

CELSE PAULINO DA COSTA

Parasitemia e Mortalidade de Camundongos Isogênicos
Infectados por *Trypanosoma Cruzi* (Chagas 1909).

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

Campinas, São Paulo

1979

C823n

A G R A D E C I M E N T O S

Agradeço ã aqueles que cooperaram na execução - deste trabalho. Em especial ao meu orientador Prof. L.S. Prigenzi, ao Chefe do Departamento de Imunologia e Microbiologia do Instituto de Biologia, Prof. Humberto A. Rangel aos seus assistentes e funcionários; ao Prof. Silvio dos Santos Carvalhal, - Prof. José Lopes de Faria, Prof. Humberto de Campos, aos colegas do Curso de Pós Graduação em Imunologia a Maria José Ottoni Bueno da Silva pelo serviço de datilografia.

Dedico este trabalho à minha
esposa Toninha e aos nossos -
filhos, Alexandre, Érica e Vi
nícios.

Í N D I C E

	Pg
INTRODUÇÃO	01
MATERIAL E MÉTODOS	06
RESULTADOS	11
DISCUSSÃO	25
RESUMO E CONCLUSÕES	29
BIBLIOGRAFIAS	31

I N T R O D U Ç Ã O

Ao contrário do que ocorre na infecção por bactérias, onde a interação hospedeiro-parasita se decide de forma rápida, na infecção por protozoários é possível a persistência do parasita, em contato com o sistema de defesa do hospedeiro por longo período de tempo (SALGADO, 1962; COHEN, 1974).

O comportamento do protozoário, para explicar possíveis mecanismos envolvidos na adaptação hospedeiro-parasita, tem sido estudado em alguns sistemas.

Assim, na Tripanosomiase Africana, o protozoário apresenta variações antigênicas na sua superfície, no decorrer da infecção, podendo desta forma escapar da ação lítica dos anticorpos (VICKERMAN, 1969).

A liberação de antígenos solúveis pelo protozoário, também verificado na Tripanosomiase Africana (WEITZ, 1960; ALSSOP, 1971), constitui outra possível forma de inibir a ação protetora da imunidade do hospedeiro.

Fenômeno semelhante ao que ocorre na infestação por *Schistosoma* tem sido descrito para a infecção por *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma lewisi*, onde o parasita adsorve substância de hospedeiro na sua superfície, impedindo a fixação de anticorpos (KETTERIDGE, 1972).

Outra forma sugerida de atuação do protozoário é a depressão da resposta de imunidade, como tem sido descrito em infecções por *Trypanosoma brucei* (ALLT et al., 1971; GOODWIN et al., 1972; CORSINI et al., 1977).

Na doença de Chagas, o mecanismo de ação do parasita não está elucidado. Até o momento, não foram descritas variações antigênicas de *T. cruzi* nem confirmada a ocorrência de adsorção de substâncias do hospedeiro na superfície do parasita. A presença de antígenos solúveis (ARAUJO, 1976), assim como depressão da resposta da imunidade (RIOWLAND et al., 1977), têm sido verificadas durante a infecção de *T. cruzi* em camundongos, po

rêm, a participação destes fenômenos no equilíbrio hospedeiro-parasita não foi ainda esclarecida.

Por outro lado, a condição clínica do hospedeiro na infecção por T. cruzi varia desde uma forma inaparente até uma forma letal a curto ao longo prazo. Possivelmente tais variações dos efeitos patológicos são determinadas não somente - por diferenças individuais do hospedeiro ou do parasita, mas resultantes da interação de diferentes cepas de parasitas com diferentes populações de hospedeiros.

O parasita é um fator que pode ser o responsável pelas variações do aspecto clínico da Doença de Chagas em diferentes regiões geográficas (HANSON, 1976). Diferentes cepas de T. cruzi têm sido estudadas em animais de laboratório, quanto a características de curso de infecção, grau de parasitemia, tropismo tissular, aspectos histopatológicos e mortalidades. Cepas isoladas de pacientes infectados de uma mesma região apresentam um mesmo comportamento em animais de laboratório (MEMORANDA-IMMUNOLOGY OF CHAGAS DISEASE, 1974).

Em regiões onde a infecção humana pelo T. cruzi tem caráter endêmico, dados epidemiológicos revelam na população com reação sorológica positiva para T. cruzi, indivíduos com e sem parasitemia detectável por xenodiagnóstico e variação no aspecto clínico da Doença de Chagas (LARANJA, et al, 1956).

Tal fato sugere uma variação na interação hospedeiro-parasita que poderia estar relacionada a diferentes virulências de parasitas numa mesma cepa de T. cruzi, número de parasitas inoculados e infecções; ou a características do hospedeiro quanto a capacidade de uma reação no sentido de eliminar o parasita e desenvolver a enfermidade.

Assim sendo, para o entendimento da Doença de Chagas é importante o conhecimento da biologia do T. cruzi, e das reações do hospedeiro ao parasita.

A resistência natural pelo T. cruzi, tem sido estudada em aves. KIERSZEMBAUM et al (1976) verificaram que soro de aves lisam "in vitro" formas sanguíneas de T. cruzi. Este fenômeno relacionado a ação do complemento, ativado por via alterna, independe da presença de anticorpos específicos. "In vi-

vo" os mesmos autores verificaram que nas aves que tiveram seu soro de complementado, após a infecção foi possível detectar parasitas vivos após 24 horas, ao passo que em aves não tratadas ocorre destruição imediata dos parasitas. GOBLE (1970), assinala numerosos fatores que estão envolvidos nesta resistência natural em mamíferos, incluindo raça do hospedeiro, sexo, estado endócrino e nutricional, temperatura corporal, presença de infecções intercorrentes, assim como, a cepa de parasita. Porém, os mecanismos não são bem conhecidos.

A resistência adquirida à infecção pelo T. cruzi tem sido observada em várias circunstâncias, como por exemplo, em animais que se tornam resistentes após a infecção com cepas de menor virulência ou após a recuperação da fase aguda da doença (HOFF, 1973).

A importância da resposta imune tem sido mostrada na infecção por T. cruzi. Imunossupressão com irradiação (ROBERSON et al., 1973), cortisona (NERY GUIMARÃES, 1970), resultam numa maior susceptibilidade à infecção aguda pelo T. cruzi, e aumento da parasitemia em ratos e camundongos infectados.

Os mecanismos imunológicos envolvidos na reação de resistência adquirida não estão completamente elucidados.

O papel da imunidade humoral é controvertido. A produção de anticorpos específicos em hospedeiros infectados é conhecida de longa data, sendo usada nas reações sorológicas - com finalidade de diagnóstico da Doença de Chagas. Através de experimentos de transferência passiva de soro imune, alguns autores obtiveram proteção de animais infectados. Assim, HANSON, (1976) sugere que anticorpos séricos estão envolvidos na resistência adquirida em animais de experimentação e provavelmente no homem. Nas linhagens de camundongos mãs formadoras de anticorpos, a fase aguda da infecção é significativamente mais severa do que em animais com maior capacidade de produção de anticorpos (KIERSZEMBAUN, et al., 1976). Os mesmos autores verificaram que a transferência de plasma imune foi capaz de proteger os camundongos suscetíveis. A atividade protetora de soro de camundongos com infecção crônica pelo T. cruzi foi demonstrada estar localizada principalmente na fração IgG, nas sub-

classes IgG_{2a} e IgG_{2b}, por TAKEHARA et al., (1978).

Manifestações de imunidade celular adquirida tem sido detectadas no homem e em animais infectados por T. cruzi. A timectomia neo-natal em camundongos (BEHBEHANI, 1971; SCHUMUNIS, et al., 1971), assim como em ratos (ROBERSON, et al., 1973), provoca em maior parasitemia e mortalidade após infecção pelo T. cruzi. Resultado semelhante se observa quando camundongos são tratados com soro anti-timócitos (ROBERSON, 1973).

Testes "in vitro" sugerem que antígenos de T. cruzi suscitam uma resposta celular. TSCHUDI et al. (1972) verificaram "in vivo" transformação blastica antígeno - específica de linfócitos de pacientes com Doença de Chagas. YANOUSKI et al., (1972), observaram que leucócitos do sangue periférico de pacientes chagásicos apresentaram uma sensibilização a antígenos de T. cruzi, quando analisados pelo teste de inibição da migração de leucócitos. TEIXEIRA, et al., (1975) demonstraram que células mononucleares, colhidas do sangue periférico de coelhos chagásicos produzem inibição da migração de macrófagos na presença de vários antígenos sub-celulares de T. cruzi. REIS et al., (1976) estudaram "in vitro" a resposta de células do baço de camundongos infectados com diferentes cepas de T. cruzi, frente a antígenos específicos usando técnica de inibição de migração de leucócitos, tendo verificado a presença de uma sensibilização celular.

Estudos experimentais em camundongos, com estímulo e bloqueio do sistema retículo histiocitário, sugerem que a fagocitose é um possível meio de destruição do parasita - (KIERSEZEMBAUM et al., 1974). Existe controvérsia quanto a capacidade de destruição de T. cruzi quando no interior de macrófagos. Enquanto que alguns estudos referem a reprodução do parasita (BEHBEHANI, 1973), outros autores revelam que "in vitro" os tripanosomas são destruídos após fagocitose (DVORAK et al., 1972). Vários autores tem demonstrado que a ativação específica ou não de macrófagos aumenta sua resistência à infecção por T. cruzi. (HOFF, 1975; WILLIAMS, 1976).

Os resultados discordantes obtidos ao se estudar as reações de imunidade ao T. cruzi, podem estar relaciona-

dos às condições de trabalho, cepas de parasitas, ou às raças de animais usados como hospedeiro. Como a capacidade de resposta a infecção tem variações até mesmo individual, o estudo das reações imunes pode ser facilitado ao utilizar a mesma cepa de T. cruzi em camundongos isogênicos, resistentes e suscetíveis à infecção, tais como C57/BL6 e C3H (MEMORANDA OF CHAGAS DISEASE, 1974).

NOGUEIRA et al., (1976), ao estudarem a interação de T. cruzi com macrófagos peritoneais de camundongos C57/BL6 e C3H "in vitro", observaram que formas tripomastigota do parasita foram capazes de se reproduzir em igualmente no interior dos macrófagos das duas raças de camundongos. Por outro lado, tem sido demonstrado que a opsonização desempenha papel importante na fagocitose. JONES et al., (1975) verificaram que ao incubar macrófagos com toxoplasma previamente opsonizados com soro imune, havia destruição do parasita, enquanto que ocorre reprodução no interior do macrófago quando incubado com soro normal.

Baseados nestes achados, poderíamos supor que a produção de anticorpos estaria envolvida nos denominados de resistência e susceptibilidade destes animais. Assim, neste trabalho procuramos caracterizar a resistência e susceptibilidade de camundongos C3H e C57/BL6 à cepa Y de T. cruzi, estudar parasitemia e produção de anticorpos anti T. cruzi na fase inicial da infecção.

M A T E R I A L E M É T O D O S

1 - Camundongos.

Foram utilizados animais procedentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP. Amostras das raças foram cedidas pelo Prof. Sylvio Thales Torres do Instituto Biomédico U.F.F. Niterói - Brasil.

Os camundongos isogênicos C3H e C57/BL6 usados nos experimentos, eram de ambos os sexos com peso entre 20 e 25g.

2 - Amostras de T. cruzi.

A amostra Y de T. cruzi foi cedida pelo Prof. Z. Brener da U.F.M.G., Belo Horizonte, Brasil.

As formas epimastigota foram mantidas em meio de cultura Yeger - Lit preparado conforme indicações de FERNANDES E CASTELLANI (1966). Os parasitas foram obtidos de culturas de 7 dias, sendo lavados por centrifugação a 1.000 g. por 15 minutos a 4°C com solução PBS*. Em seguida a suspensão foi filtrada em papel, para torna-la mais homogênea.

As formas tripomastigota de mesma procedência, eram mantidas em camundongos Swiss, através de repiques semanais, conforme protocolo existente no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

As formas tripomastigota sanguínea foram obtidas de camundongos no 7º dia de infecção, colhendo-se sangue, - por secção do plexo braquial, utilizando-se solução de citrato do sódio, 3,8%, como anticoagulante.

Para as reações sorológicas os parasitas foram isolados centrifugando-se 3 ml de sangue, sobre igual volume de solução de Hypaque a 8%, por 10 minutos a 100 g., à temperatura ambiente. Após este período as hemácias decantavam-se através da solução de Hypaque. O plasma era aspirado, e os parasitas con-

*PBS - Solução salina tamponada com fosfatos 0,15M pH 7,2.

centrados e lavados três vêzes em solução de PBS, através de centrifugação por 15 minutos a temperatura ambiente a 1000 g.

3 - Inoculação e determinação de parasitemia.

Para a inoculação de camundongos C3H e C57/BL6, os parasitas foram obtidos de camundongos Swiss. A concentração de parasitas foi determinada pelo método de Hoff (1974). O sangue foi diluído com solução de PBS, para conter o número de parasitas adequado num volume de 0,2 ml.

A inoculação foi feita por via intraperitoneal, a partir da mesma amostra de T. cruzi.

A parasitemia foi determinada conforme o método de Hoff (1974). Amostra de sangue, obtida por secção da extremidade de cauda, foi diluída a 1:20 com solução de Cloreto de Amônio a 0,87%. A seguir os parasitas foram contados em câmara de Neubauer, determinando-se o número de parasitas existentes em 4 retículos de 1 mm².

A menor quantidade de parasitas que pode ser detectada por este método é de 50 parasitas por mm³ de sangue.

4 - Obtenção e conservação dos soros.

Amostras de soros de lotes de 6 camundongos foram misturadas considerando-se animais de mesma raça, inóculo e tempo de infecção. Em seguida as amostras de soros foram inativadas a 56°C por 30 minutos, distribuídas em alíquotas e congeladas a 20°C até o momento do uso.

5 - Reação de aglutinação.

Em lâmina escavada, alíquotas de 20 microlitros de suspensão de parasitas, contendo 3×10^6 T. cruzi/ml, foram misturadas com igual volume das diluições seriadas dos soros, e com 20 microlitros de PBS. A mistura foi agitada suavemente e deixada em câmara úmida por 1 hora a temperatura ambiente. A leitura da reação foi realizada em microscópio óptico com objetiva

40 e ocular 8 x. Como contrôlê foram incubados nas mesmas condições, suspensões de T. cruzi com soro de camundongos normais, e solução de PBS. O título aglutinante foi expresso por um título anterior à maior diluição que apresentava aglutinação positiva.

As reações de aglutinação foram realizadas com formas epi e tripomastigota de T. cruzi.

6 - Reação de imunofluorescência.

Foi empregada a técnica de imunofluorescência indireta segundo Camargo (1966). O antisoro conjugado com fluorescência, anti imunoglobulina de camundongos, produzido em cabra, foi obtido da HYLAND LABORATORIES (USA), tendo sido titulado previamente, e foi utilizado na diluição de 1:80.

7 - Reação de aglutinação com hemácias de carneiro.

Em placa de aglutinação Microtiter, foram realizadas diluições seriadas dos soros imunes com solução de PBS, - contendo 1% de soro de camundongos normais absorvido previamente com hemácias de carneiro. A adição do soro de camundongos à solução de PBS tem a finalidade de manter um meio proteico mais homogêneo nas diluições mais altas.

Ao volume de 100 microlitros da diluição foram acrescentados 10 microlitros de suspensão de hemácias de carneiro a 2,5%; após ter sido agitado suavemente, a mistura foi incubada em câmara úmida, à temperatura ambiente por 12 horas. A leitura foi feita após o período de incubação, considerando-se o título como a recíproca da maior diluição que apresentava reação de aglutinação positiva.

8 - Reações de absorção dos imune soros.

Alíquotas de 100 microlitros de soro de camundongos C57/BL6 com 21 dias de infecção, foram absorvidos com 50 microlitros de suspensão de hemácias de carneiro, ou com 50 mi-

crolitros de suspensão de T. cruzi forma epimastigota, ou com tripomtigota, por 12 horas a 4°C. A seguir a mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi testado revelando uma reação negativa para os antígenos com os quais foi absorvido.

Para a pesquisa de anticorpos heterófilos, 50 microlitros do soro foram absorvidos nas mesmas condições com suspensão de antígenos de rim de cobaio e de hemácias de boi, ambos de procedência de HYLAND LABORATORIES (USA), na proporção de 1:8.

9 - Relação do peso do animal e peso do baço.

Seis camundongos de cada raça foram sacrificados em diferentes períodos de infecção por T. cruzi sendo estabelecida uma relação entre peso do baço e peso corporal.

Os mesmos índices foram estabelecidos em animais não infectados.

10 - Técnicas histológicas.

Fragments de baço, fígado, rim, intestino e coração foram fixados em solução de formol a 10% e processados segundo as técnicas histológicas habituais. As colorações foram feitas pela hematoxilina e eosina. Foram estudados órgãos de dois camundongos de cada raça em cada período de infecção.

11 - Análise estatística.

O estudo estatístico da parasitemia, em ambas as raças de camundongos infectados por T. cruzi, foi realizado determinando-se a partir dos camundongos sobreviventes os seguintes dados.

a. Número médio de parasitas/mm³ de sangue. $\hat{m}$

$$\hat{m} = \frac{\sum x}{n}$$

onde x = número de parasitas por mm³ de san-

gue, em cada um dos camundongos examinados.

n = número de camundongos sobreviventes.

b. Desvio padrão.

$$s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}}$$

c. Erro padrão da média.

$$s(\hat{m}) = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

d. Intervalo de confiança, ao nível de aproximadamente 95% de probabilidade e cujos extremos foram calculados conforme se segue:

$$I.C. = \hat{m} \pm 2s(\hat{m})$$

e. Considerando-se os números médios de parasitas/mm³ de sangue das duas raças de camundongos, pareado segundo os dias de infecção, foi feito, de acordo com CAMPOS (1976) o conforto entre elas, através do Testes das Ordens Assinadas ("Signed Rank Test"). Este procedimento se justifica por ser o referido teste mais apropriado a pequenas amostras dos que usualmente empregados, tais como o teste t e similares.

R E S U L T A D O S

1 - Níveis de parasitemia e mortalidade.

Com o objetivo de avaliarmos a resistência e suscetibilidade de camundongos C3H e C57/BL6, quando infectados pela cepa y de T. cruzi, lotes de 5 animais de cada raça foram inoculados respectivamente com 50.000, 5.000 e 500 parasitas e analisados os níveis de parasitemia e mortalidade no curso da infecção.

Os resultados de mortalidade e parasitemia foram expressos em tabelas que contêm cálculos do número médio de parasitas por mm^3 de sangue, o desvio padrão, o erro padrão da média, e os limites do intervalo de confiança. A partir destes dados foram construídos os gráficos que representam os níveis de parasitemia, onde para cada ponto estudando se considerou a média e os extremos do seu intervalo de confiança.

Devemos ressaltar que as linhas ligando os pontos estudados, embora o processo seja contínuo, tem mais um efeito de melhor visualização do comportamento da parasitemia em função do tempo de infecção não constituindo propriamente uma faixa de confiança ao nível de 95% de probabilidade.

Assim na Tabela I e figura 1 estão representados os resultados obtidos com o inóculo de 50.000 T. cruzi, em camundongos C3H e C57/BL6 que apresentaram parasitemia detectável a partir do 5º e 7º dias de infecção respectivamente, com o pico de parasitemia ao 9º dia, porém a mortalidade foi total no 10º dia após inoculação.

Tabela I - Parasitemia e mortalidade em camundongos inoculados com 50.000 T.Cruzi.

Raça de camundongos	Dias de infecção	Nº de sobre-viventes	Nº média de parasitos/mm ³	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de Confiança	
						L.Inferior	L.Superior
C57/BL6	1º	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3º	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5º	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	7º	5	130,0	44,7	20,0	90,0	170,0
	9º	5	360,0	151,6	67,8	224,4	495,6
	10º	0	-	-	-	-	-
C3H	1º	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3º	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5º	5	10,0	22,4	10,0	0,0	30,0
	7º	5	340,0	89,4	40,0	260,0	420,0
	9º	5	900,0	255,0	114,0	672,0	1128,0
	10º	0	-	-	-	-	-

A Tabela II e figura 2 mostram a mortalidade e parasitemia em camundongos que receberam um inóculo de 5.000 T. cruzi.

A parasitemia foi detectada a partir do 5º dia de infecção na raça C57/BL6 e no 7º dia na raça C3H.

Um pico de parasitemia foi observado em ambas as raças no 9º dia após a inoculação. A raça C3H apresentou tendência a novo pico no 19º dia, quando iniciou a mortalidade destes animais, sendo total até o 21º dia de infecção. Na raça C57/BL6 foi observado comportamento diferente; no 21º dia apresentou um pico de parasitemia bem menor que o primeiro, não sendo detectado mais parasitas no sangue após o 25º dia de infecção, permanecendo vivos até o 60º dia, quando foram sacrificados.

Após o 25º dia a parasitemia foi determinada a cada 5 dias.

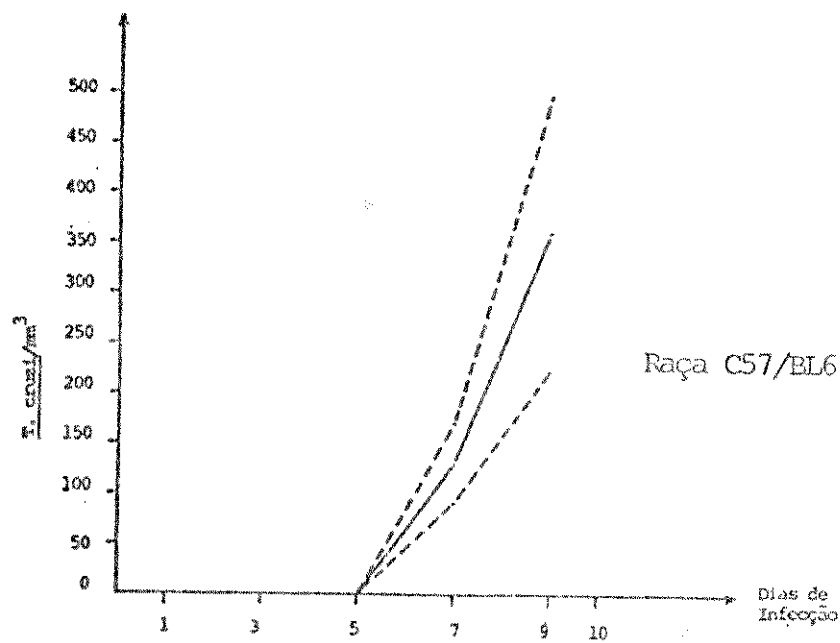
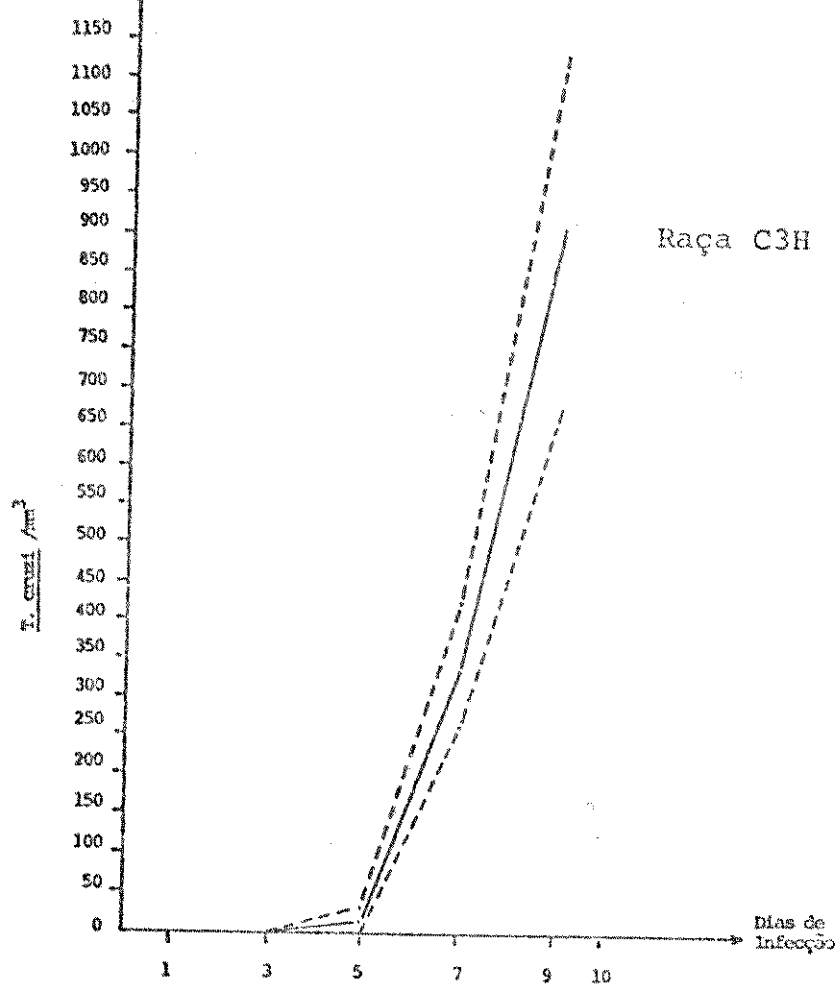


Fig. 1

Número Médio de parasitos/ mm^3 de sangue, em função do número de dias de infecção, nas raças C3H e C57/BL6 de camundongos, inoculados com 50.000 *T. cruzi*

— Média

- - - - Extremos do intervalo de confiança (95%)

Tabela II - Parasitemia e mortalidade em camundongos inoculados com 5.000 *T. cruzi*.

Raça de camundongos	Dias de infecção	Nº de sobre-viventes	Nº médio de parasitos/mm ³	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de Confiança	
						L. Inferior	L. Superior
C57/BL6	5º	5	10,0	22,4	10,0	0,0	30,0
	7º	5	30,0	67,1	30,0	0,0	90,0
	9º	5	600,0	237,2	106,1	387,8	812,2
	13º	5	70,0	44,7	20,0	30,0	110,0
	15º	5	60,0	41,8	18,7	22,6	97,4
	17º	5	10,0	22,4	10,0	0,0	30,0
	19º	5	10,0	22,4	10,0	0,0	30,0
	21º	5	120,0	125,5	56,1	7,8	232,2
	23º	5	10,0	22,4	10,0	0,0	30,0
	25º	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	...	.					
	60º	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C3H	5º	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	7º	5	30,0	44,7	20,0	0,0	70,0
	9º	5	970,0	580,5	259,6	450,8	1489,2
	13º	5	380,0	135,1	60,4	259,2	500,8
	15º	5	400,0	127,5	57,0	286,0	514,0
	17º	4	662,5	103,1	51,6	559,3	765,7
	19º	3	1166,7	305,5	176,4	813,9	1519,5
	21º	0	-	-	-	-	-

Com o inóculo de 500 *T. cruzi*, os camundongos - C3H e C57/BL6 apresentaram um comportamento de parasitemia e mortalidade semelhante aqueles inoculados com 5.000 *T. cruzi*, porém os níveis de parasitemia foram mais baixos e o pico de parasitemia ocorreu no 11º dia de infecção como mostra a Tabela III e figura 3. A mortalidade dos camundongos da raça C3H ocorreu - entre o 21º e 27º dia de infecção.

A parasitemia de camundongos C57/BL6 não foi detectada a partir do 23º até o 60º dia de infecção, quando foram sacrificados, sendo pesquisados cada 5 dias neste período.

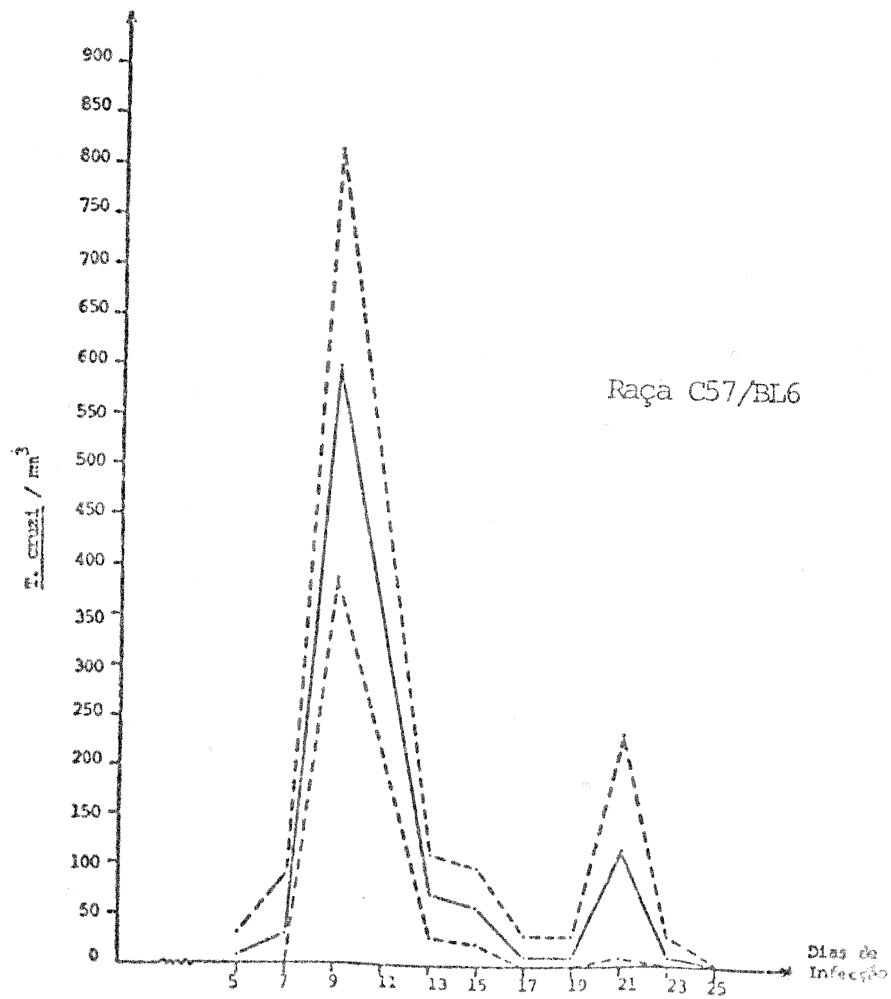
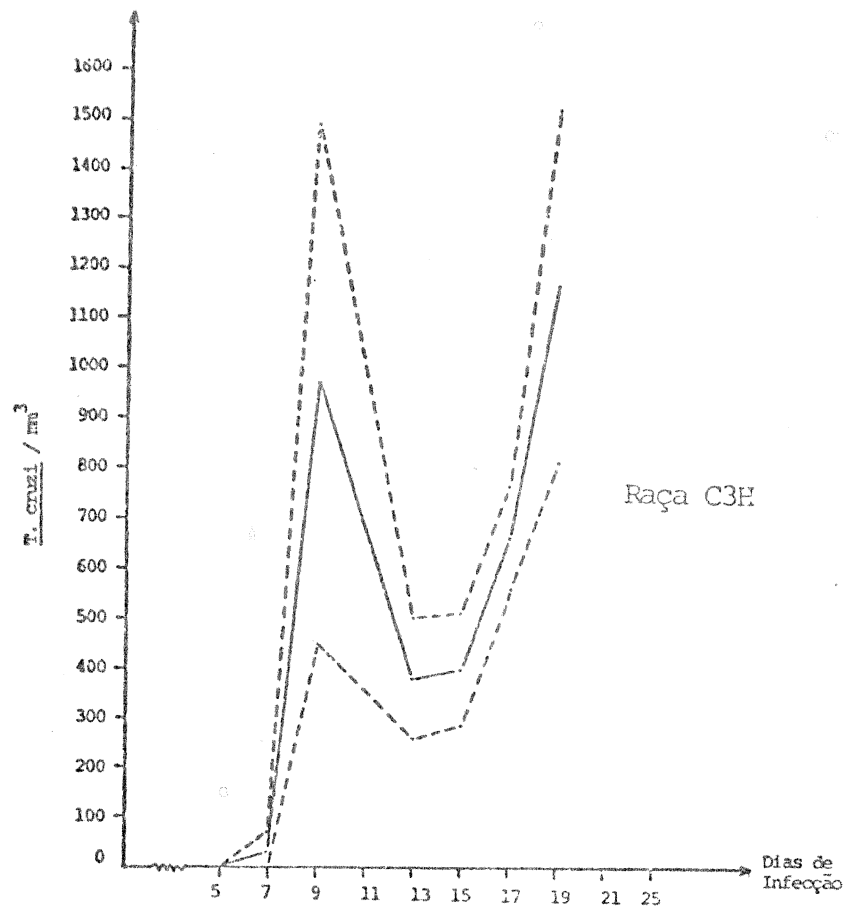


Fig. 2
Número Médio de parasitos/mm³ de sangue, em função do número de dias de infecção, nas raças C3H e C57/BL6 de camundongos, inoculados com 5.000 T.cruzi.

_____ Média

- - - - Extremos do intervalo de confiança (95%)

Tabela III - Parasitemia e mortalidade em camundongos inoculados com 500 *T. cruzi*.

Raça de camundongos	Dias de infecção	Nº de sobre-viventes	Nº médio de parasitos/mm ³	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de Confiança	
						L. Inferior	L. Superior
C57/BL6	99	5	60,0	22,4	10,0	40,0	80,0
	119	5	190,0	235,6	105,4	0,0	400,8
	139	5	70,0	57,0	25,5	19,0	121,0
	159	5	30,0	27,4	12,2	5,6	54,4
	179	5	20,0	27,4	12,2	0,0	44,4
	199	5	20,0	27,4	12,2	0,0	44,4
	219	5	10,0	22,4	10,0	0,0	34,4
	239	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	...	.					
	609	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C3H	99	5	50,0	35,4	15,8	18,4	81,6
	119	5	380,0	292,8	130,9	118,2	641,8
	139	5	100,0	86,6	38,7	22,6	177,4
	159	5	150,0	35,4	15,8	118,4	181,6
	179	5	100,0	35,4	15,8	68,4	131,6
	199	5	140,0	134,2	60,0	20,0	260,0
	219	3	183,3	104,1	60,1	63,1	303,5
	239	2	150,0	70,7	50,0	50,0	250,0
	259	2	200,0	141,4	100,0	0,0	400,0
	279	0	-	-	-	-	-

A análise estatística dos dados de parasitemia, pelo teste das ordens assinaladas, nas duas raças de camundongos infectados com *T. cruzi*, revela uma diferença significativa entre elas; a raça C3H apresentou níveis de parasitemia mais elevados que a raça C57/BL6 com todos os inóculos estudados conforme os resultados que se seguem na tabela IV.

Tabela IV - Níveis de significância obtidos no Teste das Ordens Assinaladas para o confronto das raças de camundongos C3H e C57/BL6 inoculados com diferentes quantidades de *T. cruzi*.

Nº de parasitas inoculados	Nível de significância
500	$d = 0,004$
5.000	$d = 0,031$
50.000	$d = 0,062$

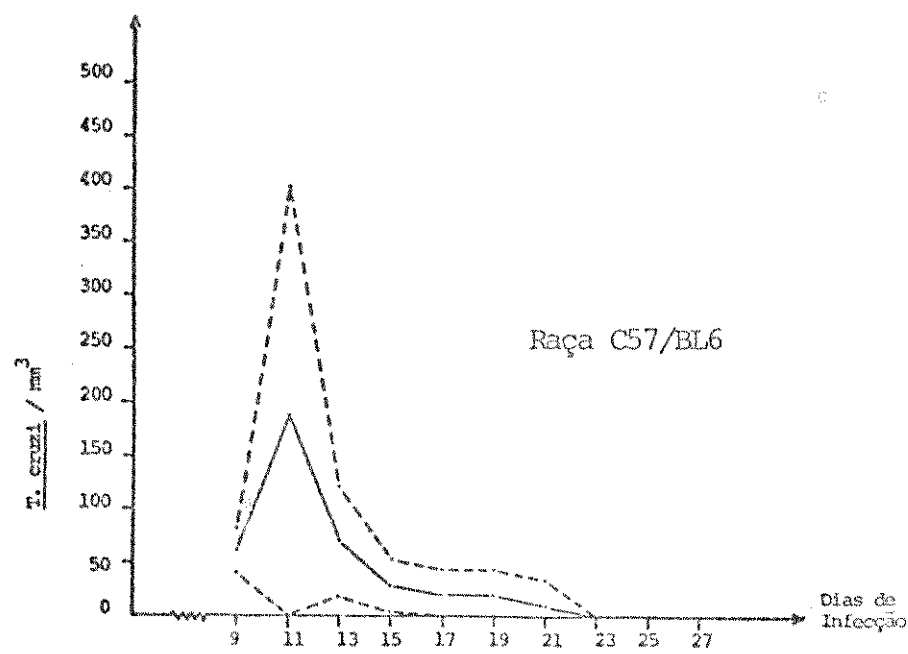
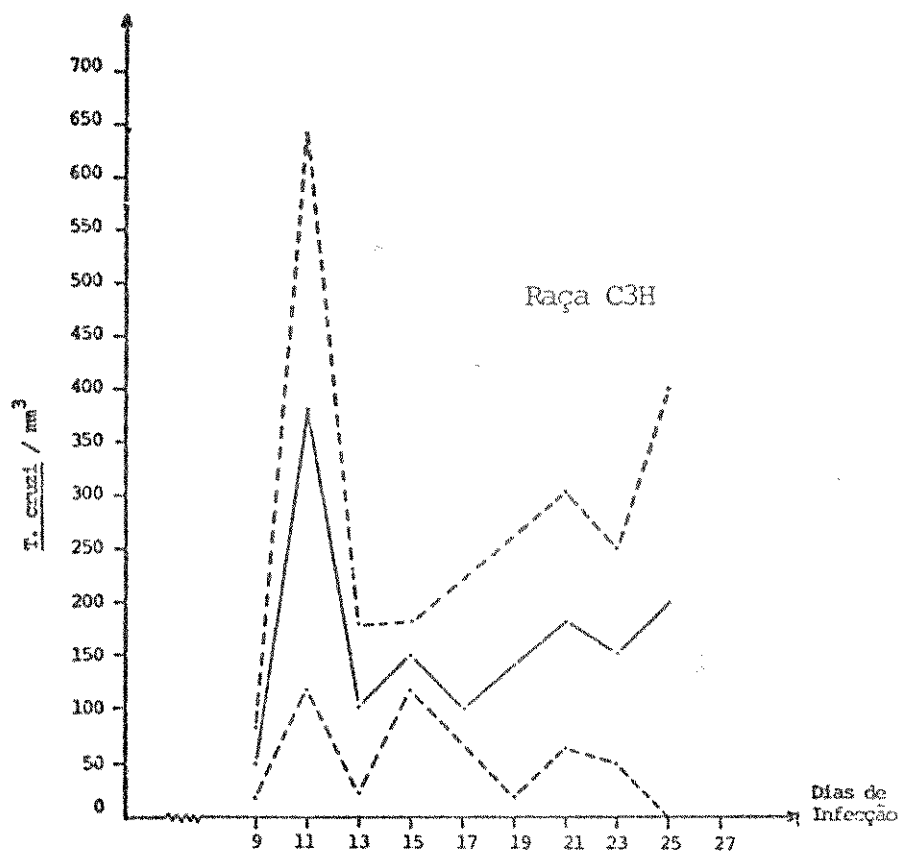


Fig. 3
 Número médio de parasitos/mm³ de sangue, em função do número de dias de infecção, nas raças C3H e C57/BL6 de camundongos, inoculados com 500 T.cruzi.

_____ Média
 - - - - - Extremos do intervalo de confiança (95%)

Conforme se observa na Tabela IV, o nível de significância variou de 0,4% para a inoculação de 500 parasitas, a 6,2% na inoculação de 50.000, ficando a inoculação de 5.000 numa faixa intermediária, com um nível de significância de 3,8%. Entretanto, nos três casos, sob o ponto de vista estatístico, considera-se a comprovação estatística da diferença de comportamento entre as duas raças de camundongos infectados por T. cruzi.

2 - Produção de anticorpos específicos e heterófilos em camundongos infectados com T. cruzi.

2.1 - Anticorpos anti T. cruzi.

Após o estudo de parasitemia e mortalidade, os demais experimentos foram realizados com inóculos de 500 T. cruzi, pois desta forma poderíamos obter camundongos C3H com maior tempo de infecção. Contudo nesta raça, só analisamos lotes de 6 animais com 11 e com 14 dias de infecção, devido ao fato de não termos na época camundongos em condições de serem infectados.

Na raça C57/BL6, foram sacrificados lotes de 6 animais com 11, 14, 17, 21, 28 e 60 dias de infecção.

Na tentativa de explicarmos possíveis mecanismos envolvidos nas reações de resistência e suscetibilidade, procuramos verificar se ocorria retardo ou deficit de produção de anticorpos específicos na raça C3H em relação a C57/BL6, na fase inicial da infecção por T. cruzi.

Porém, através de reações de aglutinação com formas epi e tripomastigotas, e reação de imunofluorescência, com formas epimastigota, não foram detectadas diferenças significativas de títulos de anticorpos anti T. cruzi nestas duas raças de camundongos, no período estudado.

A reação de aglutinação foi positiva no 14º dia de infecção enquanto que a reação de imunofluorescência foi positiva no 11º dia, conforme mostra resultados expressos na tabela V. Na raça C57/BL6 os títulos de anticorpos foram crescentes

até o 60º dia de infecção.

Tabela V - Título de anticorpos anti T.Cruzi, detectados por técnica de aglutinação e imunofluorescência em diferentes períodos de infecção em camundongos

Nº de dias de infecção	Título de Anticorpos			
	Aglutinação		Imunofluorescência	
	Raça C3H	Raça C57/BL6	Raça C3H	Raça C57/BL6
0	neg.	neg.	neg.	neg.
11	neg.	neg.	1:4	1:4
14	1:2	1:4	1:4	1:4
17	-	1:4	-	1:32
21	-	1:8	-	1:32
28	-	1:16	-	1:64
60	-	1:32	-	1:64

2.2 - Aglutininas anti-hemácias de carneiro.

Como tem sido demonstrado a presença de anticorpos heterófilos na fase aguda da Doença de Chagas humana, procuramos verificar a presença destes anticorpos no soro de camundongos infectados com T. cruzi. Observamos que camundongos da raça C57/BL6 apresentam anticorpos naturais anti-hemácias de carneiro, com um título de 1:4, ligeiramente superior aos da raça C3H que aglutinam somente com soro não diluído.

No decorrer da infecção, não houve diferença significativa de variação de títulos de aglutininas anti hemácias de carneiro entre as duas raças de camundongos até o 14º dia de infecção.

O soro de camundongos C3H apresentou aglutinação negativa no 11º dia de infecção, retornando a valores equivalentes

tes dos normais no 14º dia.

Os camundongos C57/BL6 apresentaram também uma redução do título de aglutinação no 14º dia, porém, a seguir apresentaram elevação do título no 17º dia atingindo o maior valor no 21º dia de infecção, como mostra os resultados da tabela VI.

Tabela VI - Título de anticorpos anti-hemácias de carneiro detectado por hemaglutinação direta, em camundongos infectados por T.cruzi em diferentes períodos de infecção.

Nº de dias de infecção	Título de Anticorpos	
	Raça C3H	Raça C57/BL6
0	não diluido	1:4
11	negativo	1:4
14	não diluido	1:2
17	-	1:16
21	-	1:128
28	-	1:16
60	-	1:16

O estudo dos anticorpos heterófilos que surgem durante a infecção humana pelo T. cruzi, revela que são aglutininas tipo Forsmann; portanto procuramos caracterizar a natureza destas aglutininas nos camundongos infectados. Através de reações de absorção, usando soros de camundongos com 21 dias de infecção, foram realizados testes com antígenos de rim de cobaio e de hemácias de boi, porém não houve absorção de tais aglutininas por estes antígenos.

Os parasitas inoculados em camundongos C3H e C57/BL6 estavam sempre contaminados com hemácias de camundongos -

Swiss, portanto, os anticorpos heterófilos poderiam estar relacionados a antígenos existentes nas hemácias destes camundongos porém o teste de absorção foi negativo conforme mostram os resultados da tabela VII.

Tabela VII - Produção de anticorpos heterófilos em camundongos infectados por T. cruzi.

Soros de camundongos C57/BL6 com 21 dias de infecção (6 animais)	Aglutinação com hemácias de carneiro. Título corrigido.
Controle soro não absorvido	1:128
Soro absorvido com suspensão de rim de cobaia proporção 1:8	1:128
Soro absorvido com antígeno de hemácia de boi, proporção 1:8	1:64
Soro absorvido com hemácias de camundongos Swiss	1:64

2.3 - Reação cruzada entre T. cruzi e hemácias de carneiro.

A possibilidade da existência de antígenos comuns ao T. cruzi e hemácias de carneiro, foi verificado, através de reações de absorção dos soros de camundongos C57/BL6 com 21 dias de infecção.

A absorção com hemácias de carneiro não alterou o título de anticorpos anti T. cruzi, detectado por reação de imunofluorescência com formas epimastigota.

As absorções dos soros com formas epimastigota e tripomastigota de T. cruzi, não alteraram significativamente o título aglutinante de anticorpos anti hemácias de carneiro, como mostram os resultados da tabela VIII.

Entretanto, após a absorção do imune soro com formas tripomastigota, o teste de imunofluorescência usando formas epimastigota, revelou ainda uma positividade com título de 1:4.

Tabela VIII - Reação cruzada entre T. cruzi e hemácias de carneiro.

Soro de camundongos C57/BL6 com 21 dias de infecção	Aglutinação com hemácias de carneiro	Imunofluorescência para <u>T. cruzi</u> epimastigota
Soro não absorvido	1:128	1:32
Soro absorvido com hemácias de carneiro	negativo	1:32
Soro absorvido com <u>T. cruzi</u> epimastigota	1:64	negativo
Soro absorvido com <u>T. cruzi</u> forma tripomastigota.	1:128	1:4

3 - Evolução do peso do baço de camundongos infectados com T. cruzi.

Estabelecendo uma relação entre peso do baço e peso corporal, podemos observar na tabela IX, que ambas as raças apresentaram uma esplenomegalia, porém não houve diferença significativa entre elas nos dias comparados isto é no 11º e 14º dia de infecção.

Tabela IX - Relação entre peso de baço e peso corporal, em camundongos C3H e C57/BL6 com diferentes períodos de infecção por T.Cruzi.

Raça de camundongos	Dias de infecção	Média da relação peso de baço/peso corporal	Desvio padrão	Erro padrão da média	Intervalo de Confiança	
					L. Inferior	L. Superior
C57/BL6	0	0,0058	0,0006	0,0002	0,005	0,006
	11	0,0233	0,055	0,002	0,019	0,027
	14	0,0245	0,004	0,002	0,021	0,028
	17	0,0224	0,005	0,003	0,016	0,028
	21	0,0184	0,004	0,002	0,014	0,022
	28	0,0110	0,001	0,0004	0,010	0,012
	60	0,0084	0,001	0,0004	0,007	0,009
C3H	0	0,0056	0,0004	0,0002	0,005	0,006
	11	0,0255	0,004	0,002	0,021	0,029
	14	0,0249	0,004	0,002	0,020	0,028

Nos camundongos C57/BL6, a esplenomegalia foi mais intensa no 14º dia, decrescendo a seguir, atingindo valores próximos do normal em torno do 60º dia de infecção como mostra a figura 4.

4 - Observações histológicas.

Através da análise histológica, procuramos verificar o tropismo tissular da cepa y de T.cruzi em camundongos das raças C3H e C57/BL6.

O exame das preparações histológicas revelou - que a cepa y de T.cruzi apresenta nestes camundongos um tropismo tissular predominantemente do tipo reticulotrópico.

Entretanto entre as duas raças, não existem aparentemente diferenças significativas de intensidade de parasitismo e reação inflamatória, dos órgãos examinados, isto é, baço, fígado e coração nos dias de infecção em que foram comparados.

Na raça de camundongos C57/BL6, maior parasitismo tissular foi observado no 14º dia de infecção no baço, fi

gado e coração, porém com 21 dias já não se observam parasitas nos referidos órgãos. Aos 60 dias de infecção o aspecto histológico dos órgãos examinados foi semelhante àqueles de animais não infectados.

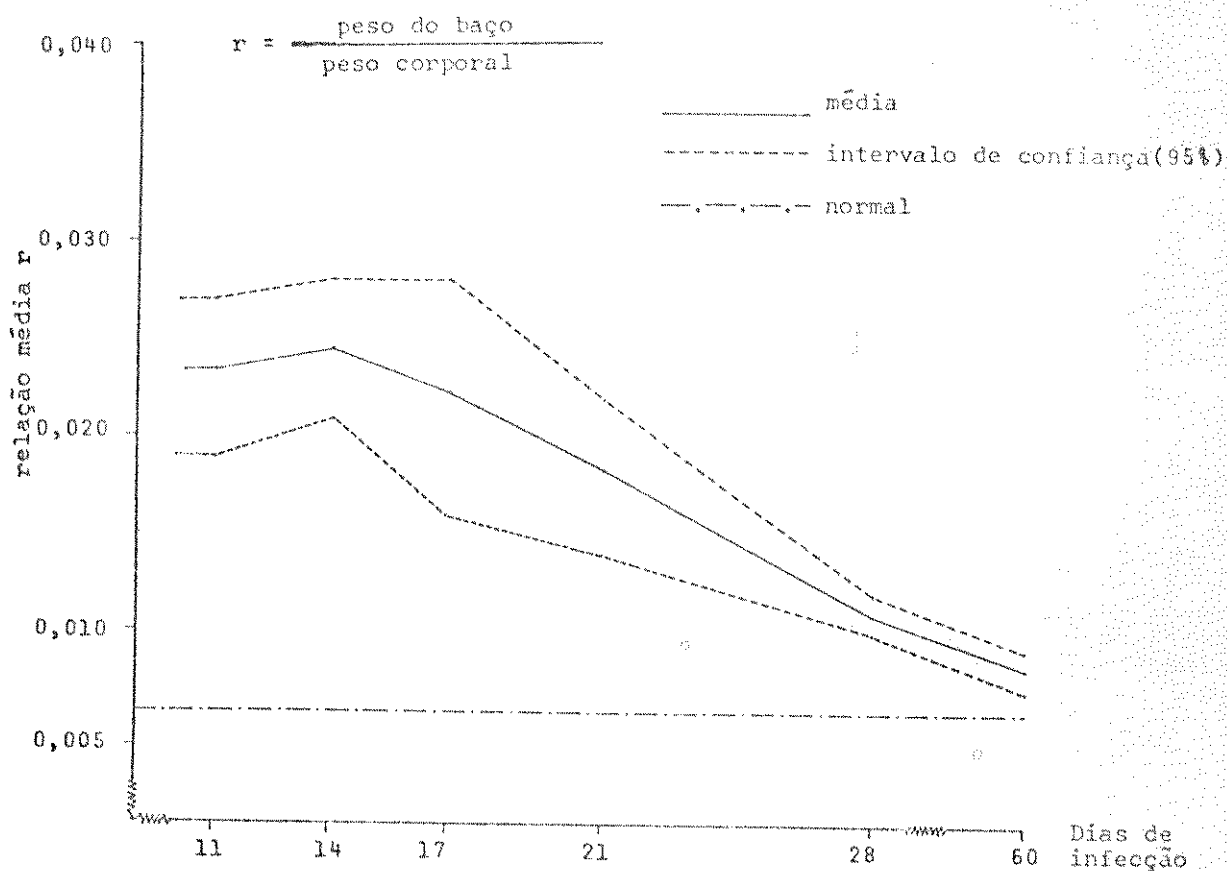


Fig. 4

Evolução do peso do baço de camundongos C57/BL6 infectados com T.cruzi.

D I S C U S S Ã O

O comportamento das raças de camundongos, C57/BL6 e C3H como resistente e suscetível respectivamente, quando infectados por T. cruzi (Memoranda of Chagas Disease 1974), foi confirmado em relação à cepa Y de T. cruzi.

Os resultados do presente trabalho mostram que a resistência à infecção é dependente do número de T. cruzi inoculado.

Assim, camundongos de ambas as raças que foram inoculados com 50.000 parasitas, apresentaram uma mortalidade total em torno do 10º dia de infecção. Provavelmente tal fato se relacione a intenso parasitismo, antes que surja uma reação de proteção efetiva nos camundongos.

Entretanto quando foram usados inóculos menores de 5.000 e 500 T. cruzi, respectivamente, camundongos de raça C57/BL6, sobreviveram a infecção até 60 dias, quando foram sacrificados. Porém camundongos da raça C3H apresentaram uma mortalidade total, até o 25º dia de infecção.

Os níveis de parasitemia foram menores na raça C57/BL6 com todos os inóculos estudados. O intervalo de tempo entre a infecção e o aparecimento do primeiro pico de parasitemia foi de 9 e 11 dias para inóculos de 5.000 e 500 T. cruzi respectivamente.

Resultados semelhantes foram obtidos por TRISCHMANN et al (1978) ao estudarem o papel da resposta imune na resistência natural de raças isogênicas de camundongos quando infectados por T. cruzi, utilizando inóculos de 10^4 ou 10^5 tripomastigotas de uma cepa do Brasil de T. cruzi. Os camundongos da raça C3H morreram dentro de 3 a 4 semanas e os da raça C57/BL6 sobreviveram e desenvolveram baixa parasitemia. Os mesmos autores demonstraram que a resposta imune parece ser necessária à sobrevivência de camundongos C57/BL6, pois estes animais quando submetidos a irradiação, esplenectomia, ou tratamento com sílica, apresentam elevação da parasitemia e mortalidade. Em infec

ção por outras espécies de *Tripanosoma*, como *T. brucei* CLAITON (1978) observou um comportamento semelhante destas raças de camundongos.

O fato de camundongos C3H desenvolverem mostalidade e níveis de parasitemia mais elevadas que a da raça C57/BL6, poderia estar relacionado a fatores que propiciam o desenvolvimento do parasita ou a uma resposta imune deficiente.

Assim tem sido mostrado por SHOEMAKER et al(1974), um parasitismo acentuado em cortex adrenal e tecido gorduroso de camundongos C3H e Swiss albino, quando comparados com os mesmos tecidos de outros roedores. Estes mesmos autores, sugerem que nestes tecidos a quantidade de substâncias esteróides poderia atuar como fator estimulante do crescimento do parasita.

Porém, outros autores, referem que substâncias esteróides, atuam inibindo a reação imune do hospedeiro, propiciando a elevação da parasitemia e mortalidade de animais infectados por *T. cruzi*. (OKUMURA et al; NERY - GUIMARÃES 1970; ANDRADE et al, 1972).

A participação da resposta de imunidade humoral como fator de resistência a infecção por *T. cruzi* foi estudada neste trabalho. Entretanto, não foi demonstrado deficit ou retardo na produção de anticorpos anti *T. cruzi* nos camundongos C3H, em relação aos C57/BL6, no 11º e 14º dia de infecção, quando analisados por técnica de imunofluorescência e aglutinação. Porém a possibilidade de que os anticorpos atuem na reação de resistência a infecção por *T. cruzi* em camundongos C57/BL6, não está afastada.

Outras propriedades dos anticorpos tais como interação com sistema de complemento e opsonização, poderiam estar relacionados a destruição do parasita e não foram verificados neste trabalho.

Estudos de produção de anticorpos pela imunização com polipeptídeos sintéticos em camundongos C3H e C57/BL10, realizados por MITCHELL et al (1972) revelam que ambas as raças são capazes de produzir anticorpos da classe IgM durante a primeira semana após a inoculação do antígeno porém, nas imunizações subsequentes somente animais da raça C57/BL10 foram capazes de produzir anticorpos da classe IgG, revelando desta forma

uma deficiência seletiva de classe de anticorpo presente na raça C3H. Porém produção de anticorpos IgG nos camundongos C3H, foi obtido, quando o antígeno foi complexado com soro albumina bovina metilada, e infectado com adjuvante de Freund.

Por outro lado TAKEHARA et al (1978) demonstraram que a atividade protetora do soro de camundongos infectados por T. cruzi se localiza na fração IgG.

Ao analisar as curvas de parasitemia, podemos observar que ambas as raças são capazes de controlar o primeiro pico, porém os camundongos da raça C3H, falham no controle dos próximos picos, quando se inicia a mortalidade.

Talvez uma falha na produção de anticorpos IgG anti T. cruzi, pudesse ser um fator de suscetibilidade de camundongos C3H infectados com T. cruzi. Portanto, alguma informação sobre os mecanismos envolvidos no comportamento destes camundongos C3H e C57/BL6 pudesse ser obtido através do estudo das classes de anticorpos anti T. cruzi, assim como transferência passiva de soro imune, durante a infecção por T. cruzi nestes animais.

Vários estudos tem sido feitos no sentido de caracterizar diferenças que poderiam explicar o comportamento destas raças de camundongos quando infectados por T. cruzi.

Assim Nogueira et al (1976) ao estudarem "in vitro" a interação de macrófagos peritoneais de camundongos C3H e C57/BL6 com T. cruzi, não encontraram diferenças entre elas. Outras observações feitas por ROWLAND et al (1978), também "in vitro" revelam que durante a infecção por T. cruzi, camundongos C57/BL6 apresentaram uma depressão da resposta blastogênica, mais precoce e mais intensa que camundongos C3H, tornando enigmático o entendimento do mecanismo de resistência e suscetibilidade presente nestas raças de camundongos.

A reação de imunofluorescência indireta mostrou ser mais sensível que a reação de aglutinação. Esta sensibilidade, possivelmente poderia estar relacionada com a localização do antígeno. Enquanto que a reação de aglutinação só revela antígenos de superfície, a reação de imunofluorescência pode revelar antígenos mais internos do parasita.

A presença de anticorpos heterófilos na fase aguda da infecção por T. cruzi humana já é conhecida e estudada por vários autores como MUNIZ et al (1950); CABRAL (1967); CAMARGO (1976). Nos camundongos, o título destes anticorpos apresentou um comportamento semelhante àquele observado na infecção humana; os títulos decresceram após a fase inicial da infecção. Entretanto a natureza de tais aglutininas que na infecção humana pelo T. cruzi, são do tipo Forsman, não foi confirmada nestes camundongos, o que seria esperado, sendo estes animais Forsman positivos (HUMPHREY et al 1972).

O aparecimento destes anticorpos poderia ser relacionado a um estímulo inespecífico ou a presença de antígenos comuns entre o parasita e hemácias de carneiro, o que não foi confirmado através de reações de absorção.

O fato do imune soro, após ter sido absorvido com formas tripomastigota, apresentar uma reação positiva por imunofluorescência com formas epimastigota, sugere a presença de anticorpos contra antígenos talvez relacionados a diferentes formas de T. cruzi, no decorrer da infecção, o que tem sido demonstrado por KLOETZER et al (1975).

A esplenomegalia que foi observada nos camundongos, também presente nos casos de infecção humana, (ANDRADE, 1968), é característica da fase aguda da infecção por T. cruzi.

A observação histológica dos órgãos estudados - neste trabalho, não contribuiu para esclarecer possíveis mecanismos envolvidos na resistência e suscetibilidade de camundongos C57/BL6 e C3H infectados por T. cruzi. Talvez, a observação histológica de outros órgãos, analisando densidade de parasitas, em períodos mais precoces e mais tardios, do que aqueles que foram estudados, possa fornecer alguma contribuição para o entendimento do comportamento destas raças de camundongos quando infectados por T. cruzi.

R E S U M O E C O N C L U S Õ E S

Considerando níveis de parasitemia e mortalidade, a resistência e suscetibilidade de camundongos das raças C3H e C57/BL6 infectados por T. cruzi foram estudados em relação a cepa y deste parasita.

Lotes de camundongos de ambas as raças, foram inoculados respectivamente com 50.000, 5.000 e 500 T. cruzi, forma tripomastigota, por via intra peritoneal. A parasitemia foi determinada em diferentes dias de infecção através de amostras de sangue colhidos na extremidade da cauda dos camundongos.

A produção de anticorpos específicos anti T. cruzi, na fase inicial da infecção, que poderia estar relacionada a resistência e suscetibilidade destes animais foi estudada através de reação de aglutinação e imunofluorescência.

No soro destes camundongos foram também estudados o título e natureza de anticorpos heterófilos.

O comportamento do peso do baço, assim como observações histológicas de baço, fígado e coração foram realizadas nestes camundongos.

Os resultados obtidos sugerem que:

1 - A resistência de camundongos da raça C57/BL6 é dependente do número de parasitas inoculados. Assim para inóculos de 50.000 T. cruzi estes camundongos são suscetíveis.

2 - Quando foram utilizados inóculos de 5.000 e 500 T. cruzi respectivamente, os camundongos da raça C57/BL6 se comportaram como resistentes e os C3H como suscetíveis.

3 - Com todos os inóculos estudados, camundongos da raça C57/BL6 apresentaram níveis de parasitemia mais elevadas que os da raça C3H.

4 - Através de reação de imunofluorescência e aglutinação não foi detectada diferença de título de anticorpos anti T. cruzi nas duas raças de camundongos nos 11º e 14º dia de infecção.

5 - A fase aguda da infecção por T. cruzi, cepa y, em camundongos C57/BL6 ocorre nas 3 ou 4 primeiras semanas - após a infecção, baseado nos achados de parasitemia, anticorpos heterófilos, esplenomegalia e observações histológicas.

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

1. ALLSOP, B.A.; NJOGU, A.R. & HUMPHRYES, K.C.. Nature and Location of Trypanosoma brucei Subgroup Exoantigen and its Relationship to 4s Antigen. Exp. Parasitol., 29: 271, 1971.
2. ALLT, G.; EVANS, E.M.E.; EVANS, D.H.L. & TARGETT, G.A.T. Effect of Infection with Trypanosomas on the Development of Allergic Neuritis in Rabbits. Nature, 233: 197, 1971.
3. ANDRADE, S.G.; SILVA, A.A.; CARVALHO, M.L. & FIGUEIRA, R.M. Comportamento de uma Cepa de Trypanosoma cruzi em Hospedeiros com Baixa Resistência. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 14: 154, 1972.
4. ANDRADE, Z.A.. Anatomia Patológica. In: Cançado, J.R. Doença de Chagas. Univ.Fed.de Minas Gerais, cap.15: 315, 1968.
5. ARAUJO, F.G. Immunology of Chagas' Disease I - Circulation Antigens in Mice Experimentally Infected with T.cruzi. Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo, 18: 433, 1976.
6. BEHBEHANI, M.K. T. cruzi Infections in X-Irradiated and in Thymectomized Mice. Trans.R. Soc.Trop.Med.Hyg., 65: 265, 1971.
7. BEHBEHANI, M.K. Development Cycles of T. cruzi in Mouse Peritoneal Macrophages in Vitro. Parasitology, 66: 343, 1973.
8. CABRAL, H.R.A.; INIQUEZ MONTENEGRO, C.; DE PAOLASSO, R.W. & SANTOLO, V. Acerca del Poder Aglutinante del Suero de Pacientes Chagásicos Agudos sobre Eritrocitos de Carneiro Sensibilizados y no Sensibilizados. Rev.Fac.Cienc. Med.Cardoba, 24: 1-8, 1967.

9. CAMARGO, M.E. Fluorescent Antibody Test for the Diagnosis of American Trypanosomiasis. Technical Modification Employing Preserved Culture forms of T.cruzi in a Slide Test. Rev. Inst. Med.Trop. São Paulo, 8: 227, 1966.
10. CAMARGO, M.E. Identificação no Laboratório Clínico de Doença de Chagas Pós-Transfusional não Suspeitada. Rev.Bras. Patologia Clínica, 12: 201, 1976.
11. CAMPOS, H. Estatística Experimental Não-Paramétrica - E.S. A. "Luiz de Queiroz" Piracicaba, 1976.
12. COHEN, S. The Imune Response to Parasites. In: Parasites in the Immunized Host: Mechanisms of Survival. Ciba Found. Symp. 25 (New Series). Associated Scientific Publishers, 1974.
13. CORSINI, A.C.; CLAYTON, C.; ASKONAS, B.A. & OGILVIE, B. M. Supressor Cells and Loss of B-Cell Potential in Mice Infected with Trypanosoma brucei. Clin. Exp. Immunol., 29: 122, 1977.
14. CLAYTON, C.E. Trypanosoma brucei: Influence of Hosts Strain and Parasite Antigenic Type on Infections in Mice. Exp. Parasitol., 44: 202, 1978.
15. DVORANK, J. & SCHMUNIS, G.A. Trypanosoma cruzi. Interaction with Mouse Peritoneal Macrophages. Exp. Parasitol., 32: 289, 1972.
16. FERNANDES, T.F. & CASTELLANI, O. Growth Characteristics and Chemical Composition of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasitol., 18: 195, 1966.
17. GOBLE, F.C. South American Trypanosomes. In: Immunity to Parasitic Animals. New York: Appleton, v 2 p 597, 1970.

18. GOODWIN, L.G.; GREEN, D.G.; GUY, M.W. & VOLLER, A.
Immunossuppression during trypanosomiasis. Br. J. Exp. Path., 53, 40, 1972.
19. HANSON, W.L. Immunology of American Trypanosomiasis (Chagas'Disease). In Immunology of Parasitic Infections Edited by COHEN, S. & SADUN, E. Blackwell N.Y. p 222, 1976.
20. HOFF, R. A Method for Counting and Concentrating Living T. cruzi in Blood Lysed with Ammonium Chloride J. Parasitol., 60: 527, 1974.
21. HOFF, R. Killing In Vitro of T. cruzi by Macrophages from Mice Immunized with T. cruzi or BCG, and Absence of Cross-Immunity on Challenge In Vivo. J. Exp. Med., 142: 299, 1975.
22. HOFF, R. Recent advances in Cell Mediated Immunity to T. cruzi. In: Panamerican Health Organization. New Approaches in American Trypanosomiasis Research. International Symposium Scientific Publications, Proceedings, nº 318 p 312, 1975.
23. HUMPHREY, J.H. & WHITE, R.G. "Antigenos: Imunogenos e Haptenos". In: . Imunologia Médica. 3.ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1972. cap. 6: 256, 1972.
24. JONES, T.C.; LEN, L. & HIRSCH, J.G. Assessment in Vitro of Immunity Against Toxoplasma Gondii. J. Exp. Med. 141: 466, 1975.
25. KETTERIDGE, D. Trypanosoma vivax: Surface Interrelationships Between Hosts and Parasite. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg., 66: 324, 1972.

26. KIERSZEMBAUM, F.; INANYI, J. & BUDZKO, D.B. Mechanisms of Natural Resistance to Trypanosomal Infection. Immunology, 30: 1, 1976.
27. KIERSZEMBRAUM, F.; KNECHT, E.; BUDZKO, D.B. & PIZZIMENTI, M. C. Phagocytosis: A Defense Mechanism Against Infection with T. cruzi. Immunol., 112: 1839, 1974.
28. KIERSZEMBAUM, F. & HOWARD, J.G. Mechanisms of Resistance Against Experimental T. cruzi Infection: The importance of Antibodies and antibody forming Capacity in the Biozzi High and Low responder Mice. J. Immunol., 116: 1208, 1976.
29. KLOETZEL, J.; CAMARGO, M.E. & GIOVANINNI, V.L. Antigenic Differences Among Epimastigotes, Amastigotes and Trypomastigotes of T. cruzi. J. Protozool., 22: 259, 1975.
30. LARANJA, F.S.; DIAS, E.; NOBREGA, G. & MIRANDA, A. Chagas Disease. A Clinical, Epidemiologic and Pathologic Study. Circulation, 14: 1035, 1956.
31. MEMORANDA. Immunology of Chagas Disease. Bulletin WHO, 50: 459, 1974.
32. MITCHELL, G.F.; GRUMET, F.C. & McDEVIT, H.O. Genetic Control of the Immune Response The Effect of Thymectomy on the Primary and Secondary Antibody Response of Mice to Poly-L (Tyr, Glu)-Poly-D, L-Alapoly-L-Lys. J. Exp. Med., 135: 126, 1972.
33. MUNIZ, J. Imunidade na Doença de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 60, 1962.
34. NERY GUIMARÃES, F. & LAGE, A.H. Ação da Betametasona na Doença de Chagas Experimental. O Hospital, 77: 201, 1970.

35. NERY GUIMARÃES, F. Ação de Betametasona na Doença de Chagas Experimental. O Hospital, 78: 17, 1970.
36. NOGUEIRA, N. & COHN, Z.A. Trypanosoma cruzi Mechanism of Entry and Intracellular Fate in Mammalian Cells. J.Exp. Med., 143: 1402, 1976.
37. OKUMURA, M. e DECOURT, L.V. Estudo de Efeitos da Administração de Drogas Imunodepressoras Sobre a Molestia de Chagas Experimental. Rev.Hosp.Clin.Fac.Med.São Paulo, 24: 335, 1969.
38. REIS, A.P.; CHIARI, C.A.; TANUS, R. & ANDRADE, I.M. Cellular Immunity to T. cruzi Infection in Mice. Rev.Med. Trop. São Paulo, 18: 422, 1976.
39. ROBERSON, E.L.; CHAPMAN, W.L. & HANSON, W.L. The Effects of Total-Body X-Irradiation on T. cruzi Infections Chagas Disease in Mice and Rats. Z. Parasitenk, 41: 83, 1973.
40. ROBERSON, E.L. & HANSON, W.L. T. cruzi: Effects of Anti-thymocytes Serum in Mice and Neonatal Thymectomy in Rats. Exp. Parazitol., 34: 168, 1973.
41. ROWLAND, E.C. & KUHN, R.E. Suppression of Cellular Responses in Mice During T. cruzi Infections. Infec. Immun., 20: 393, 1973.
42. SALGADO, J.A.; GARCEZ, P.N.; OLIVEIRA, C.A. & GALIZZI, J. Revisão Clínica Atual do Primeiro Caso Humano Descrito da Doença de Chagas. Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo, 4: 330, 1962.
43. SCHMUNIS, G.A.; GONZALEZ CAPPA, S.M.; TRAVERSA, O.C. & JANOUSKY, J.F. The Effect of Immunodepression Due to Neonatal Thymectomy on Infection with T. cruzi in Mice. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg., 65: 89, 1971.

44. SHOEMAKER, J.P. & HOFFMAN Jr, R.V. T. cruzi: Possible Stimulatory Factor (s) in Brown Adipose Tissue of Mice. Exp.Parasitol., 35: 272, 1974.
45. TAKEHARA, A.H.; PERINI, A.; SILVA, M.H. & MOTA, I. Imunidade Humoral na Doença de Chagas Experimental. In: Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu, Minas Gerais, 1978.
46. TEIXEIRA, A.R.L. & SANTOS BUCH, C.A. The Immunology of Experimental Chagas'Disease II. Delayed hypersensitivity to T. cruzi antigens. Immunology, 28: 401, 1975.
47. TRISCHMANN, T.; TONOWITZ, H.; WITTNER, M. & BLOOM, B. T. cruzi. Role of the Immune Response in the Natural Resistance of Inbred Strains of Mice. Exp.Parasitol., 45: 160, 1978.
48. TSCHUDI, E.I.; ANZIANO, D.F. & DALMASSO, A.P. Lymphocyte Transformation in Chagas'Disease. Infect. Immun., 60: 905, 1972.
49. VICKERMAN, K. On the Surface Coat and Flagellar Adhesion in Trypanosomes. J.Cell.Sci., 5: 163, 1969.
50. YANOVSKY, J.F. & ALBADO, E. Humoral and Cellular Responses to T. cruzi Infection. Immunology, 109: 1159, 1972.
51. WEITS, B. The Properties of Some Antigens of T. brucei. Gen Microbiol, 22: 589, 1960.
52. WILLIAMS, D.M.; SAWYER, S. & REMINGTON, J.S. Role of Activated Macrophages in Resistance of Mice to Infection with T. cruzi. J. Infec.Dis., 134: 1976.