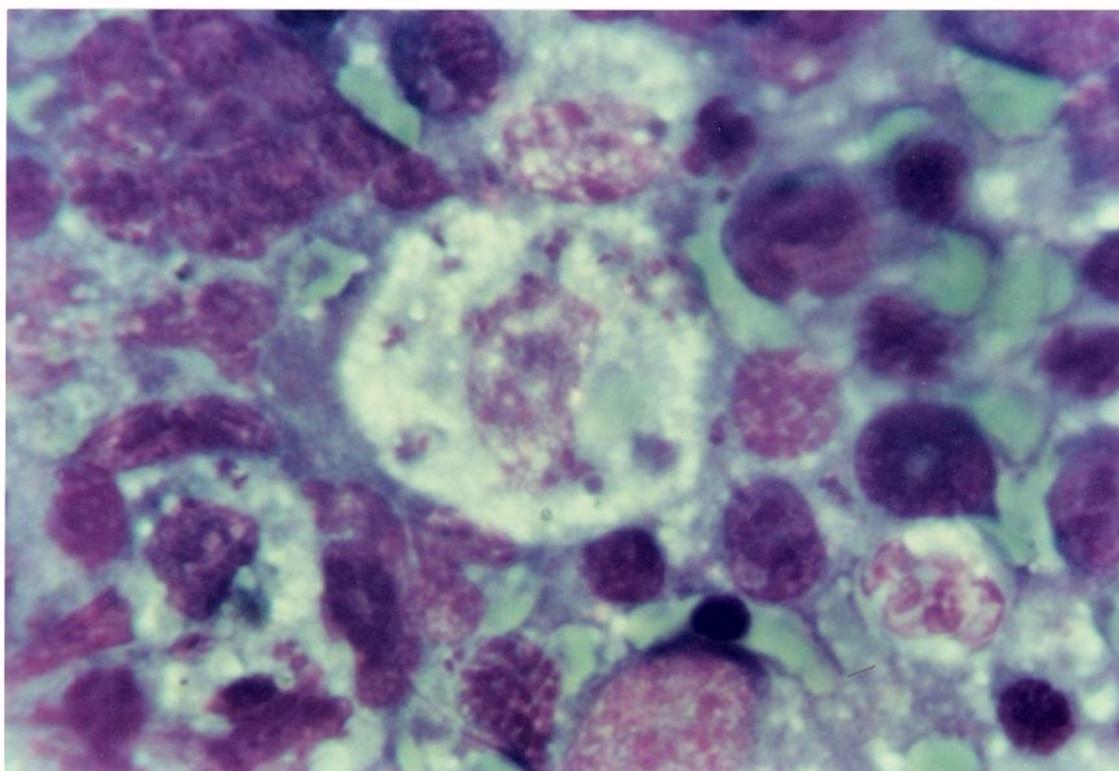


FIGURA 64. Medula Ossea de Camundongo CBA, 11 dias após a infecção com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Presença de estruturas semelhantes a amastigotas em macrófago e em granulócitos. Aumento: 800 x.

Discussão

O efeito de diferentes inóculos de tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* foi estudado em diferentes linhagens de camundongos isogênicos ou não e em camundongos híbridos da geração F1. Foram empregadas nestas experiências, duas das mais representativas cepas de *Trypanosoma cruzi*: a cepa Y (PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG, 1953) e a cepa CL (BRENER & CHIARI, 1963).

Estas cepas, pelas suas características biológicas, morfológicas, parasitológicas, bioquímicas e imunológicas, foram consideradas representantes "tipos" dos "grupos polares", termos introduzidos por BRENER (1977), para designar cepas com características bem distintas.

Nestas experiências foram observados o período pré-patente, o índice parasitêmico, a taxa de mortalidade, algumas alterações hematológicas e esplênicas e observação da medula óssea.

O período pré-patente em todas as linhagens de camundongos estudadas, mostrou-se dose dependente, para a cepa Y. Podemos, entretanto, observar com esta cepa, um período mínimo de 3 dias para o aparecimento dos primeiros

parasitos circulantes, quando a dose máxima (100.000 tripomastigotas/inóculo) foi empregada e um período máximo de 8 dias quando a dose mínima (100 tripomastigotas/inóculo) foi utilizada.

Com a cepa CL, foi difícil a determinação exata de um período pré-patente, em quaisquer das doses utilizadas, uma vez que parasitos circulantes foram observados logo no primeiro dia após a infecção. Este fato ocorre, provavelmente, devido as características intrínsecas da cepa, que apresenta predominância de formas largas. BERTELLI & BRENER (1980), mostraram que estas formas são pouco aptas para infectarem células de cultura de tecido.

In vivo, PIZZI (1963) e BRENER (1969), relataram que em camundongos, as formas tripomastigotas delgadas desaparecem rapidamente, enquanto as formas largas permanecem na circulação por alguns dias, fato, aliás, utilizado por RIBEIRO e colaboradores (1986), para o isolamento destas formas, utilizando camundongos como filtros biológicos.

Podemos, portanto inferir, pelas nossas observações corroboradas por aquelas dos autores acima citados, que o período pré-patente em camundongos experimentalmente infectados, é determinado pelo inóculo utilizado e pela cepa de *Trypanosoma cruzi* empregada, pouca importância parecendo ter a linhagem de camundongo ensaiada na determinação deste período.

O índice parasitêmico mostrou-se como consequência direta do inóculo injetado, para quaisquer das cepas de *Trypanosoma cruzi* empregadas, embora diferenças na parasitemia possam ser observadas entre as duas cepas testadas.

Entretanto, diferentemente do período pré-patente, a linhagem do camundongo determina a duração e a intensidade da parasitemia.

Com a cepa Y, usualmente ocorre uma parasitemia de rápida ascendência, seguida por uma queda brusca do índice parasitêmico. O padrão da curva a partir de então, depende da dose testada e da linhagem de camundongos empregada.

Nos camundongos C57BL/10, após o pico de parasitemia máxima, ocorre uma diminuição no nível de parasitos circulantes, que permanece baixo durante toda a experiência. Vale assinalar, que mesmo com parasitemias insipientes nesta fase, a morte sobrevém para aqueles animais inoculados com as doses mais elevadas.

Com os animais da linhagem CBA, exceção feita àqueles inoculados com a dose mínima (100 tripomastigotas/inóculo), uma nova onda parasitêmica surge, levando à morte todos os animais dos grupos inoculados com as doses mais elevadas, resultados muito semelhantes, em intensidade e duração da parasitemia, bem como da taxa de mortalidade, àqueles obtidos com os camundongos BALB/c e Swiss.

Nos camundongos híbridos (C57BL/10 x BALB/c)F1 e (C57BL/10 x CBA)F1, embora as curvas de parasitemia apresentem os mesmos padrões, o índice parasitêmico é significativamente menor que aqueles das demais linhagens ($P < 0.05$). Estes animais, controlam a onda parasitêmica, mantêm-se com baixos níveis de parasitos circulantes, mesmo quando inoculados com a maior dose testada (100.000 tripomastigotas/inóculo).

Comparando as curvas de parasitemia das linhagens de camundongos e híbridos estudados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, tomando como parâmetro as maiores doses testadas, observamos os menores índices de parasitemia nos híbridos (C57BL/10 x BALB/c)F1 e (C57BL/10 x CBA)F1 seguidos, em intensidade de parasitemia, pela linhagem C57BL/10.

Não observamos diferenças entre os camundongos CBA, BALB/c e Swiss, que apresentaram parasitemias elevadas, embora estes últimos mostrassem o pico de parasitemia de maior intensidade.

Esta característica dos camundongos Swiss, unida a sua rusticidade, tornaram-nos os animais de escolha para a manutenção das cepas de *Trypanosoma cruzi* comumente utilizadas. Os resultados obtidos neste trabalho, mostram comportamento semelhante nos camundongos Swiss, BALB/c e CBA infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. Sendo estes últimos, camundongos isogênicos, poderiam, eventualmente, substituir os camundongos Swiss, na manutenção da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, com a vantagem de apresentarem maior homogeneidade nas respostas.

A taxa de mortalidade destes animais, quando examinada em relação às doses mais elevadas, mostra infecção de decurso fatal para os camundongos BALB/c, CBA e Swiss, já com 15 dias de infecção. Os híbridos (C57BL/10 X CBA)F1 e (C57BL/10 x BALB/c)F1, apresentam baixa mortalidade e passam para a fase crônica.

CORSINI e colaboradores (1980), estudando a suscetibilidade de camundongos isogênicos à cepa Y do

Trypanosoma cruzi, utilizando como inóculo 100 tripomastigotas, relataram que os camundongos CBA são suscetíveis, os C57BL/10 moderadamente resistentes e os híbridos (C57BL/10 x CBA)F1 resistentes, recomendando estes últimos, como modelo para estudos experimentais da doença de Chagas, uma vez que nestes animais, as fases aguda e crônica estão bem caracterizadas. Nossos resultados, encontram-se em consonância com aqueles destes autores.

No nosso trabalho, usamos além dos híbridos (C57BL/10 x CBA)F1, os híbridos (C57BL/10 x BALB/c)F1, aparentemente ainda não utilizados na doença de Chagas experimental. Utilizamos também, doses elevadas como inóculo.

Os camundongos híbridos (C57BL/10 x BALB/c)F1, que receberam 100.000 ou 10.000 tripomastigotas/inóculo, apresentaram no decurso da infecção baixos índices parasitêmicos e uma taxa de mortalidade muito baixa, a maioria passando para a fase crônica .

Os resultados obtidos neste trabalho, recomendam estes animais como modelo experimental para o estudo da fase crônica da doença de Chagas experimental, causada por altos inóculos do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y.

Para a realização destas experiências, utilizamos camundongos com idade variando entre 2 e 3 meses. Preferimos este parâmetro, ao peso, comumente utilizado, uma vez que as diferentes linhagens por nós utilizadas, apresentam características distintas entre si.

Assim, enquanto camundongos BALB/c apresentam um peso médio de 28 e 30 gramas para fêmeas e machos,

respectivamente, com 36 semanas (cerca de 9 meses), camundongos CBA atingem, respectivamente, para machos e fêmeas, 34 e 29 gramas com 16 semanas (POILEY, 1972). Os camundongos Swiss, por nós utilizados, apresentam um peso médio de 28 gramas com apenas 8 semanas de idade.

Em uma experiência utilizando camundongos Swiss, machos e fêmeas, com 1 mês (20-25 g) e 2 meses (25-30 g) de idade, inoculados com 100.000 tripomastigotas, observamos a importância deste parâmetro na evolução da doença de Chagas experimental. Enquanto os primeiros apresentaram infecção com altos níveis parasitêmicos e mortalidade de todos os animais 11 dias após a inoculação, os segundos, embora apresentassem infecção de decurso fatal, tal se deu 17 dias após a inoculação e a parasitemia apresentada foi significativamente menor que aquela dos animais de 4 semanas (Figura 8).

Estas observações sugerem, que a maturidade do animal determina a evolução da doença, sendo este parâmetro mais seguro que o peso, notadamente quando se compara animais de diferentes linhagens.

A comparação entre machos e fêmeas das diversas linhagens ensaiadas com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* não mostrou diferença significativa entre os dois sexos, nem no índice parasitêmico, nem na taxa de mortalidade.

No trabalho pioneiro de HAUSCHKA (1947), a hipótese de uma maior resistência das fêmeas foi aventada, entretanto, PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG (1953), no primeiro trabalho sobre a cepa Y, não encontraram diferenças significativas entre machos e fêmeas, resultados semelhantes aos nossos.

Com a cepa CL, não ocorre um padrão parasitêmico bem definido como aquele comum à cepa Y. Usualmente a parasitemia permanece em ascendência durante o decorrer da experiência, apresentando picos e quedas aleatoriamente.

Comparando as parasitemias das linhagens CBA, BALB/c, Swiss, C57BL/10 e híbridos (C57BL/10 x BALB/c)F1, inoculadas com a maior dose testada (100.000 tripomastigotas), observamos níveis altíssimos de parasitos circulantes nos camundongos Swiss e CBA e níveis relativamente altos nas demais linhagens estudadas. Os camundongos C57BL/10 e híbridos (C57BL/10 x BALB/c)F1, apresentaram entre todos, os menores índices parasitêmicos (Figura 9).

A taxa de mortalidade destes animais foi de 100% para todas as linhagens testadas, com exceção dos híbridos (C57BL/10 x BALB/c)F1. Nenhuma diferença foi observada entre os camundongos CBA, Swiss e BALB/c, que mostraram-se muito susceptíveis ao inóculo testado. A linhagem C57BL/10, apesar de apresentar infecção fatal, mostrou-se mais resistente que as linhagens citadas. Dos híbridos, 30% conseguiram passar à fase crônica, mostrando-se os menos susceptíveis dos animais analisados (Figura 10).

Apesar da alta taxa de mortalidade dos híbridos testados, alguns superstitos passam à fase crônica, podendo ser utilizados para o estudo desta fase na doença de Chagas experimental, obtida por inóculos elevados desta cepa.

As cepas Y e CL são consideradas altamente virulentas para os animais experimentais (PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG, 1953; BRENER & CHIARI, 1963; SCHLEMPER, Jr. e colaboradores, 1986). Os padrões parasitêmicos e as taxas de

mortalidade destas cepas, observados neste trabalho, de uma maneira geral (resguardando-se as diferenças de doses e de linhagens de camundongos utilizadas), estão de acordo com aqueles descritos por seus descobridores (PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG, 1953; BRENER & CHIARI, 1963) e por trabalhos posteriores de diversos autores (BRENER, 1965; BRENER, 1969; HOWELLS & CHIARI, 1975; CORSINI e colaboradores, 1980; SCHLEMPER, Jr. e colaboradores, 1986).

A grande virulência destas cepas, parece está relacionada com os padrões parasitêmicos que elas individualmente apresentam.

A cepa Y, composta predominantemente de formas delgadas (BRENER & CHIARI, 1963), penetram mais facilmente nos tecidos (PIZZI, 1963; BRENER, 1969) e desta forma, mesmo em doses elevadas, desaparecem da circulação, mostrando um período pré-patente mínimo de 3 dias, quando a onda parasitêmica surge, formando picos caracteristicamente elevados que são seguidos por quedas bruscas da parasitemia.

Este decréscimo súbito do nível parasitêmico pode ser explicado tanto pela destruição dos parasitos pela defesa inespecífica (fagocitose) e específica (anticorpo, complemento e fagocitose específica), como pela penetração de novas células do hospedeiro, pelos parasitos circulantes ou, pelos dois mecanismos conjuntamente.

A cepa Y é considerada macrofagotrópica (MELLO & BRENER, 1978). Esta observação tem gerado controvérsias quanto a importância deste fato. KIERSZENBAUM e colaboradores (1974), inoculando formas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*, intraperitonealmente, em camundongos,

observaram uma crescente destruição dos parasitos fagocitados, tanto pelos macrófagos retirados da cavidade peritoneal a intervalos regulares, como por aqueles retirados logo no início da infecção e mantidos *in vitro*.

DVORAK & SCHMUNIS (1972), demonstraram que tripomastigotas obtidas de cultura de tecido, não se multiplicam, nem sobrevivem *in vitro*, em macrófagos peritoneais obtidos de animais normais. Estes resultados sugerem que os macrófagos (tanto de animais infectados com o *Trypanosoma cruzi*, como de animais normais) estão envolvidos na resistência à doença de Chagas experimental.

Por outro lado, HOFF (1975) e NOGUEIRA & COHN (1976), cultivaram tripomastigotas em macrófagos normais, em condições semelhantes às descritas acima. Além disso, as observações clássicas da literatura, consideram o sistema mononuclear fagocitário, particularmente adequado ao parasitismo pelo *Trypanosoma cruzi*.

Deste modo, apresentando a cepa Y predominância de formas que penetram facilmente nos tecidos, a infecção tende a se perpetuar, caracterizando a grande patogenicidade desta cepa.

A cepa CL, apresenta uma parasitemia de padrão ascendente, caracterizada pela presença de parasitos circulantes desde o primeiro dia da infecção.

Este fato ocorre, provavelmente, devido a predominância de formas largas, nesta cepa (BRENER & CHIARI, 1963; BRENER, 1969). As formas largas, são pouco aptas para penetrarem nos tecidos (BERTELLI & BRENER, 1980; RIBEIRO e colaboradores, 1986; PINTO e colaboradores, 1986) e desta maneira, uma

parcela destas formas permanece circulando, enquanto a percentagem de formas delgadas e demais formas largas promovem a infecção tecidual.

Duas das características marcantes destas formas são a sua resistência à lise mediada pelo complemento (KRETTLI & NUSSENZWEIG, 1977) e o baixo índice de fagocitose que elas induzem em macrófagos, *in vitro* (ALCANTARA & BRENER, 1978).

Portanto, provavelmente quando surgem os parasitos da infecção tecidual, estes se somem às formas largas circulantes. A percentagem de formas delgadas desta onda parasitêmica será destruída e/ou infectará novas células, enquanto o número de formas largas na circulação tenderá a aumentar. Esta hipótese explicaria os índices parasitêmicos crescentes, por nós obtidos, bem como as observações de BRENER (1965), que encontrou em suas experiências, percentagens superiores a 90% de formas largas, no estágio tardio da fase aguda da doença de Chagas experimental.

Comparando o comportamento das duas cepas de *Trypanosoma cruzi* estudadas, verificamos que apesar das diferenças na morfologia, no período pré-patente e no índice parasitêmico, a taxa de mortalidade de ambas são semelhantes. O período pré-patente, o pico de máxima parasitemia e o início da mortalidade, ocorrem mais precocemente com a cepa Y. Entretanto, as duas são extremamente letais para os animais experimentados, à exceção dos híbridos, levando à morte os animais infectados ainda na fase aguda da doença.

As observações hematológicas realizadas neste trabalho, mostraram profundas alterações na série vermelha dos animais experimentais. Os resultados dos hematócritos de todas as linhagens testadas, inoculadas com as cepas Y ou CL do *Trypanosoma cruzi*, indicaram o surgimento de uma anemia severa no decorrer da experiência.

Os níveis dos hematócritos começam a cair já no primeiro dia de infecção e continuam em descenso, usualmente durante duas semanas, quando uma recuperação da anemia tende a ocorrer.

Nos animais normais, ocorre também uma queda no nível do hematócrito a partir do segundo dia do exame, permanecendo este nível abaixo do normal, embora significativamente mais elevado que o dos animais infectados (cf. Figura 17).

Esta queda no nível dos hematócritos dos animais normais, pode ser explicada pelo stress, infecções devido a quebra da barreira mecânica da pele, perda continuada de sangue ou a junção de todos estes fatores. Entretanto, não há em nenhum momento da experiência, uma queda tão brusca como aquelas observadas nos animais infectados, tanto com a cepa Y como com a cepa CL.

Não obstante a queda nos valores do hematócrito dos animais normais, comparando-se os percentuais mínimos de cada curva, observamos diferenças significativas ($p < 0.05$), entre o resultado dos animais normais e aqueles dos animais infectados com os diferentes inóculos da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, mostrando, aparentemente, um mecanismo de causa e efeito entre Doença de Chagas e percentual de hematócrito.

Não foram observadas diferenças significativas entre machos e fêmeas de qualquer linhagem, infectados com qualquer inóculo de ambas as cepas testadas, bem como também não se verificou diferenças nos níveis dos hematócritos de animais de mesma linhagem, inoculados com a mesma dose da cepa Y ou CL.

A comparação de diferentes linhagens inoculadas com uma mesma dose da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, embora não apresente diferenças significativas, mostra os camundongos híbridos com uma taxa de hematócrito ligeiramente superior, e melhor recuperação da anemia inicial (Figura 22).

Com as linhagens CBA, híbridos (C57BL/10 x BALB/c)F1 e C57BL/10, infectadas com a dose máxima (100.000 tripomastigotas) da cepa CL (Figura 24), observamos uma profunda anemia aproximadamente com 2 semanas após a inoculação, notadamente nos camundongos CBA. Os camundongos híbridos (C57BL/10 x BALB/c)F1 apresentaram a menor queda no percentual do hematócrito e no terço final da infecção, mostravam resultados próximos dos níveis normais.

Embora não houvessem diferenças bem delimitadas nos resultados dos hematócritos das diversas linhagens, inoculadas com a cepa Y ou CL, podemos observar uma superioridade dos híbridos sobre as demais linhagens, também neste parâmetro.

Os nossos resultados mostram que durante a infecção com inóculos elevados das cepas Y ou CL do *Trypanosoma cruzi*, ocorre uma grave alteração hematológica nos animais experimentais, que se caracteriza pelo aparecimento de uma anemia profunda.

REPKA e colaboradores (1985), trabalhando com camundongos Swiss infectados com uma dose letal 50% (cerca de 200 parasitos) da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, descreveram nestes animais, uma discreta anemia que ocorria entre a segunda e sexta semanas da infecção.

Estes resultados diferem dos nossos, provavelmente devido a diferenças nos inóculos e nas linhagens de camundongos utilizadas.

Naquele trabalho, REPKA e colaboradores (1985), sugerem como possível mecanismo, para a anemia observada, uma destruição aumentada das células vermelhas alteradas pela adsorção de antígenos do parasito.

Os dados da literatura hematológica clássica, mostram que várias alterações podem ocorrer nas células vermelhas, durante um processo anêmico agudo. Observando esfregaços de sangue de animais infectados com as cepas Y ou CL do *Trypanosoma cruzi*, verificamos já a partir do terceiro ou quarto dias de infecção, o aparecimento de uma discreta policromasia, que se acentua ao redor do quinto ao oitavo dias (Figuras 26 e 27).

A policromasia é detectada pelo surgimento de hemácias que, quando coradas pelos corantes hematológicos habituais, apresentam coloração azulada, indicando uma eritropoese reacional da medula óssea, ou seja: há uma eritropoese fora do ritmo normal, cuja finalidade é suprir a deficiência de hemácias circulantes.

Para dirimir dúvidas com relação a policromasia, realizamos também colorações com o Azul de Cresil Brilhante, um corante supra-vital, que evidencia reticulócitos. A

contagem diferencial destas células, nos animais normais, mostrou 1% a 3% de reticulócitos, resultados, aliás, em consonância com aqueles descritos na literatura, para camundongos normais (RUSSEL & FONDAL, 1951). No quinto dia de infecção, a contagem diferencial mostrou, em camundongos C57BL/10 infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, taxas variando de 20 a 40% (cf. Figuras 44 a 48), confirmando a presença de acentuada policromasia. Esta policromasia tende a diminuir na segunda semana de infecção, chegando a níveis próximos dos normais, quando os reticulócitos dão lugar à presença de outras células alteradas, contendo corpúsculos de Jolly, pontilhado basófilo e, inclusive, precursores eritrocitários (Figuras 28 a 33).

Na terceira semana de infecção, volta a crise reticulocitária, com a taxa média de reticulócitos chegando à 30% (Figura 48). Aparentemente, ocorre um ciclo bem definido, dentro do qual células da série vermelha, alteradas na forma, no tamanho ou maturidade, são lançadas na circulação numa tentativa de controlar a anemia profunda que ocorre durante o processo infeccioso. Inicialmente, reticulócitos, depois células com corpúsculos de Jolly ou pontilhado basófilo e por fim, o próprio precursor, ou seja, o eritroblasto.

Nas observações feitas em camundongos BALB/c, infectados com 100.000 tripomastigotas da cepa CL, verificamos, a partir do décimo primeiro dia de infecção, graves alterações na série vermelha (Figuras 28 e 29). Constatamos nestes esfregaços, acentuada policromasia,

hipocromia, pontilhados basófilos, corpúsculos de Jolly e anisopecilocitose.

A hipocromia é caracterizada pela deficiência de hemoglobina nas hemácias, que aparecem nos esfregaços com a sua coloração normal alterada. A deficiência de hemoglobina leva à hipoxia tecidual, fato este, que leva à síntese de eritropoetina que estimula a eritropoese. Como consequência, são lançadas na circulação células que não completaram totalmente a sua maturação, inclusive precursores eritrocitários (eritroblastos).

A presença de pontilhado basófilo e corpúsculos de Jolly, observados nestes esfregaços, indicam claramente a imaturidade destas células.

Na eritropoese normal, os eritroblastos realizam a cariorrexis, transformando-se em hemácias que são lançadas na circulação. Durante um processo anêmico agudo, a eritropoese torna-se desorganizada, não ocorrendo a destruição total do núcleo do eritroblasto e a hemácia dele resultante, chega à circulação com restos nucleares (corpúsculos de Jolly) ou apresentando restos de ácidos nucleicos (pontilhado basófilo).

Ainda em virtude desta eritropoese desorganizada, hemácias alteradas na forma e no tamanho (anisopecilocitose), chegam ao sangue circulante.

Resultados similares aos descritos acima, foram observados com camundongos C57BL/10 inoculados com 100.000 tripomastigotas da cepa CL (Figura 30) ou com 10.000 parasitos da cepa Y (Figuras 31 a 33). Neste grupo, observamos com 21 e 22 dias de infecção, a presença de eritroblastos no percurso laminar (Figuras 31 e 32).

Estes resultados estão de acordo com aqueles observados nos hematócritos. A presença de uma anemia profunda é detectada quer pela acentuada queda nos níveis dos hematócritos, quer pela presença de graves alterações na série vermelha, incluindo a presença de precursores eritrocitários no percurso laminar.

As observações aqui relatadas, são características de quadro anêmico profundo. A hipocromia grave, pode levar à morte pela hipoxia tecidual e a destruição sistemática dos eritrócitos pode levar ao choque hipovolêmico, que tem como consequência, quase sempre a morte.

As observações esplênicas, todas realizadas em camundongos C57BL/10, infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, mostraram, ao exame macroscópico, esplenomegalia discreta a partir do terceiro dia de infecção, que se acentua a contar de então, atingindo o máximo 11 dias após a inoculação (Figura 34). A partir da terceira semana de infecção, a esplenomegalia tende a regredir, não atingindo, entretanto, o padrão normal, ao fim da experiência.

Os exames histológicos dos baços dos animais infectados, mostraram a partir do terceiro dia após a inoculação, aumento dos nódulos linfáticos, que se tornam hipertrofiados a partir do quinto dia de infecção (cf. Figuras 36 a 43). Nas observações feitas a partir do nono dia, observa-se uma desorganização dos baços, não havendo mais distinção entre as polpas branca e vermelha (Figuras 39 a 43).

Baseando-nos apenas nas observações histológicas, supomos que o grande infiltrado celular observado nos baços dos animais chagásicos, a partir do nono dia de infecção, fosse devido a uma grande proliferação linfóide, consequência de poderoso estímulo antigênico, provocado pela presença e multiplicação do *Trypanosoma cruzi*, nestes animais.

Para verificar a natureza das células presentes nos baços dos animais chagásicos, repetimos as experiências e examinamos, através de imprint, a população celular destes órgãos.

Constatamos, que a medida que a infecção progride, a população linfóide vai sendo gradualmente substituída por células mielóides. O que ocorre, portanto, é uma metaplasia mielóide, que se inicia, discretamente, já a partir do terceiro dia de infecção, onde já se pode observar uma pequena infiltração de células granuloeritroblásticas (Figura 49). A partir do sexto e sétimo dias de infecção, a metaplasia mielóide se acentua e até a morte dos animais, podem ser observados, nestes baços, quase todos os tipos celulares mielóides, ou seja: células das séries granulocítica, eritrocítica e megacariocítica (cf. Figuras 49 a 58).

Portanto, o que ocorre nestes camundongos, é a transformação, durante o período agudo da doença de Chagas experimental, da função linfóide do baço em função mielóide.

O que poderia levar, o maior órgão linfóide, que apresenta uma estrutura bem definida, com regiões T-dependente e B-dependente, sede principal das respostas

imunológicas, a, durante um processo infeccioso agudo e grave, deixar de realizar suas funções naturais e primordiais, para funcionar como um órgão de produção mielóide?

Em roedores, o baço pode funcionar como órgão homopoético (DUNN, 1954). A função homopoética do baço, é comum em recém-nascidos e em fêmeas grávidas, mas não é comum em adultos jovens, como os por nós usados (FOWLES & NASH, 1968). Entretanto, alguns estímulos podem levar adultos jovens à eritropoese esplênica. Entre estes, incluem-se infecções bacterianas, toxinas bacterianas e reação de enxerto contra o hospedeiro (FRUHMANN, 1970). Outro mecanismo que leva a uma grande atividade homopoética do baço, é a anemia, especialmente a anemia hemolítica congênita (AMBRUS e colaboradores, 1964). Portanto, podemos conjecturar, que a anemia severa observada nos animais chagásicos, seria responsável pela metaplasia mielóide.

A medida em que há uma diminuição sistemática do número de eritrócitos circulantes, por nós verificada através de hematócritos diários destes animais, a medula óssea, sede da homopoeese, procura suprir esta deficiência lançando na circulação novas hemácias. O processo envolve a produção de eritropoetina, que estimula a eritropoese. Em condições normais, isto ocorre para manter o equilíbrio entre o número de hemácias naturalmente (e diariamente) descartadas pelo organismo e aquelas que as substituirão.

No caso da doença de Chagas experimental, *nas condições por nós ensaiada e estudada*, a destruição sistemática dos eritrócitos, leva a uma eritropoese

reacional, cuja consequência observamos e descrevemos neste trabalho, qual seja: são lançadas na circulação células vermelhas imaturas, apresentando corpúsculos de Jolly ou pontilhado basófilo, hemácias com conteúdo insipiente de hemoglobina (hipocromia), células alteradas no tamanho e na forma (anisopecilocitose). Em determinado momento da infecção, o próprio precursor eritrocítico é lançado à circulação sanguínea.

Pode-se deduzir, portanto, pela gravidade da situação, que a medula óssea não consegue cumprir a contento suas funções, levando o baço a suprir esta deficiência, em detrimento da perda de sua função linfóide, principal, com consequências, provavelmente drásticas, para as respostas imunológicas necessárias à saúde do animal. Também é possível deduzir, que a homopoese torna-se mais importante que a linfopoese, nestas circunstâncias.

Parece-nos claro, portanto, que ocorre uma crise grave na medula óssea, durante a doença de Chagas experimental, nas condições por nós estudada. Trabalhando com base em conjecturas, tentamos explicar esta crise, através de quatro hipóteses não excludentes.

Na primeira, a anemia profunda (que para nós está relacionada com a crise esplênica dos animais chagásicos), seria produzida pela destruição sistemática de hemácias recobertas com antígenos do parasito, adsorvidos à sua superfície (REPKA e col., 1985). Esta hipótese é interessante, pois explicaria a homopoese reacional da medula óssea, com as consequências já descritas aqui. Antígenos solúveis (ou não), adsorvidos às hemácias dos

animais chagásicos, levariam à síntese de anticorpos líticos, que juntamente com o concurso do complemento e da fagacitose, permeada por componentes opsonizantes do complemento, levariam à destruição metódica dos eritrócitos e à sua ilação: a homopoesse reacional.

Entretanto, como se pode observar uma discreta infiltração de células mielóides, no baço dos animais chagásicos, já no terceiro dia de infecção, que se acentua do quinto dia em diante, parece-nos que a crise medular ocorre muito cedo, quando o nível de anticorpos líticos circulantes, contra os presumíveis antígenos do parasito adsorvidos às hemácias, ainda é, provavelmente, baixo.

Um outro mecanismo, dentro desta hipótese, pode ser aventado. As hemácias alteradas pelos antígenos do parasito poderiam, graças às características fisicoquímicas destes antígenos, ativar o complemento pela via alternativa e a destruição dos eritrócitos, neste caso, ocorreria precocemente, já que a ação do complemento por esta via, prescinde da presença de anticorpos líticos.

A segunda hipótese, refere-se a ação de neuraminidase do *Trypanosoma cruzi*. Atualmente, vem sendo demonstrado que as formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, apresentam uma atividade de neuraminidase (PEREIRA, 1983; PEREIRA, 1983a; CSETE e colaboradores, 1985). A neuraminidase, é uma glicoproteína que remove resíduos terminais de ácido siálico, contidos em macromoléculas (GOTTSCHALK, 1972).

O ácido siálico tem um papel crítico na regulação da via alternativa do complemento, tendo sido demonstrado que regula o número de sítios de C_{3b}, disponíveis para BIH.

A deficiência de ácido siálico na superfície celular, transforma a célula numa partícula ativadora da via alternativa do complemento (FEARON, 1978).

A ação da neuraminidase do *Trypanosoma cruzi*, poderia tornar os eritrócitos susceptíveis à lise pela via alternada do complemento. Esta possibilidade, explicaria a destruição de eritrócitos e a consequente homopoeese reacional, por nós observada.

O ácido siálico é de grande importância para o funcionamento normal de leucócitos, plaquetas e eritrócitos. Plaquetas tratadas com neuraminidase, são rapidamente retiradas da circulação, pelo fígado (CHOI e col., 1972). Linfócitos que sofrem a ação da neuraminidase, apresentam um padrão de circulação anormal: eles se localizam no fígado (e lá são retidos) ao invés de seus sitios normais, o baço e linfonodos (WOODRUFF e col., 1977).

Com a idade, os eritrócitos perdem seu conteúdo de ácido siálico de superfície. Este fenômeno, regula o tempo de vida das hemácias, uma vez que, deficientes em ácido siálico, elas são descartadas da circulação pelo baço e pelo fígado. Eritrócitos tratados com neuraminidase, mimetizam eritrócidos envelhecidos e são rapidamente tirados da circulação, pelo fígado e pelo baço (JANCIK e col., 1978).

Estes fenômenos poderiam, também, explicar os resultados por nós obtidos, em camundongos chagásicos. A ação da neuraminidase do *Trypanosoma cruzi*, sobre plaquetas, linfócitos e eritrócitos e sua retirada de circulação, criaria a necessidade de reposição destas

células e, de acordo com a gravidade da situação, a crise medular e esplênica, por nós observada, ocorreria como consequência.

Tem-se demonstrado, entretanto, que a atividade de neuraminidase do *Trypanosoma cruzi*, ocorre por um curto período de tempo e que, um fator sérico que bloqueia esta atividade, desenvolve-se e perdura por toda a infecção chagásica (De TITO & ARAUJO, 1987). Este fator bloqueador da atividade de neuraminidase, inexistente antes da infecção e, interessantemente, só aparece quando são detectados anticorpos para os antígenos do *Trypanosoma cruzi* (De TITTO & ARAUJO, 1987).

O rápido desenvolvimento de uma atividade sérica, que bloqueia a neuraminidase do *Trypanosoma cruzi*, sugere que, se a neuraminidase tem um papel importante no mecanismo de invasão das células do hospedeiro, isto deve ocorrer somente, durante a fase inicial da infecção (De TITTO & ARAUJO, 1987). Esta hipótese, também limitaria a importância da neuraminidase no desenvolvimento das alterações hematológicas, ao estágio inicial da fase aguda da infecção chagásica.

A terceira hipótese, por nós levantada, presume a possibilidade de o *Trypanosoma cruzi*, secretar ou excretar substância(s) com ação tóxica direta sobre a medula óssea, comprometendo, temporariamente, a homopoese. Tais substâncias, poderiam inclusive, exercer alguma ação imunogênica.

Semelhantemente ao que ocorre no tétano, onde o *Clostridium tetani*, localizado num sítio qualquer do

organismo, produz toxinas que atuam noutro (sistema nervoso central), o *Trypanosoma cruzi*, localizado nos tecidos ou circulando, poderia liberar substâncias que exerceriam sua ação na medula óssea.

Tal fato ocorre, realmente, em algumas infecções bacterianas e viróticas; é o caso da hepatite infecciosa e do tifo, onde produtos de vírus e de bactérias exercem ação deletéria direta, mas reversível, na medula óssea.

Se tal fato ocorresse na doença de Chagas experimental, a destruição direta e reversível de células da medula óssea, levaria, pela gravidade do momento, à transformação da função linfóide do baço, em função mielóide, enquanto durasse a crise ou até que o organismo encontrasse meios de superar a fase de crise medular.

Tal hipótese, produto apenas de conjecturas, pode parecer fantasiosa; entretanto, não pode ser simplesmente descartada, em virtude dos resultados aqui apresentados e do pouco conhecimento que, infelizmente, ainda é comum à doença de Chagas.

A quarta hipótese por nós arvorada, implica na destruição das células da medula óssea, pela ação da multiplicação dos tripanosomas, dentro das células mielóides. A penetração de formas tripomastigotas e sua transformação em amastigotas, que se dividiriam dentro de células da medula óssea, poderia explicar, pelo menos em parte, a crise medular observada, que se traduz por uma homopose reacional, não funcional e pela metaplasia mielóide do baço.

Testamos a terceira hipótese em nosso laboratório e observamos, na medula óssea, a presença de estruturas semelhantes a amastigotas (Cf. Figuras 59 a 64).

Nas experiências com medula óssea de camundongos infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, observamos a presença de estruturas semelhantes a amastigotas extra e intracelulares no tecido mielóide destes animais. Estas formas extracelulares foram vistas, sempre, circundadas por uma estrutura hialina, de bordas bem delimitadas, semelhantes a um grande vacúolo.

Não sabemos se estas formas extracelulares estão realmente se multiplicando fora do seio celular ou se se trata de um artefato de técnica. Poderia ocorrer, durante o processo de feitura dos esfregaços, o rompimento de células contendo formas intracitoplasmáticas, que seriam liberadas, dentro de vacúolos, nos espaços extracelulares.

Estas formas semelhantes a amastigotas, foram vistas intracitoplasmaticamente, em células granulocíticas intermediárias e maduras e mesmo em precursores destas células e, em macrófagos medulares. Não sabemos, ainda, a real importância deste achado.

A presença de amastigotas no tecido mielóide foi observada há muito tempo. TALIAFERRO & PIZZI em 1955, já descreveram este fato e mais recentemente, MELO & BRENER (1978), também o mostraram. Neste último trabalho, o número de amastigotas/100 campos microscópicos (x 1000 de magnificação) foi, para a cepa Y, 962, 1.942 e 420, respectivamente para sétimo, oitavo e nono dias.

Numa experiência feita por nós, camundongos CBA, infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, foram sacrificados, a medula óssea retirada e inoculada em camundongos CBA, sadios. Os animais assim inoculados, desenvolveram a infecção chagásica, com parasitemias clássicas da cepa e da linhagem de camundongos.

Embora fossem observadas estruturas semelhantes a amastigotas, no tecido mielóide de animais chagásicos, não podemos afirmar que tal fato leve à deleção temporária da medula óssea. Entretanto, é lícito conjecturar que, uma situação de anormalidade ocorre no tecido mielóide destes animais infectados e, conseqüentemente, é lícito supor, que um preço qualquer é cobrado à saúde dos animais, nestas circunstâncias.

A presença de amastigotas nas células mielóides dos animais chagásicos, poderia representar um motivo (mas não obrigatoriamente o único ou o principal) de destruição destas células, o que poderia provocar a eritropoese reacional, que levaria, como já visto, à metaplasia mielóide do baço.

Os nossos resultados não descartam nenhuma das hipóteses aqui levantadas. Até a obtenção de resultados definitivamente comprobatórios, todas são passíveis de jogarem um papel importante (talvez, quem sabe, conjuntamente), nos fenômenos observados nas células vermelhas e nos tecidos esplênico e mielóide.

Portanto, será prematura qualquer conclusão que leve a

importante (indutor ou conseqüente), na patologia da doença de Chagas experimental.

O desenvolvimento de um quadro anêmico profundo, não é apanágio da doença de Chagas. Outros processos mórbidos podem provocá-lo, tais como a anemia megaloblástica, hemoglobinopatias, doenças hemolíticas hereditárias, certas parasitoses (malária, ancilostomose), anemias imunológicas, neoplasias hematológicas, etc.

Embora não tenhamos condições de propor com segurança e tão somente sugerir com parcimônia, mecanismos para explicar o surgimento do quadro anêmico, verificado na doença de Chagas experimental, nas condições por nós estudada, nossos resultados indicam que este processo tem grande importância na definição da patogenicidade desta doença, na fase aguda (quiçá, na fase crônica), merecendo maiores e melhores estudos que este por nós intentado.

Conclusões

1.-O período pré-patente na doença de Chagas experimental, é dose-dependente para a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, não dependendo da linhagem de camundongo usada nos ensaios.

2.-O índice parasitêmico em animais infectados com as cepas Y ou CL do *Trypanosoma cruzi*, depende do inóculo e da linhagem de camundongo utilizada. Camundongos Swiss, BALB/c e CBA, apresentam parasitemias elevadas, C57BL/10, parasitemias intermediárias e os híbridos (C57BL/10xCBA)F1 e (C57BL/10xBALB/c)F1, os menores índices parasitêmicos.

3.-A taxa de mortalidade de camundongos infectados com as cepas Y ou CL do *Trypanosoma cruzi*, é dependente do inóculo injetado e da linhagem de camundongo ensaiada. Os camundongos Swiss, CBA e BALB/c são muito suscetíveis, os C57BL/10 são moderadamente resistentes e os híbridos (C57BL/10xCBA)F1 e (C57BL/10xBALB/c)F1, os mais resistentes.

4.-Os camundongos híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1 e (C57BL/10xCBA)F1, são os animais de escolha para o estudo da doença de Chagas experimental crônica, obtida com inóculos elevados do *Trypanosoma cruzi*, cepas Y ou CL.

5.-O índice parasitêmico e a taxa de mortalidade é tanto maior quanto menor é a idade dos animais. O parâmetro idade é mais seguro que o parâmetro peso, na escolha dos animais experimentais.

6.-Não existem diferenças significativas entre o comportamento de machos e fêmeas das linhagens BALB/c, CBA, Swiss, C57BL/10 e híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1 e (C57BL/10xCBA)F1, infectadas com diferentes inóculos das cepas Y ou CL do *Trypanosoma cruzi*.

7.-Camundongos Swiss, BALB/c e C57BL/10, infectados com inóculos elevados (100.000 ou 10.000 tripomastigotas), das cepas Y ou CL do *Trypanosoma cruzi*, apresentam anemia profunda, caracterizada por baixos percentuais de hematócrito e presença de células vermelhas alteradas, na circulação.

8.-Durante o processo anêmico, podem ser observadas policromasia, hipocromia, anisopeilocitose, células com corpúsculos de Jolly, pontilhado basófilo e eritroblastos, no percurso laminar.

9.-Não existem diferenças significativas entre machos

e fêmeas, com relação ao processo anêmico apresentado durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

10.-Os híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1 e (C57BL/10xCBA)F1, apresentaram a menor queda no percentual do hematócrito e a melhor recuperação da anemia inicial.

11.-Durante a doença de Chagas experimental, obtidas por altos inóculos da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, ocorre uma acentuada metaplasia mielóide nos baços dos animais experimentais. Células das séries eritrocítica, granulocítica e megacariocítica, apresentando diversos graus de maturação, são encontradas nos baços dos animais infectados.

12.-Camundongos CBA, infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, mostraram estruturas semelhantes a formas amastigotas extra e intracelularmente na medula óssea.

13.-Granulócitos intermediários, maduros ou seus precursores e macrófagos medulares, foram encontrados albergando formas semelhantes a amastigotas, durante a fase aguda da doença de Chagas.

14.-Medula óssea retirada de camundongos CBA, infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, inoculadas intraperitonealmente, em camundongos CBA, sadios, produziu nestes últimos animais, infecção chagásica com parasitemia clássica da cepa e da linhagem testada.

Resumo

O período pré-patente, a parasitemia, a mortalidade e alterações hematológicas, esplênicas e medulares, foram estudados em camundongos Swiss, não isogênicos e em camundongos isogênicos BALB/c, CBA, C57BL/10 e em híbridos (C57BL/10xBALB/c)F1 e (C57BL/10xCBA)F1, infectados com inóculos variando de 100 a 100.000 tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi* das cepas Y ou CL.

As diferenças no período pré-patente, mostraram-se como decorrência direta do inóculo e das cepas de *Trypanosoma cruzi* empregadas, independente da linhagem de camundongo utilizada.

Com relação às curvas parasitêmicas, os animais puderam ser divididos em três grupos: Swiss, BALB/c e CBA, apresentando as maiores parasitemias, os híbridos, apresentando as menores e os C57Bl/10, mostrando parasitemias intermediárias entre os dois grupos acima.

O estudo comparativo das mortalidades, mostrou alta suscetibilidade dos camundongos BALB/c, Swiss e CBA, moderada resistência dos C57BL/10 e uma resistência relativamente alta dos híbridos (C57BL/10xCBA)F1 e

e (C57BL/10xBALB/c)F1, estes últimos, aparentemente mais resistentes, podendo servir como modelo para o estudo da fase crônica da doença de Chagas experimental, obtida com altos inóculos. A comparação entre a resistência de machos e fêmeas, não forneceu resultados conclusivos.

Graves alterações hematológicas foram observadas em camundongos BALB/c, C57BL/10 e Swiss, infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepas Y ou CL. Estas alterações consistiam em queda brusca e acentuada do hematócrito, aparecimento, no decorrer da infecção de policromasia, hipocromia, anisopecilocitose, corpúsculos de Jolly, pontilhado basófilo e eritroblastos no percurso laminar, caracterizando um quadro de anemia profunda.

Os exames histológicos dos baços de camundongos C57BL/10, infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, mostraram hipertrofia dos nódulos linfáticos a partir do terceiro dia de infecção e hipertrofia acentuada, no sétimo dia, contudo, com nítida delimitação entre as polpas branca e vermelha. A partir do nono dia de infecção, uma sensível mudança ocorre no órgão, que perde a sua organização característica, não havendo mais delimitação entre as polpas branca e vermelha.

Imprint dos baços de animais infectados, mostraram o surgimento de células mielóides a partir do terceiro dia de infecção. Foram observados megacariócitos, eritroblastos e granulócitos apresentando vários graus de maturação, passando os baços destes animais a apresentarem uma típica estrutura mielóide.

O exame da medula óssea de camundongos CBA, infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* cepa Y, revelou a presença de formas semelhantes a amastigotas, extra e intracelularmente em granulócitos maduros, intermediários e seus precursores e em macrófagos. O número destas formas, a princípio discreto, aumenta com o decorrer da infecção.

Medulas ósseas retiradas de camundongos CBA, infectados com 100.000 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, transferiram a infecção chagásica, quando inoculadas intraperitonealmente em camundongos saudáveis.

Bibliografia

- 1.-ALCANTARA, A. & BRENER, Z, - 1978 - The *in vitro* interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. **Acta trop.**, **35:209-219.**

- 2.-AMBRUS, J. L., AMBRUS, C. M., PICKREN, J. W., AMOS, D. B., NETER, E. & HELM, J. - 1964 - Regulation of regeneration and transplantation of hemic tissues. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** **113:898-914.**

- 3.-ANDRADE, S. G. & ANDRADE, Z. A. - 1968 - Patologia da Doença de Chagas experimental de longa duração. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, **10:180-187.**

- 4.-ANDRADE, Z. A. & ANDRADE, S. G. - 1979 - Patologia. In: **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas** (Z. Brener & Z. A. Andrade, Eds.), pp. 199-248. Guanabara, Rio de Janeiro.

- 5.-AYRES. M. & AYRES Jr., M. - 1987 - **Aplicações Estatísticas em Basic.** 1ª Ed., São Paulo, McGraw-Hill, Cap. III, pp. 27-74.
- 6.-BERTELLI, M. S. M. & BRENER, Z. - 1980 - Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.*, **66:992-997.**
- 7.-BRENER, Z. - 1962 - Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **4(6):389-396.**
- 8.-BRENER, Z. - 1962b - Observações sobre a imunidade a superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **4(2):119-123.**
- 9.-BRENER, Z. - 1965 - Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, **58:19-26.**
- 10.-BRENER, Z. - 1967 - Alguns aspectos da imunidade adquirida em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **9(4):233-238.**

- 11-BRENER, Z. - 1968 - Terapeutica experimental da Doença de Chagas. In: *Doença de Chagas*. Romeu Cançado (Ed.), pp. 501-516. Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 12-BRENER, Z. - 1969 - The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* on the bloodstream of normal and immune mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **63**:215-220.
- 13-BRENER, Z. - 1971 - Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **13**(3):171-178.
- 14-BRENER, Z. - 1977 - Intraespecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *PAHO Sci Public.*, **347**:11-22.
- 15-BRENER, Z. & CHIARI, E. - 1963 - Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **5**(5):220-224.
- 16-BRENER, Z. & CHIARI, E. - 1967 - Suscetibilidade de diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi* a vários agentes quimioterápicos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **9**(4):197-207.

- 17-BRENER, Z. & CHIARI, E. - 1971 - The effects of some immunosuppressive agents in experimental chronic Chagas's disease. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 65(5):629-636.
- 18-CANÇADO, R. (Ed.) - 1968 - *Doença de Chagas*. Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- 19-CHAGAS, C. - 1909 - Nova tripanozomíase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. ge., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1:159-218.
- 20-CHIARI, E., MANSUR NETO, E. & BRENER, Z. - 1968 - Some effects of gamma-radiation on *Trypanosoma cruzi*, culture and blood forms. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 10(3):131-137.
- 21-CHOI, S. I., SIMONE, J. V., JOURNEY, L. J. - 1972 - Neuraminidase-induced thrombocytopenia in rats. *Br. J. Haematol.*, 22:93.
- 22-CORSINI, A. C., COSTA, M. G., OLIVEIRA, O. L. P., CAMARGO, I. J. B. & STELINI, A. - 1980 - Suscetibility of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* strain Y. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 22(4):192-196.

- 23-CORSINI, A. C., OLIVEIRA, O. L. P. & COSTA, M. G.
- 1980b - Humoral suppression in *Trypanosoma cruzi*
infection in relation to the timing of antigen
presentation. *Parasitenkunde*, 64:85-95.
- 24-CORSINI, A. C., COSTA, M. G., OLIVEIRA, O. L. P.,
CAMARGO, I. J. B. & RANGEL, H. A. - 1980c - A fraction
(FAd) from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes depress the
immune response in mice. *Immunology*, 40:505-511.
- 25-CORSINI, A. C. & COSTA, M. G. - 1981 - Immunosuppression
in mice infected with *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS,
1909). I. Evidences of polyclonal B cell activation in
experimental infections mimicked by an extract
prepared from circulating trypomastigotes. *Rev. Inst.
Med. trop. São Paulo*, 23(3):114-121.
- 26-CORSINI, A. C. & COSTA, M. G. -1981b- Immunosuppression
in mice infected with *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS,
1909). II.-Trypomastigote Crude Extract (TCE) suppress
the humoral immune response in mice. *Rev. Inst. Med.
trop. São Paulo*, 23(3):122-126.
- 27-CSETE, M., LEV, B. I. & PEREIRA, M. E. A. - 1985 - An
influenza virus model for *Trypanosoma cruzi* infection:
interactive roles for neuraminidase and lectin.
Current Topics in Microbiology and Immunology,
117:153-165.

- 28-DACIE, J. V. & LEWIS, S. M. - 1975 - **Practical Hematology**. Churchill and Livingstone. London. 5th edition.
- 29-DEANE, M. P., BRITO, T. & DEANE, L. M. - 1963 - Pathogenicity to mice of some strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from wild animals of Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, 5(5):225-235.
- 30-DEMEY, F., MAKUMYAVITY, A. M., VLIETINCK, D. LE RAY & VERHULST, A. - 1985 - Survival time of various strains of mice infected with metacyclic forms of *Trypanosoma brucei*. **Ann. Soc. Belge med. Trop.**, 65(4):323-328.
- 31-De TITTO, E. H. & ARAUJO, F. G. - 1987 - Serum neuraminidase activity and hematological alterations in acute human Chagas' disease. **Clinical Immunology and Immunopathology**, 45:000-000 (Brief Communications)
- 32-DVORAK, J. A. & SHMUNIS, G. A. - 1972 - *Trypanosoma cruzi*: interaction with mouse peritoneal macrophages. **Exper. Parasit.**, 32:289-300.
- 33-DUNN, T. B. - 1954 - Normal and pathologic anatomy of reticular tissue in laboratory mice with a classification and discussion of neoplasms. **JNCI, J. Natl. Cancer Inst.** 14:1281-1434.

- 34-FEARON, D. T. - 1978 - Regulation by membrane sialic acid of beta 1H-dependent decay dissociation of amplification C₃ convertase of the alternative complement pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 75:1971.
- 35-FILARDI, L. S. & BRENER, Z. - 1984 - A rapid method for testing *in vivo* the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79(2):221-225.
- 36-FOWLER, J. H. & NASH, D. J. - 1968 - Erythropoiesis in the spleen and bone marrow of pregnant mouse. *Dev. Biol.* 18:331.
- 37-FRUHMAN, G. J. - 1970 - Splenic erythropoiesis. In: *Regulation of Hematopoiesis.* (A. S. Gordon, ed.), Vol. 1, pp. 339-368. Appleton, New York.
- 38-GOTTSCHALK, A. (Ed.) - 1972 - *Glycoproteins: their composition, structure and function.* Elsevier, New York.
- 39-HATCHER, F. M., KUHN, R. E., CERRONE, M. C. & BURTON, R. C. - 1981 - Increased natural killer cell activity in experimental american trypanosomiasis. *J. Immunology*, 127(3):1126-1130.
- 40-HAUSCHKA, T. S. - 1947 - Sex of host as factor in Chagas' disease. *J. Parasitol.*, 33:309.

- 41-HOFF, R. - 1975 - Killing in vitro of *Trypanosoma cruzi* by macrophages from mice immunized with *T. cruzi* or BCG, and absence of cross-immunity on challenge in vivo. *J. exper. Med.*, 142:299-311.
- 42-HOWELLS, R. E. & CHIARI, C. A. - 1975 - Observations on two strains of *Trypanosoma cruzi* in laboratory mice. *Ann. Trop. Med. and Parasitol.*, 69(4):435-448.
- 43-JANCIK, J. M., SCHAUER, R., ANDRES, K.H. & DURING, M. von - 1978 - Sequestration of neuraminidase-treated erythrocytes: studies on its topographic, morphologic and immunologic aspects. *Cell Tissue Res.*, 189:209.
- 44-JAYAWARDENA, A. N. & WAKSMAN, B. H. - 1977 - Suppressor cells in experimental trypanosomiasis. *Nature*, 265:539-541.
- 45-KIERSZENBAUM, F., KNECHT, R., BUDZKO, D. B. & PIZZIMENTTI, M. C. - 1974 - Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, 112:1839-1844.
- 46.-KRETTLI, A. U. & BRENER, Z. - 1976 - Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.*, 116(3):755-760.

- 47-KRETTLI, A. U. & NUSSENZWEIG, R. S. - 1977 - Presence of immuno-globulins on the surface of circulating trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* resulting in activation of the alternative pathway of complement and lysis. *PAHO Sci Publi.*, 347:71-73.
- 48-LALONDE, R. G., ALI-KHAN, Z. & TANOWITZ, H. B. - 1985 - *Trypanosoma cruzi*: regulation of mitogenic response during infection in genetically resistant and susceptible inbred mouse strains. *Experimental Parasitology*, 59:33-43.
- 49-MELLO, R. C. & BRENER, Z. - 1978 - Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasit.*, 64:475-482.
- 50-NOGUEIRA, N. & COHN, L. - 1976 - *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. exper. Med.*, 143:1402-1420.
- 51-NUSSENZWEIG, V., DEANE, L. M. & KLOETZEL, J. - 1962 - Diversidade na constituição antigênica de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas do homem e de gambás. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 4(6):409-410.
- 52.-PERALTA, J. M., FILARDI, L., LOURES, M. A. & TORRES, S. T. - 1980 - *Trypanosoma cruzi* antibodies in mice infected with different strains of *T. cruzi*. *J. Parasitol.*, 66(2):342-344.

- 53-PEREIRA, M. E. A. - 1983 - A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Science*, **219**:1444.
- 54-PEREIRA, M. E. A. - 1983a - A rapid and sensitive assay for neuraminidase using peanut lectin hemagglutinin. Applications to *Vibrio cholerae* and *Trypanosoma cruzi* *J. Immunol. Methods* **63**(1):25-34.
- 55-PEREIRA DA SILVA, L. H. & NUSSENZWEIG, V. - 1953 - Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol. São Paulo*, **20**:191-201.
- 56-PINTO, F. H., RIBEIRO, R. D., BELDA NETO, F. M. & PRADO Jr., J. C. - 1986 - Estudo comparativo do comportamento da infecção de camundongos através da inoculação subcutânea e intraperitoneal, utilizando-se duas cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Saúde públ. S. Paulo*, **20**(2):133-140.
- 57-PIZZI, T. - 1963 - Sobre el problema de las formas delgadas de *Trypanosoma cruzi*. *Boletín de Informaciones Parasitarias Chilenas*, **8**:26-28.

- 58-PIZZI, T., AGOSIN, M., CHRISTEN, R., HOECKER, G. & NEGhme, A. - 1949 - Estudios sobre inmunologia de las enfermedades parasitarias: I. Influencia de la constitucion genetica en la resistencia de las lauchas a la infeccion experimental por *Trypanosoma cruzi*. Boletin de Informaciones Parasitarias Chilenas, 4:48-49.
- 59-POILEY, S. - 1972 - Growth tables for 66 strains and stocks of laboratory animals. Lab. Anim. Sci., 22:759-779.
- 60-RAMOS, C., SHADTLER-SIWON, I. & ORTIZ-ORTIZ, L. - 1979 - Suppressor cells present in the spleens of *Trypanosoma cruzi*-infected mice. J. Immunol., 122(4):1243-1247.
- 61-REPKA, D., RANGEL, H. A., ATTA, A. M., GAVINDO, V. A. & PIEDRABUENA, A. E. - 1985 - Experimental Chagas' diseases in mice infected with one LD₅₀ of parasite. Rev. bras. Biol., 45(3):309-316.
- 62.-RIBEIRO, R. D., FERRIOLLI FILHO, F. & BELDA NETO, F. M. - 1982 - Comportamento de subamostras de *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros vertebrados e invertebrados. Rev. bras. Biol., 42:51-54.

- 63-RIBEIRO, R. D., BELDA NETO, F. M., PRADO Jr., J. C. & ALBUQUERQUE, S. - 1986 - Comportamento de formas sanguícolas do *Trypanosoma cruzi* obtidas de camundongos utilizados como filtros biológicos, em cultura e em triatomíneo. *Rev. Saúde públ. S. Paulo*, 20(2):129-132.
- 64-RUSSEL, E. S. & FONDAL, E. L. - 1951 - Quantitative analysis of the normal and four alternative degrees of an inherited macrocytic anemia in the house mouse. I. Number and size of erythrocytes. *Blood*, 6:892-905.
- 65-SAVINO, W., LEITE-DE-MORAIS, M. C., HONTEBEYRIE-JOSKOWICK, M. & DARDENE, M. - 1989 - Studies on the thymus in Chagas' disease. I.- Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Immunol.*, 19(9):1727-1733.
- 66-SCHLEMPER, Jr., B. R., ISHIDA, M. M. I., STEINDEL, M. & GARGIONE, R. - 1986 - Tripomastigota muito largo como padrão morfológico de cepas do *Trypanosoma cruzi* do extremo sul do Brasil? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81(2):191-198.
- 67-SOUZA, M. A. - 1983 - Surface electrical charge of bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 78(4):497-500.

- 68-TALIAFERRO, W. H. & PIZZI, T. - 1955 - Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J. infect Dis.*, 96(3):199-226.
- 69-TRISCHMANN, T. M. - 1983 - Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' disease. *J. Immunol.*, 130(4):1953-1957.
- 70-TRISCHMANN, T. M. - 1986 - *Trypanosoma cruzi*: early parasite proliferation and host resistance in inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.*, 62:194-201.
- 71-TRISCHMANN, T. M., TANOWITZ, H., WITTNER, M. & BLOOM, B. - 1978 - *Trypanosoma cruzi*: role of immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.*, 45:160-168.
- 72-VELGE, P., OUAISSI, A., KUSNIERZ, J. P. & CAPRON, A. - 1989 - Infection of T lymphocytes by *Trypanosoma cruzi*. Possible role of CD3 and HLA-DR. *C. R. Acad. Sci [III]* 309(4):93-99.
- 73-WITHEY, K. S. M., CLAYTON, C. E., ROELANTS, G. E. & ASKONAS, B. A. - 1978 - Trypanosomiasis leads to extensive proliferation of B, T and null cells in spleen and bone marrow. *Clin. exp. Immunol.* 34:359-363.

74-WOODRUFF, J. J., KATZ, M., LUCAS, L. E. & STAMPER, Jr.,
H. B. - 1977 - An *in vitro* model of lymphocyte homing.
II.- Membrane and cytoplasmic event involved in
lymphocyte adherence to specialized high-endothelial
venules of lymph nodes. *J. Immunol.*, **119:1603**.

75-WORLD HEALTH ORGANIZATION - 1960 - Chagas' disease.
Report of a study group. **Technical Report Series No.
202**.

76-WORLD HEALTH ORGANIZATION - 1974 - Immunology of Chagas'
disease. *Bull. WHO* **50:459**.

77-WORLD HEALTH ORGANIZATION - 1977 - Report of the First
Meeting of the Scientific Group on Chagas' disease.
TRD/CHA - SWG (1) 77,3.