


ANTONIO TEIXEIRA

Doença de Chagas e outras doenças por **TRIPANOSSOMOS**



 **CNPq** CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO
CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO



Editora Universidade de Brasília

Um longo período de adaptação evolucionária teria conferido a certos protozoários a capacidade de perpetuarem-se em seus hospedeiros mamíferos oferecendo à civilização humana exemplos notáveis de coexistência pacífica? Certamente este deve ser o caso de certos tripanossomatídeos descritos neste livro.

O autor descreve as complexas relações dos tripanossomos *Stercoraria* nos seus hospedeiros. Em contraste com os protozoários do grupo *Salivária*, representados pelos tripanossomos africanos patogênicos, os primeiros são considerados relativamente não-patogênicos, pois as infecções resultantes não produzem doença reconhecível e são usualmente inócuos para o hospedeiro. Isto pode ser considerado verdadeiro também para o *Trypanosoma cruzi*, que causa doença de Chagas no homem e em alguns animais domésticos, pois este tripanossomo é perfeitamente adaptável e consegue sobreviver em mamíferos que servem como seus hospedeiros e reservatórios.

DOENÇA DE CHAGAS E OUTRAS DOENÇAS
POR TRIPANOSSOMOS



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Reitor: Cristovam Buarque
Vice-reitor: João Cláudio Todorov

EDITORA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Conselho Editorial

Hélio Jaguaribe de Mattos
José Caruso Moresco Danni – Presidente
José Walter Bautista Vidal
Murilo Bastos da Cunha
Odilon Ribeiro Coutinho
Paulo Espírito Santo Saraiva
Paulo Sérgio Pinheiro
Sadi Dal Rosso
Timothy Martin Mulholland
Vladimir Carvalho da Silva
Wilson Ferreira Hargreaves

ANTONIO TEIXEIRA

Doença de Chagas e outras doenças por **TRIPANOSSOMOS**



CNPq

CONSELHO NACIONAL
DE DESENVOLVIMENTO
CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO



Editora Universidade de Brasília

Este livro ou parte dele
não pode ser reproduzido por qualquer meio
sem autorização escrita do Editor

Impresso no Brasil
Editora Universidade de Brasília
Campus Universitário – Asa Norte
70.910 Brasília – Distrito Federal

Copyright © 1987 by Antônio R. L. Teixeira

Direitos exclusivos para esta Edição:
Editora Universidade de Brasília

Em co-edição com o CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico.

EQUIPE TÉCNICA

Editor

Maria Riza Baptista Dutra

Supervisor Gráfico

Elmano Rodrigues Pinheiro

Controladores de Texto

Thelma Rosane Pereira de Souza,
Wilma Gonçalves Rosas Saltarelli

Capa

Nanche Las-Casas

ISBN 85-230-0233-2

Ficha Catalográfica
elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília

Teixeira, Antônio R.L.
T266d Doença de chagas e outras doenças por
tripanossomos. Brasília, Editora Univer-
sidade de Brasília, 1987.
161 p.

616.937.3

616.937

|
série

À Lúcia, Luciana e João Carlos,
que me deram apoio e estímulo
durante a execução deste
trabalho.

AGRADECIMENTOS

Tenho enorme débito com meus colegas M. Lúcia Teixeira e C. Eduardo Tosta, devido a seus criticismos construtivos, discussões e encorajamento. Também sou agradecido aos estudantes e auxiliares que têm trabalhado no nosso laboratório durante os últimos 10 anos: Florêncio Figueiredo, Joffre Resende Filho, Judith Abelha, Maristela Oliveira, Edwin Solórzano, Martha Zappalá, José Carlos Córdoba, Inês Souto-Maior, Eliane Jabur, Roberto Silva, Jaime Santana, Luiz Vicente Rizzo, Maria José Gonçalves, Luzia M. Silva e Renê Pires. Este trabalho recebeu suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil.

SUMÁRIO

Prefácio	11
Introdução	13
I. <i>Trypanosoma cruzi</i> : Doença de Chagas	15
A – Nota histórica	15
B – Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> no vetor e no hospedeiro	17
C – Modos de transmissão	19
1. Transmissão pelo vetor	19
2. Transmissão por transfusão de sangue	20
3. Transmissão transplacentária e pelo leite	20
D – Incidência e importância econômica	21
E – Manifestações clínicas e patológicas da doença de Chagas	23
1. Fase aguda	23
2. Fase latente	24
3. Fase crônica	25
F – Estoques e clones	27
G – Imunogenicidade e antígenos do <i>T. cruzi</i> .	27
H – Relações parasito/hospedeiro	32
1. Adaptação, resistência e susceptibilidade	32
2. Base genética	33
3. Imunidade inata	34
4. Imunidade adquirida	37
a) Imunidade humoral	38
b) Imunidade celular dependente de anticorpo	45
c) Imunidade mediada por célula	46
d) Imunofagocitose	49
I – Imunossupressão em infecções pelo <i>T. cruzi</i>	54
J – Diagnóstico	59
K – Imunopatologia	61
1. Hipersensibilidade de tipo retardado	61
2. Patologia, hipersensibilidade tardia e parasitismo	64
3. Modelo animal da doença humana	66
4. Auto-imunidade na doença de Chagas	70

L – Imunoprofilaxia	75
1. Vacinas vivas atenuadas	76
a) Imunoproteção contra <i>T. cruzi</i> homólogo	76
b) Imunoproteção contra estoques heterólogos de <i>T. cruzi</i>	80
2. Vacinas mortas	81
M – Tratamento	84
N – Perspectiva	88
II. <i>Trypanosoma rangeli</i>	91
A – Ciclo de vida no vetor e no hospedeiro	91
B – Patogenicidade para o inseto vetor	93
C – Diagnóstico	93
D – Imunologia	95
III. <i>Trypanosoma lewisi</i>	97
A – Ciclo de vida no hospedeiro e no vetor	97
B – Relações parasito/hospedeiro	99
1. Resposta imunoprotetora	99
2. Imunossupressão	104
3. Patologia	105
IV. <i>Trypanosoma musculi</i>	107
A – Ciclo de vida no vetor e no hospedeiro	107
B – Relações parasito/hospedeiro	107
1. Respostas imunoprotetoras	107
2. Imunossupressão	111
3. Imunopatologia	111
V. <i>Trypanosoma theileri</i>	113
A – Ciclo de vida no vetor e no hospedeiro	113
B – Relações parasito/hospedeiro	114
1. Resposta imunoprotetoras	115
2. Imunossupressão	116
3. Patologia	117
Referências Bibliográficas	119

PREFÁCIO

Seguramente, a monografia aqui apresentada é um trabalho de fôlego, que ajudará o leitor a pôr seus conhecimentos em ordem. Embora o estudo do *Trypanosoma cruzi* seja assunto tradicionalmente brasileiro, desde sua descoberta por Carlos Chagas, em 1909, é importante obter conhecimento sobre outros tripanossomos stercorarianos, com objetivo de construir modelos experimentais, para esclarecimento do comportamento nos seus hospedeiros vertebrados. As demais espécies discutidas nesta monografia têm importância econômica na medicina veterinária, pois esses protozoários produzem complexas manifestações de doenças. Por exemplo, o *Trypanosoma theileri*, que infecta bovinos, pode infligir severas perdas nos rebanhos. Podemos antecipar que muitos trabalhadores deste campo do conhecimento científico terão de consultá-la periodicamente.

Um dos maiores problemas em biomedicina ainda é a comunicação. Por exemplo, quem no Brasil tem conhecimento dos avanços recentes, neste campo, que se conquistaram na China e na União Soviética? Todavia, os soviéticos têm um grupo relativamente grande trabalhando com os tripanossomos. Um fator dominante deste isolamento, que atinge muitos povos, é a linguagem. Não se prevê o advento de um esperanto científico neste momento. Uma solução parcial é publicar o material de referência útil em mais de uma língua e isto foi o que Antônio Teixeira obteve dos editores de sua obra. Desta forma, ela aparecerá em inglês no livro intitulado: *Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis of Parasitic Diseases*. Esperamos que esta solução seja adotada com frequência e signifique o começo de uma política voltada para o público da língua portuguesa.

Phillip D. Marsden
Universidade de Brasília
Dezembro, 1985.

INTRODUÇÃO

Os tripanossomos *Stercoraria* constituem um grupo heterogêneo de protozoários anciãos, digenéticos, encontrados nos subgêneros *Megatrypanum*, *Herpetosoma* e *Schizotrypanum*. Todos eles têm em comum o hábito de completar seu ciclo de desenvolvimento no meio fecal do intestino posterior no inseto-vetor. Mais de cinquenta espécies já foram identificadas e classificadas no grupo *Stercoraria*, todas elas infectantes para pelo menos um hospedeiro mamífero¹. Identificação e classificação de tripanossomos *Stercoraria* são baseados em critérios morfológicos, infectividade para o inseto-vetor, com desenvolvimento no intestino terminal e para hospedeiros mamíferos, com identificação de tripomastigotas sanguícolas ou amastigotas intracelulares, nos tecidos.

Considerável atenção tem sido focalizada na questão das relações filogenéticas dos tripanossomos *Stercoraria*¹⁻⁵. Certamente, os ancestrais dos tripanossomos não serão descobertos em fósseis paleontológicos, e, portanto, a história de sua evolução só pode ser deduzida através de outras evidências¹. A este respeito, uma grande importância deveria ser dada à descoberta de um ecossistema na Baixa Califórnia, México, onde várias espécies de triatomíneos (barbeiros) e répteis (lagartixas) foram encontrados habitando buracos em rochas esfoliadas, sem que houvesse ali indícios da presença de mamíferos. Uma associação notável foi verificada no laboratório, quando barbeiros (*Dipetalogaster maximus*) alimentaram-se prontamente pela inserção de seus estiletes entre as escamas da pele da lagartixa (*Sauromalis australis*). Também, observou-se todo ciclo de vida do parasito, de vez que as lagartixas tornaram-se infectadas depois de comer barbeiros infectados e que os barbeiros que se alimentaram naqueles répteis infectados recuperaram o *Trypanosoma cruzi*⁶. Outras provas laboratoriais mostraram que várias espécies de répteis podem servir como hospedeiros transitórios para um tripanossomo *Stercoraria*^{6, 7}. Em vista das evidências acima, acrescentadas à semelhança verificada entre os tripanossomos *Stercoraria* e certos flagelados encontrados em vertebrados inferiores, torna-se interessante considerar que todos esses tripanossomos são filogeneticamente relacionados.

O processo histórico de evolução dos tripanossomos *Stercoraria* pode, portanto, ser rastreado, retrospectivamente, até os invertebrados aquáticos¹, tais como sangues-sugas, que teriam transmitido os flagelados para os peixes, anfíbios e répteis. Uma cadeia evolucionária de eventos pode ser reconstituída, teoricamente, através da qual aqueles protozoários

primitivos do intestino de vertebrados inferiores teriam passado para o sangue. Esta cadeia continuou a evoluir com o tempo, quando aconteceu que os insetos se adaptaram à predação e tornaram-se hematófagos obrigatórios^{1,4,5}. Hoje em dia, considera-se que a hematofagia seja uma aquisição relativamente recente, que teria possibilitado que alguns Diptera – Triatominae, Cimicidae e Muscidae – transmitissem, por contaminação, os tripanossomos *Stercoraria* a seus hospedeiros mamíferos^{1,2}, quando os metatripanossomos presentes nas fezes depositadas na pele ganham acesso imediato à corrente sanguínea ou através de abrasões produzidas pelo probócis.

Em contraste com o grupo *Salivaria*, representado pelos tripanossomos africanos patogênicos, os *Stercoraria* são considerados relativamente não-patogênicos, pois as infecções resultantes não produzem doença reconhecível e são usualmente inócuos para o hospedeiro¹. Isto pode ser considerado verdadeiro também para o *Trypanosoma cruzi*, que causa doença de Chagas no homem e em alguns animais domésticos, desde quando esses tripanossomos anciãos são perfeitamente adaptáveis e conseguem sobreviver em mamíferos que servem como seus hospedeiros naturais e reservatórios. Dessa forma, como regra geral, pode-se dizer que os tripanossomos encontrados no grupo *Stercoraria* são inclinados a produzir infecções crípticas, sem ocasionar prejuízos para o hospedeiro. Certamente, uma longa adaptação evolucionária deve ter possibilitado a esses tripanossomos a capacidade de perpetuarem-se em seus hospedeiros, de forma a também propiciar à civilização humana este notável exemplo de coexistência pacífica. Todavia, o equilíbrio estabelecido na relação parasito/hospedeiro pode ser alterado sob certas condições e, em consequência, o parasito inocente torna-se patogênico, usualmente quando a tolerância é modificada de uma forma ou de outra. Nessas circunstâncias, alguns tripanossomos *Stercoraria* – *T. cruzi*, *T. lewisi*, *T. musculi* e *T. theileri* – podem causar infecções que resultariam em patogenicidade para o homem, roedores e bovinos. Este capítulo tratará apenas daquelas infecções causadas por parasitos *Stercoraria* que apresentam importância médica e veterinária, focalizando a atenção naqueles aspectos de imunidade que são envolvidos em modificações das relações parasito/hospedeiro, resultando em complexas manifestações de doenças.

I. *TRYPANOSOMA CRUZI* e DOENÇA DE CHAGAS

A – NOTA HISTÓRICA.

A existência de uma nova espécie de tripanossomíase humana foi trazida à luz pelo cientista brasileiro, Dr. Carlos Chagas⁸⁻¹⁴, depois que ele encontrou formas epimastigotas de um flagelado no intestino de um inseto hematófago (barbeiro) que infestava as choupanas dos nativos da pobre área rural de Minas Gerais. Chagas provou que aqueles tripanossomos eram infectantes para sagüis, cães e roedores⁸⁻¹⁰. Essa observação levou-o a suspeitar de que o novo tripanossomo podia causar certa forma de doença, ainda desconhecida, em crianças, manifestada por febre, anemia, edema e distúrbios cardíacos. Foi assim que logo em seguida ele encontrou tripanossomos no sangue de um gato e em uma criança que morava em uma casa infestada com o inseto hematófago *Panstrongylus megistus*. A partir de então, a doença de Chagas tornou-se um exemplo memorável de uma doença humana, cujo agente causal, o *Trypanosoma cruzi*, foi descoberto no inseto-vetor antes que seu hospedeiro vertebrado fosse conhecido¹³⁻¹⁴.

O encontro de reservatórios de *T. cruzi* entre animais silvestres¹⁰ representou o próximo ganho importante no conhecimento de que a Tripanossomíase Americana era enzoótica no Novo Continente. O grau de adaptação do parasito aos animais silvestres era uma clara evidência de algo remoto, pois anos incontáveis se passaram antes que a seleção natural favorecendo o equilíbrio parasito/hospedeiro acontecesse. De fato, o *T. cruzi* pode infectar mais de 90 espécies de hospedeiros invertebrados e mais de 100 espécies de mamíferos, distribuídos em várias ordens¹⁵⁻¹⁷. Portanto, torna-se razoável acreditar que em tempos pré-colombianos as infecções pelo *T. cruzi* não pareciam prejudicar seus hospedeiros, enquanto as espécies sobreviviam em estado de firme equilíbrio, tal como encontrado agora entre os animais silvestres do Novo Mundo que servem como reservatórios.

A primeira descrição de uma entidade clínica que sugerisse doença de Chagas pode ser encontrada na literatura portuguesa, no começo do século XIX¹⁸. Uma doença foi descrita que... “atacava principalmente os negros recentemente chegados da costa africana”, e... “a febre insidiosa acompanhando esta condição é tão violenta que se pode ver a área precordial”. A ocorrência de morte súbita parece também estar registrada em habitantes portugueses e brasileiros, que não pareciam estar em mau

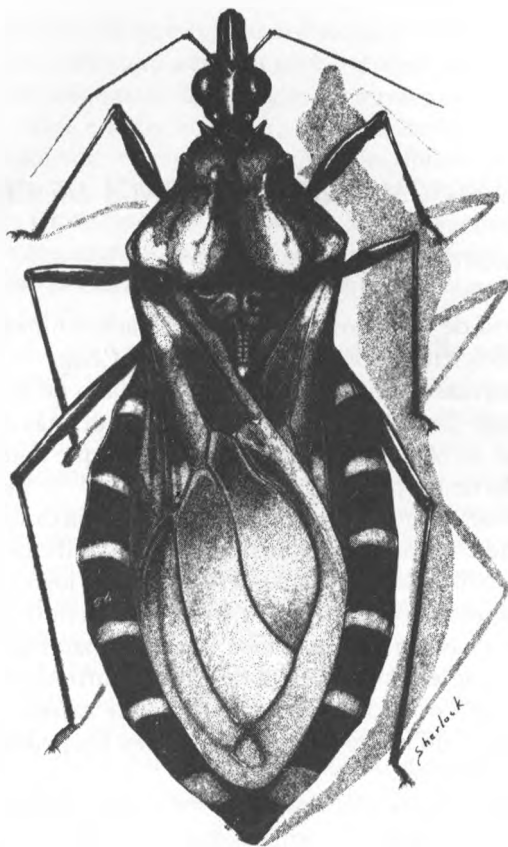


Fig. 1. *Panstrongylus megistus* (barbeiro, bicudo, chupão), transmissor da Tripanossomíase Americana ao homem.

estado de saúde, mas perguntavam ao médico se “ele achava que ele iria sobreviver”. Em adição, um dicionário de medicina doméstica e popular, publicado em 1865, dá uma precisa descrição de megaesôfago: “*Mal de engasgo*, disfagia ou dificuldade de deglutição”, que é endêmico naquelas regiões onde a doença de Chagas era altamente prevalente¹⁷.

Deve existir um considerável grau de adaptação do parasito nos mamíferos que têm vivido no Novo Mundo por tempos imemoriais. Entretanto, a doença de Chagas não tem sido registrada na população de ameríndios que sobrevivem à civilização pós-colombiana. Inquéritos sorológicos realizados em quatro tribos do Brasil Central¹⁹, onde a doença de Chagas é altamente prevalente, e, também, entre tribos indígenas de diferentes regiões da Amazônia^{20,21} mostraram ausência de infecções pelo *T. cruzi*. Sob um processo de aculturação autodestrutivo, os ameríndios do Brasil Central moram em choupanas que se assemelham àquelas usadas pela população rural não-ameríndia. Entre-

tanto, os primeiros não adquirem *T. cruzi*, aparentemente, pela transmissão via vetor. É parte do folclore nativo que os “ameríndios usam ervas e se perfumam para evitar a morte”, mas esta noção continua sem suporte. Em todo caso, a pesquisa científica orientada para esclarecer os fatores que seriam responsáveis pela ausência de infecções pelo *T. cruzi* na população indígena continua negligenciada. Com o conhecimento atual, seria preferível considerar aqui que o processo de seleção natural teria provido as condições para que os ameríndios se tornassem inadequados para aquisição do *T. cruzi*, via inseto-vetor.

B – CICLO DE VIDA DO *T. CRUZI* NO VETOR E NO HOSPEDEIRO

O *T. cruzi* é a espécie-tipo do subgênero *Schizotrypanum*, distinguível de outros tripanossomos pertencentes a esse subgênero devido, principalmente, às relações parasito/hospedeiro^{15,22}. *T. cruzi* infecta várias ordens de mamíferos: Marsupiais, Edentados, Carnívoros, Lagomorfos, Roedores e Primatas do Novo Mundo, ficando apenas a exceção dos Quirópteros (morcegos) que são Cosmopolitas¹. Entretanto, a distribuição geográfica do *T. cruzi* não parece ser confinada por restrições de hospedeiros. Pois, quando mamíferos de várias ordens foram introduzidos no Continente Americano, eles adquiriram a infecção. Assim, homens e seus animais domésticos, trazidos da Europa e da África, prontamente adquiriram o *T. cruzi*.

O protozoário tem hábito essencialmente intracelular no hospedeiro vertebrado²³. Metatripanossomos introduzidos no organismo parasitam qualquer célula hospedeira, onde eles se transformam em formas amastigotas arredondadas com organelas típicas, núcleo e cinetoplasto facilmente identificáveis. Os parasitos intracelulares multiplicam-se por divisão binária e os pseudocistos contendo amastigotas podem permanecer nas células dos tecidos por longos períodos de tempo. Nos tecidos do hospedeiro as formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas relativamente pequenos, delgados, com cinetoplasto oval e volumoso, situado próximo à extremidade posterior ponteguda e curta do corpo. Esta transformação é precedida por um estágio epimastigota (Fig. 1), e o tripomastigota completamente diferenciado é propelido na corrente sanguínea por um flagelo livre com duas ou três convoluções rasas.

Recentemente foi descrito que 93 por cento dos pacientes com doença de Chagas crônica, sem o parasito no sangue, apresentavam as formas amastigotas nas fibras musculares lisas da veia central da glândula supra-renal. O parasito não foi encontrado em nenhum outro lugar do corpo²⁴. Neste caso, tem sido assumido que os níveis locais elevados de hormônios imunossupressores fariam da musculatura da veia adrenal um abrigo para o parasito, permitindo sua sobrevivência no hospedeiro imunizado por tempo ilimitado.



Fig. 1A. *Trypanosoma cruzi*: Formas do parasito que se assemelham a estágios epimastigotas permanecem livres no citoplasma de um fibroblasto MR-90 em cultura. N: núcleo; K: cinetoplasto; F: flagelo.

Ainda mais recentemente foi descrito o curso da infecção no gambá (*Didelphis marsupialis*). Esses reservatórios silvestres são capazes de abrigar o parasito no lúmen das glândulas anais, onde eles apresentam as características do ciclo observado no hospedeiro invertebrado. Vários estoques do *T. Cruzi* podem produzir infecções com altas parasitemias e longos períodos de patência, mas essas infecções são geralmente crípticas. Mesmo no caso de infecções severas, observam-se períodos em que os parasitos desaparecem da circulação, deixando apenas os anticorpos séricos como as marcas da infecção persistente. Desta forma, este reservatório possui um “esconderijo”, (glândulas anais exócrinas) de

onde as diversas formas do parasito podem ganhar a corrente circulatória ou lúmen intestinal através dos dutos glandulares, onde permanece aparentemente protegido contra as defesas imunes do hospedeiro.

A distribuição geográfica do parasito coincide com aquela dos insetos vetores, pertencentes à subfamília Triatominae. A existência de triatomíneos parece ser determinada pelas condições ecológicas favoráveis, encontradas nas regiões tropical e subtropical do Novo Mundo ²⁵. A faixa geográfica desses insetos é extensa, desde a latitude 42° N nos Estados Unidos até 43° S na Argentina. Pelo menos 50 espécies são responsáveis pela circulação do parasito na natureza e pela manutenção do ciclo selvático. As espécies incriminadas no ciclo doméstico são *Panstrongylus megistus*, *Triatoma braziliensis*, *T. dimidiata*, *T. infestans*, *T. pseudomaculata*, *T. rubrofasciata*, *T. sordida* e *Rhodnius prolixus*. ²⁵⁻²⁸. Esses triatomíneos são prontamente infectados com *T. cruzi* enquanto eles ingerem sangue de hospedeiros vertebrados infectados. Os tripomastigotas ingeridos são transformados em amastigotas no intestino anterior, em epimastigotas no intestino médio e revertem a metatripanossomos no intestino posterior do inseto, onde eles incubam. Após uma alimentação plena os insetos engurgitados têm a tendência de defecar e passar metatripanossomos nas fezes. A adaptação do *T. cruzi* aos Triatominae parece ter resultado de uma associação de longa antiguidade ²⁹.

Os triatomíneos têm hábitos noturnos e usualmente atacam as presas adormecidas; quando molestados pela luz ou movimento, eles retiram o probócis e afastam-se. A picada pode ser sentida como agulhada leve que usualmente não desperta o homem de seu sono. A localização da presa pode ser orientada pela temperatura do ar e gradiente de dióxido de carbono ³⁰. Entretanto, os fatores que influenciam a seleção da presa entre os indivíduos de uma população permanecem desconhecidos. Parece claro que os insetos são atraídos por substâncias químicas. A este respeito, já foi descrito que a composição e decomposição de produtos orgânicos, tais como ácidos acético, propiônico e butírico, são especialmente atrativos para *Drosophila* ³¹. Existe, pois, a possibilidade de que os atrativos químicos possam influenciar os insetos *Reduviid* na seleção de suas presas. Esta área da investigação científica tem sido negligenciada, e os fatores capazes de atrair ou repelir esses insetos poderiam ser pesquisados na pele, nas secreções corporais, odores, etc.

C – MODOS DE TRANSMISSÃO

1. Transmissão pelo vetor

Contaminação de hospedeiros vertebrados com fezes de insetos *Reduviid* (barbeiros) é a principal via de aquisição de infecções pelo *T. cruzi*, e é considerada como responsável pela endemicidade da doença de Chagas na América Latina ³². A transmissão do *T. cruzi* pelas fezes do

barbeiro está bem demonstrada^{33, 34}, e sabe-se que a infecção não resulta de sua picada. A contaminação das mucosas ou da abrasão cutânea com a excreta dos barbeiros contendo metatrípanossomos usualmente resulta em infecções patentes dentro de uma a duas semanas, quando as formas tripomastigotas aparecem no sangue periférico. A dinâmica de transmissão pelo inseto-vetor tem sido estudada em populações humanas. Estudos de campo têm mostrado que índices elevados de casas infestadas pelos triatomíneos e alta percentagem de insetos domiciliados portadores do *T. cruzi* correlacionam com alto risco de transmissão da infecção para o homem³⁵⁻³⁸. Outros fatores envolvidos na transmissão são atividade noturna do vetor doméstico e sua frequência média de alimentação, hábito de defecação após uma refeição e o número total de tripanossomos na excreta²⁹. Um modelo matemático foi desenvolvido como uma tentativa de avaliação do risco de infecção³⁷, mas as evidências mostraram tratar-se de uma simplificação inadequada. Por exemplo, estudos de campo em áreas de alta endemicidade mostraram que, enquanto vivendo em ambiente de alto risco, nem todos membros de uma família adquiriram infecções com igual facilidade³⁹. De fato, muitos indivíduos escaparam de infectar-se durante muitos anos, décadas ou mesmo por toda a vida passada em tal ambiente. Nem todos os fatores envolvidos na transmissão do *T. cruzi* pelo vetor são entendidos e, portanto, as tentativas de avaliação do risco de infecção podem ser infrutíferas.

2. Transmissão por transfusão de sangue

A transmissão do *T. cruzi* pela transfusão de sangue é considerada a segunda via mais freqüente de contaminação, em áreas onde ocorre a transmissão ativa pelo vetor, enquanto tem sido considerada a principal via de infecção, naquelas áreas da América Latina onde o inseto-vetor foi erradicado³². Tem sido sugerido que 20 – 30.000 infecções podem ocorrer no Brasil a cada ano como resultado direto de seleção inadequada de doadores de sangue⁴⁰⁻⁴². Observações foram feitas com o *T. cruzi* estocado em sangue citratado, à temperatura ambiente; após oito meses e meio, verificou-se que tripanossomos não apenas viáveis, mas que haviam se transformado em amastigotas e epimastigotas e se multiplicaram no sangue⁴³. O sangue estocado pode ser esterilizado com violeta de genciana 1:4000, adicionada um dia antes da transfusão⁴⁴. Parece, entretanto, que o sangue azul não é bem aceito pelos pacientes e, ademais, violeta de genciana é consideravelmente tóxica e variável em composição²⁹.

3. Transmissão transplacentária e pelo leite

A transmissão transplacentária do *T. cruzi* para o concepto é causa importante de aborto, natimorto e prematuridade, naquelas regiões onde

a doença de Chagas é endêmica⁴⁵⁻⁴⁹. A frequência com que as mães chagásicas transmitem o *T. cruzi* para os filhos varia de 0, 1 a 2,58 por cento⁵⁰⁻⁵¹. Esta frequência aumenta para 10,7 por cento em partos prematuros⁵². Recém-natos com infecções congênicas pelo *T. cruzi* podem manifestar doença aguda ou podem ser assintomáticos, a despeito da presença do parasito na circulação^{32, 46, 49}. A importância da transmissão congênita na epidemiologia da doença de Chagas é difícil de avaliar devido à pobreza de investigações nesta área. Entretanto, a profilaxia das infecções do *T. cruzi* pelo vetor e por transfusão de sangue levará finalmente a maior interesse por esta forma de transmissão.

A transmissão congênita do *T. cruzi* tem sido obtida experimentalmente em vários hospedeiros vertebrados, tais como cães^{53, 54}, coelhos⁵⁵, cobaias⁵⁶ e camundongos^{57, 58}. Em geral, transmissão ao concepto pode ocorrer em qualquer fase da infecção materna, mas o maior risco é observado na fase aguda quando a parasitemia está patente (i. e., parasitos são observados no sangue). Lesões granulomatosas e infiltrados mononucleares são vistos nas vilosidades e tecidos intervilosos, e formas amastigotas do *T. cruzi* são encontradas em histiócitos⁴⁹. A placenta pode ser parcialmente necrótica com lesões extensas no epitélio trofoblástico. Formas do parasito podem estar presentes também no córion e cordão umbilical. Lesões histopatológicas são vistas usualmente no coração, sistema nervoso, tubo digestivo, pele e músculos esqueléticos de natimortos e prematuros⁴⁷⁻⁴⁹.

Transmissão pelo leite tem sido observada em mulheres e em animais de experimentação com a infecção aguda^{59, 60}. Existe um caso publicado em que a jovem mãe com a doença de Chagas aguda tinha o *T. cruzi* no colostro antes e depois da parturição, mas o recém-nato não adquiriu a infecção congenitamente⁶¹. Foi recomendado suspender o aleitamento materno. Por outro lado, se tem observado que as infecções pelo *T. cruzi* são exacerbadas durante a gestação, quando as parasitemias podem voltar à patência⁶², provavelmente como resultado da depressão da imunidade celular que acompanha a gravidez.

O *T. cruzi* é considerado ser o mais infectante protozoário do sangue humano²⁹. Transmissão acidental ao homem tem sido registrada, e mais de 50 casos já ocorreram em laboratórios, devidos a acidentes com seringas infectadas ou durante pipetagem de culturas²⁹. Deve ser lembrado também que infecções experimentais têm sido obtidas por aerosol²⁹. Entretanto, transmissão oral são mais freqüentemente encontradas entre insetívoros e carnívoros.

D – INCIDÊNCIA E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

As infecções do homem pelo *T. cruzi* estão espalhadas naquelas regiões neotrópicas e subtropicais em que insetos-vetores e reservatórios

são encontrados e onde as condições ecológicas favorecem a circulação do parasito na natureza ¹.

Nem sempre a extensa circulação do parasito correlaciona-se com a prevalência de infecção humana. No Sudoeste dos Estados Unidos, uma alta percentagem de invertebrados intermediários e hospedeiros vertebrados foram encontrados naturalmente infectados com o *T. cruzi* ⁶³. Entretanto, infecção humana é rara naquela área. Os primeiros casos verdadeiramente autóctones foram descritos no Texas em 1955 ⁶⁴, e o terceiro caso na Califórnia em 1983 ⁶⁵. Na Amazônia têm sido detectados poucos casos de infecções pelo *T. cruzi* em humanos ^{61, 67}, a despeito de que elas são observadas freqüentemente em animais silvestres ⁶⁷⁻⁶⁹. Os fatores que desempenham um papel na modulação da epidemiologia da doença de Chagas são diversos em natureza. Alguns desses fatores já foram descritos em outros trabalhos ^{15-17, 27-30}. Entretanto, é do maior interesse notar que as infecções pelo *T. cruzi* não são encontradas usualmente entre a população de ameríndios.

Existem evidências sugerindo que aproximadamente 35 milhões de indivíduos nas Américas estão expostos e sujeitos ao risco de adquirir infecções com *T. cruzi* ³⁰. A prevalência da infecção no homem é usualmente determinada sorologicamente e o percentual de testes positivos varia de 0,43 por cento na Geórgia, EUA ^{70,71}, a 74,2 por cento em área rural hiperendêmica da Argentina ⁷². Um grupo de peritos sobre doença de Chagas considerou a média de 20 por cento de infecções, determinada em inquéritos de habitantes rurais de vários países, e estimou que 10-12 milhões de pessoas na América Latina estão infectadas com *T. cruzi* ⁷³. O êxodo rural que se tem observado na América Latina parece ser responsável pela introdução de legiões de indivíduos infectados na vida urbana ⁷⁴⁻⁷⁶. Já se observou que, em consequência de migrações, 10,2 por cento dos trabalhadores na indústria automobilística em São Paulo têm teste sorológico positivo para *T. cruzi* ⁷⁷.

A importância econômica da doença de Chagas pode ser avaliada pelas taxas de aposentadoria precoce (9,27/100.000 habitantes) em consequência direta da doença ⁷⁸. Outras avaliações podem ser inferidas a partir das taxas de morbidade e mortalidade. Taxas elevadas de anormalidades eletrocardiográficas foram observadas em indivíduos soropositivos, onde o pico da prevalência ocorreu entre 25 e 44 anos de idade. ECG anormal neste grupo etário de indivíduos soropositivos é 9,6 vezes mais freqüente do que entre indivíduos soronegativos ⁷⁹. Com base em estudos de campo, longitudinais, foi estimado que pelo menos 73.000 pessoas morrem, cada ano, como resultado direto das lesões cardíacas e digestivas da doença de Chagas ^{35, 78, 80}.

E – MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PATOLÓGICAS DA DOENÇA DE CHAGAS

1. Fase aguda

Infecções de humanos pelo *T. cruzi* são usualmente adquiridas na infância e adolescência¹⁷. Em um estudo de campo em região com alta pressão de transmissão, aproximadamente um terço de todos os casos agudos foi visto em infantes com menos de dois anos de idade e 75 por cento de todos os casos agudos foram vistos em crianças com menos de 10 anos de idade, enquanto as infecções agudas restantes foram vistas em jovens com menos de 15 anos de idade^{11, 35}. A escassez de doença de Chagas aguda em adultos e idosos pode ser devida à observação de que uma superinfecção não induz um segundo surto de doença aguda, ou porque a seleção da presa pelo vetor, que costuma acontecer nos primeiros anos de vida, já teria descartado aqueles indivíduos menos sujeitos à transmissão pelo inseto-vetor. A dinâmica de transmissão do *T. cruzi* ao homem revelaria, portanto, a prontidão com que o *T. cruzi* pode ser transmitido para certos indivíduos de uma população, enquanto outros escapam à transmissão pelo vetor e não se tornam infectados^{29, 39}. De fato, a curva de prevalência das infecções agudas pelo *T. cruzi*, determinada por testes sorológicos em uma área de alta endemicidade, mostra pouco incremento em grupos etários acima de 20 anos, a qual atinge um *plateau* e começa a declinar após os 40 anos de idade^{35, 81}.

A fase aguda da doença de Chagas pode ser totalmente assintomática e usualmente passa despercebida, ainda que a infecção possa manifestar-se com febre e sinais de doença aguda em uma minoria de casos³⁷. Uma estimativa retrospectiva parece mostrar que para cada caso agudo manifesto, detectado clinicamente em crianças com menos de dois anos de idade, havia nove outros casos de infecção aguda assintomática que passava despercebida³⁵. Além disso, a proporção entre casos sintomáticos/assintomáticos foi de 1:15 em crianças com menos de 10 anos de idade³⁵. Existe, pois, a possibilidade de que esses dados reflitam a capacidade de detecção de casos agudos da doença de Chagas, desde quando o estudo referido foi feito quase quarenta anos atrás. Naquele tempo, somente os casos agudos com manifestação clínica flagrante, diagnosticados pela febre e sinais cardinais indicativos da porta de entrada do parasito no corpo, manifestado por edema bupalperal unilateral, conjuntivite e linfonodos aumentados – sinal de Romaña – ou por lesão indurada da pele – chagoma, eram identificados.

Em um estudo de campo, prospectivo, realizado há oito anos, na Bahia, Brasil, e voltado para a detecção precoce de todos os casos agudos, verificou-se a existência de dois grupos de indivíduos com infecções agudas⁸². O primeiro grupo consistiu de uma minoria de pacientes, nos

quais a doença foi detectada clinicamente com base nos sintomas e sinais clássicos. O segundo grupo consistiu de mais de dois terços das infecções agudas que tinham curso assintomático⁸². Este último grupo pode ser identificado apenas pela conversão de testes sorológicos, previamente negativos, e os diagnósticos eram confirmados pela demonstração do parasito no sangue periférico⁸².

As parasitemias patentes na doença de Chagas aguda usualmente desaparecem espontaneamente dentro de dois a três meses. Entretanto, a fase aguda da infecção é dita durar seis meses, em cujo período persistem hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, linfocitose e alterações eletrocardiográficas⁸³. A mortalidade na fase aguda da infecção pode ser estimada em 5 por cento de todos os casos flagrantes, sintomáticos, e é relacionada à insuficiência cardíaca, meningoencefalite ou infecção intercurrente. De modo que, se aceitarmos que aproximadamente 25 por cento das infecções agudas são sintomáticas, poderíamos também estimar que a mortalidade devido à doença de Chagas aguda estaria dentro da faixa de 1,25 por cento ou menos. Não obstante, a doença de Chagas tornou-se, talvez, o maior problema de saúde pública nas áreas endêmicas da América Latina porque é responsável por taxas elevadas de morbidade e de mortalidade determinadas pelas infecções crônicas do *T. cruzi*.

2. Fase latente

Os indivíduos que se recuperam das infecções agudas do *T. cruzi* continuarão a abrigar o parasito no organismo, tal como é sugerido pela persistência dos testes sorológicos positivos e pelo xenodiagnóstico (alimentação de triatomíneos não-infectados, criados no laboratório, para determinação da parasitemia), ainda que eles não apresentem qualquer manifestação da doença de Chagas crônica⁸⁴. Diz-se que esses indivíduos estariam na fase latente ou indeterminada da infecção. Evidências laboratoriais e clínicas têm sugerido que aproximadamente 50-60 por cento dos indivíduos com evidência sorológica de infecções pelo *T. cruzi* podem ser classificados na forma indeterminada^{35, 84}. Entretanto, aqueles que morrem subitamente, enquanto na forma indeterminada, apresentam lesões inflamatórias no coração⁸⁵. Além disso, estudos prospectivos mostram que num período de mais de 10 anos, 24 por cento dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* evoluem para apresentar manifestações cardíacas ou digestivas da doença de Chagas crônica⁸³. A aquisição de anormalidades do ECG numa população soropositiva é gradual e evolui na taxa de 2,3 por cento ao ano⁷⁹. Tem sido sugerido que a manifestação cardíaca da doença de Chagas crônica aparece, em média, 27,7 anos após a fase aguda³⁵.

3. Fase crônica

A doença de Chagas crônica é a principal causa de morbidade e mortalidade em áreas endêmicas. Seu reconhecimento em pacientes assintomáticos é feito pelas alterações eletrocardiográficas associadas à cardiomiopatia crônica. Um estudo prospectivo mostrou que entre a população com infecções crônicas pelo *T. cruzi*, 57 por cento das mortes são devidas à doença de Chagas. Destes, 58 por cento morrem de insuficiência cardíaca e 37,5 por cento são acometidos por morte súbita. Os pacientes restantes morrem de doença digestiva, megaesôfago ou megacólon⁸⁰. A cardiomiopatia da doença de Chagas leva a aumento global do coração, devido à insuficiência ventricular direita e esquerda. Pacientes com insuficiência cardíaca associada à miocardite da doença de Chagas (Fig. 2) evoluem inexoravelmente para a morte em

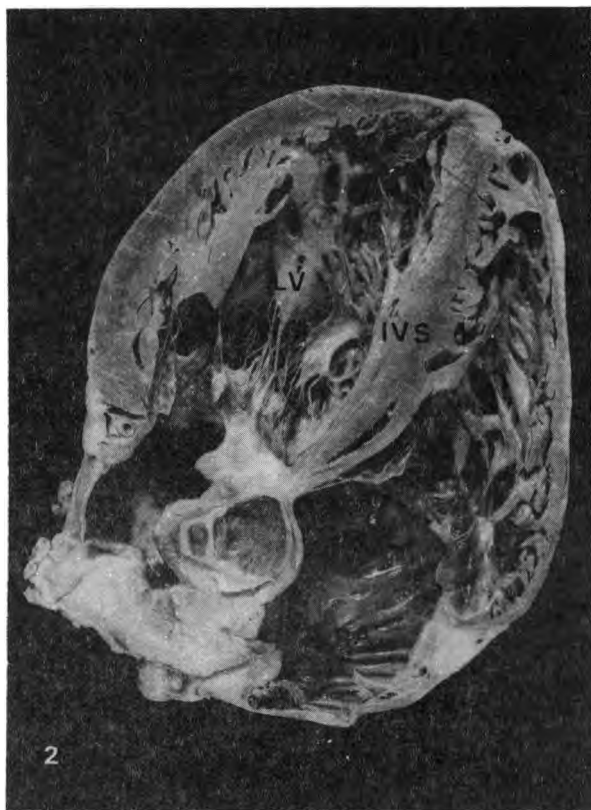


Fig. 2. Cardiomiopatia chagásica: Secção sagital mostrando um coração alargado com dilatação das câmaras. Trombos murais (T) são vistos no ápex do ventrículo esquerdo (LV) e no átrio direito (RA). (Cortesia do Dr. Albino Verçosa Magalhães, Universidade de Brasília).

um período usualmente menor do que cinco anos⁸⁵. Por outro lado, pacientes com envolvimento de vísceras ocas desenvolvem um curso insidioso, síndrome consumptiva, e apresentam diferentes graus de acalasia, com dilatação e espessamento da parede de porções do esôfago e do cólon⁸⁶.

Despopulação de neurônios parassimpáticos mioentéricos tem sido descrita, que se poderia relacionar com propagação defeituosa e falência dos segmentos distais das vísceras ocas no relaxamento⁸⁷⁻⁹¹. A doença de Chagas também ataca músculos lisos e estriados, e lesões inflamatórias podem ser encontradas também nas vísceras e músculos esqueléticos^{55, 92, 93}. A miocardite (Fig. 3), miosite e ganglionite da doença de Chagas crônica são caracterizadas por infiltrados de células mononucleares e destruição das células-alvo, na ausência do parasito *in situ*^{94, 95}.

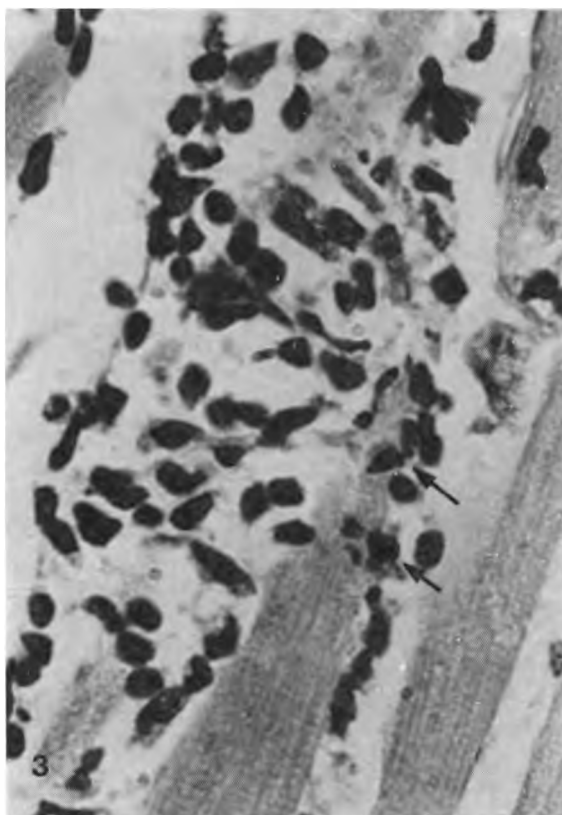


Fig. 3. *Miocardite crônica da doença de Chagas*: Destruição de fibras cardíacas não-parasitadas por linfócitos efetores. Note a lise das células-alvo pelo ataque dos linfócitos imunes. Linfócitos ativados são vistos dentro do citoplasma de uma miofibrila (seta) e uma célula cardíaca fragmentada está presente no lado esquerdo.

F – ESTOQUES E CLONES DO *T. CRUZI*

Organismos indistinguíveis morfológicamente do *T. cruzi* circulam na natureza em vertebrados e invertebrados, os quais formam um grupo altamente heterogêneo de parasitos prudentemente considerados patogênicos para o homem. *T. cruzi* isolado de humanos, mamíferos silvestres e insetos-vetores têm sido estocados, cuja virulência e patogenicidade são determinadas em animais de laboratório. Ainda que a definição microbiológica de cepa não possa ser estritamente aplicada neste caso, tem se tornado lugar-comum o uso daquele termo na literatura, como meio de identificação de isolados ou estoques de origem conhecida. A maioria dos critérios usados no passado como tentativa de identificação de estoques de *T. cruzi* permanece como referência valiosa para o trabalho no laboratório⁹⁶⁻⁹⁸, apesar de não ter resultado em valor prático, de vez que são de difícil padronização. O uso de técnicas recentes para análise de variação do isozima (isodema), perfil polipeptídico (peptidema) e marcadores do genótipo da célula (esquizodema) tem permitido certo progresso acerca da heterogeneidade das populações de *T. cruzi*⁹⁹⁻¹⁰⁵. Entretanto, a identificação adequada de estoques requer mais trabalho. A importância do tema deve ser enfatizada, pois a caracterização de estoques de *T. cruzi* com base em marcadores fisiológicos estáveis permitiria correlações com alguns aspectos das infecções do parasito em animais de laboratório, e levaria à abordagem da questão sobre a associação entre variações geográficas das manifestações clínicas da doença de Chagas e possíveis diferenças putativas existentes em estoques do parasito.

Tem sido postulado que cada membro de um estoque de *T. cruzi* é um clone, porque não está provado que a sexualidade participa da renovação do genoma da célula¹. Existe a possibilidade de que a clonagem de vários membros de um estoque do parasito levaria à obtenção de cepas selecionadas no laboratório, distinguíveis por marcadores fisiológicos estáveis e pelo atributo de reproduzir consistentemente alguns, se não todos, aspectos da doença de Chagas. Com este fim, se tem obtido isolados de um só tripanossomo, e sua caracterização biológica poderá esclarecer a importância do parasito como um dos fatores que modulam o processo que leva à doença¹⁰⁶⁻¹¹⁰.

G – IMUNOGENICIDADE E ANTÍGENOS DO *T. CRUZI*

Vários métodos têm sido utilizados para obtenção de antígenos de formas do *T. cruzi*. Homogeneizados do parasito rompidos por alta pressão ou por pressão-descompressão, em baixas temperaturas, têm sido fracionados e a imunogenicidade de cada fração subcelular tem sido caracterizada contra os produtos de reações imunes, induzidas experimentalmente em animais de laboratórios¹¹¹⁻¹²⁰. A partição do homoge-

neizado total mostrou que o sobrenadante, após centrifugação a 100.000 x g, contém os antígenos solúveis capazes de produzir títulos altos de anticorpos humorais, ainda que esses antígenos solúveis também evoquem reações de imunidade celular¹¹²⁻¹¹⁸. Todavia, reações fortes de imunidade celular são obtidas usualmente com as frações subcelulares ribossomal e microssomal¹¹⁸⁻¹²⁰. Uma fração flagelar também pode ser obtida dos homogeneizados, que têm considerável imunogenicidade em camundongos¹¹⁹⁻¹²⁰. Em geral, os métodos físicos empregados têm fornecido vários antígenos de imunogenicidade potente, sem guardar relação com o estágio do ciclo de desenvolvimento do parasito¹¹⁶⁻¹²⁰. A maioria dos estudos sobre imunologia e imunopatologia da doença de Chagas são feitos usualmente com preparações antigênicas obtidas de formas epimastigotas de culturas, por processo físico, tal como congelamento e descongelamento repetidos.

Ultimamente tem havido um grande interesse acerca da imunquímica dos antígenos do *T. cruzi* por duas razões principais: Em primeiro lugar, acredita-se na idéia de que a infecção produz um grau considerável de resistência, ainda que a imunidade resultante seja não-estéril. Em segundo lugar, por causa do postulado de que os mecanismos de imunidade adquirida possam existir independentemente daquelas reações imunes de hipersensibilidade que parecem alterar o equilíbrio parasito/hospedeiro. Daí a urgência com que muitos cientistas têm explorado este campo, em paralelismo com o crescente desenvolvimento de metodologia para identificação, isolamento, purificação e caracterização de antígenos dotados de importância imunológica. A pesquisa científica nesta área lida com grandes problemas relacionados com a complexa composição antigênica e com a plasticidade que envolve os vários estágios do ciclo de desenvolvimento do parasito. Uma visão supersimplificada da complexa composição antigênica do *T. cruzi* pode ser prontamente observada numa placa de imunoeletroforese, onde um soro de coelho hiperimune é deixado reagir com um extrato do parasito para formar uma gama de arcos de precipitação^{109, 111, 112}. Quais entre os componentes daquele mosaico são os antígenos importantes para evocação de respostas imunes humoral e celular? Esta questão continua a requerer muito trabalho nos laboratórios de pesquisas.

A análise imunoeletroforética de um extrato solúvel do *T. cruzi* mostrou 19 arcos de precipitação do antígeno por um soro polivalente de coelho imune¹¹². O antígeno do arco 5 é caracterizado por sua alta imunogenicidade e notável especificidade do *T. cruzi*, quando comparado com vários tripanosomatídeos *Salivaria* e outros *Stercoraria*¹¹³. Coelhos imunizados com o eluado do gel, onde o arco 5 foi encontrado pela imunoeletroforese bidimensional, forneceram um anti-soro monoespecífico que foi usado como imunoabsorvente após acoplamento à sefarose-CNBr ativada. Desta forma, o componente antigênico do arco 5 pode ser

purificado dos extratos de culturas de epimastigotas ou de tripomastigotas sangüícolas, em coluna de fase sólida com o imunoabsorvente. O eluado foi submetido a controles analíticos usando imunoeletroforese bidimensional, e preparações antigênicas puras foram usadas depois para a obtenção de anti-soro monoespecífico ¹¹³. Foi comprovado por microscopia de luz e eletrônica que o antígeno ⁵ é um constituinte importante da superfície celular e da membrana flagelar de formas do parasito ¹¹⁴. Os antígenos de superfície desempenham um papel importante na resposta imune do hospedeiro contra as infecções do parasito, mas o grau de imunidade contra o *T. cruzi* que se obtém com o antígeno 5 é desconhecido. Um anticorpo monoclonal da subclasse IgG1, específica para o componente 5 do parasito, foi obtido pela tecnologia do hibridoma ¹¹⁵. Todavia, as vantagens de tal anticorpo sobre o anti-soro monoespecífico, produzido por uma técnica simples, continuam sem ser conhecidas.

A extração a partir do *T. cruzi* de frações polissacárides contendo carboidratos foi inicialmente voltada para a caracterização das propriedades imunológicas ¹²¹⁻¹²⁴. Entretanto, maior atenção foi focalizada por último nos constituintes polissacárides do protozoário, porque se acreditava que eles induzem imunidade humoral e virtualmente nenhuma reação de imunidade celular. Emergiram evidências citoquímicas mostrando a localização na membrana de grupos reativos de carboidratos ¹²⁵, que facilitaram o isolamento e caracterização desses constituintes. Frações contendo polissacárides foram isoladas pela extração fenol-água e sua imunogenicidade foi mostrada após injetadas em coelhos ¹²⁶⁻¹²⁷. Os anti-soros resultantes foram usados para demonstrar a presença de antígenos polissacárides circulantes nos soros de camundongos com a infecção aguda pelo *T. cruzi* e nos soros de pacientes com a doença de Chagas aguda. A natureza desse antígeno circulante parece ser a mesma daqueles exoantígenos previamente encontrados nos soros de indivíduos infectados ¹²⁸⁻¹³², pois a mobilidade eletroforética de ambos foi similar e uma linha de precipitação pode ser observada após coloração para carboidrato. A análise química identificou galactose e manose como os açúcares neutros primários do material polissacáride ¹²⁶.

Outro componente foi isolado de extratos de *T. cruzi*, após tratamento fenol-água, que, após hidrólise ácida, forneceu aminoácidos e ácidos graxos, além de galactose e manose ¹³³. Este lipopeptidofosfoglican foi demonstrado em vesículas do *T. cruzi* ¹³⁴. Além disto, foi observado que um lipopolissacáride pode ser liberado de formas de cultura, após tratamento com EDTA ^{128, 135}. Parece que esses componentes do *T. cruzi* podem ser translocados do lado interno para o lado externo da membrana ^{128, 134, 136}. A relação entre o lipopeptidofosfoglican e lipopolissacáride e o antígeno circulante descrito acima ainda não é conhecida.

Também têm sido identificadas glicoproteínas na superfície do parasito, que foram isoladas e caracterizadas pelo emprego de radioiodi-

nação ou de marcadores biossintéticos ao lado de técnicas de imunoprecipitação. Uma glicoproteína maior foi identificada, pela iodinação com I¹²⁵ catalisada pela lactoperoxidase, na membrana de diferentes estágios do ciclo de vida do *T. cruzi*^{137, 138}. Esta glicoproteína foi isolada por cromatografia de afinidade usando *Lens culinaris*. O mapeamento peptídico feito por auto-radiografia de géis de eletroforese em poli(acrilamida)-SDS, mostrou um polipeptídeo de peso molecular relativo de 90 Kd. Além disso, esta glicoproteína da superfície celular foi encontrada em uma série de clones e estoques de *T. cruzi* de distintas regiões geográficas¹³⁸. Entretanto, diferenças na composição dos polipeptídeos de superfície foram encontradas entre formas sangüícolas e de cultivo do *T. cruzi*^{139, 140}. Enquanto os tripomastigotas sangüícolas, isolados de camundongos infectados, mostravam uma glicoproteína maior com massa relativa de 90 Kd, epimastigotas e metatripanosomas de culturas acelulares mostravam um componente de massa relativa de 75 Kd. De interesse, as formas do parasito sintetizavam suas glicoproteínas de superfície dentro de um período de 3 horas. Mais tarde elas puderam ser imunoprecipitadas com soro imune de homem ou de camundongo. Outras diferenças entre polipeptídeos da superfície de tripomastigotas do sangue e de formas de cultivo foram indicadas por seus pontos isoelétricos (pI 5,0 para o peptídeo 90 Kd e pI 7,2 para o de 75 Kd) e pela insensibilidade relativa do peptídeo menor ao tratamento com tripsina^{139, 140}.

A existência de antígenos específicos para os vários estágios de desenvolvimento foi inicialmente demonstrada por imunofluorescência, fixação do complemento e estudos de absorção usando epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*¹⁴¹⁻¹⁴³. Todavia, diferenças significativas entre componentes de membrana solubilizada de estágios específicos foram demonstradas nas formas do parasito radioiodinadas pela técnica da lactoperoxidase. Uma banda maior de 94 Kd foi encontrada no tripomastigota, mas foi difícil demonstrá-la na preparação de amastigota¹⁴⁴. Comparação entre três estoques diferentes mostrou discrepâncias entre tripomastigotas, mas não entre amastigotas e epimastigotas. Além disso, estudos de imunoprecipitação mostraram um grande número de antígenos expressos na superfície de amastigotas, menor número em epimastigotas e muito menos ainda em tripomastigotas¹⁴⁴. Outras diferenças foram encontradas que parecem refletir o repertório antigênico dos vários estoques de *T. cruzi* usado para radioiodinação ou marcação biossintética dos antígenos de superfície^{137-140, 144-146}. Por exemplo, contrastando com os resultados descritos acima, os tripomastigotas do estoque Y parecem possuir mais antígenos de superfície do que as formas epimastigotas^{139, 144}.

A composição antigênica dos tripomastigotas metacíclicos infectantes que passam nas fezes do inseto-vetor parece ser de grande importância na imunoprofilaxia, mas há muito pouco a falar nesta área da pesquisa.

Ter-se-ia de considerar a dificuldade em obter os verdadeiros metacíclicos das fezes do barbeiro para entender a pobreza da informação a respeito deste estágio de desenvolvimento do *T. cruzi*. Ainda assim, os poucos estudos encontrados na literatura dizem respeito a experimentos em que as formas metacíclicas de culturas acelulares foram usadas^{111, 140, 145}. Esses estudos mostram diferenças antigênicas entre tripanossomos metacíclicos de vários estoques^{140, 145}. Além disso, contra-imunoelektroforese revelou que metacíclicos ou epimastigotas podem ter pelo menos quatro antígenos que não parecem ser compartilhados pelo outro, enquanto oito ou nove antígenos presentes nessas formas não são detectados nos extratos de tripomastigotas¹¹¹.

Glicoproteínas estágio-específicas foram identificadas na superfície do *T. cruzi* através do uso de anticorpos monoclonais secretados por linhagens de células híbridas produzidas pela fusão de células de mieloma com linfócitos esplênicos obtidos de camundongos imunizados com antígenos de epimastigotas. Uma glicoproteína de massa relativa 72 Kd foi reconhecida por um anticorpo monoclonal e sua análise, após purificação por cromatografia de afinidade, revelou um conteúdo de carboidrato de 52 por cento, o qual era composto de fucose, xilose e ribose, além de glucosamina, manose, galactose e glucose¹⁴⁷. Esta glicoproteína era estágio-específica mas não era estoque-específica. Foi proposto que a glicoproteína 72 Kd pode desempenhar um papel na regulação da morfogênese do parasito¹⁴⁴. A diferenciação de epimastigota para tripomastigota foi inibida pela interação com o anticorpo monoclonal específico para a glicoproteína 72 Kd^{148, 149}. Sabe-se, entretanto, que estoques e clones de *T. cruzi* diferem em sua expressão desse antígeno de superfície e, portanto, seu papel na diferenciação celular requer mais informação. Outros antígenos estágio-específicos têm sido demonstrados por anticorpos monoclonais contra epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas^{150, 151}. Existe, pois, a possibilidade de que componentes antigênicos menores desempenhem papel importante na resposta imune contra o *T. cruzi*¹⁵¹, mas muitas dificuldades relacionadas ao reconhecimento molecular têm colocado sérias dúvidas, por exemplo, o uso de anticorpos monoclonais como únicos indicadores de identidade molecular¹⁵².

As lecitinas têm desempenhado um papel importante como marcadores para as cadeias de polissacarídes dos antígenos. Desde que formas do *T. cruzi* foram submetidas à aglutinação pela concanavalina A¹⁵³, receptores de lecitinas na superfície da célula foram identificados e frações antigênicas foram isoladas pelo uso de lecitinas imobilizadas^{137, 154}. Entretanto, não se observou qualquer relação entre a capacidade de aglutinação de um painel de lecitinas e a origem geográfica dos parasitos. Além disso, o uso de lecitinas não permitiu distinguir entre o *T. cruzi* e estoques de protozoários de classificação incerta¹⁵⁵. Portanto, parece que essa metodologia é uma ferramenta útil em cromatografia de afinidade,

mas ela pode não ser suficiente para avançar na caracterização dos antígenos de formas do ciclo evolutivo de estoques do *T. cruzi*.

Ainda permanece para ser discutida aqui a questão relacionada com a significação prática ou as diferenças antigênicas estágio-específicas entre as formas evolutivas do ciclo de vida do parasito. Uma abordagem desta questão leva imediatamente ao exame do ciclo de vida do parasito no vetor e no hospedeiro vertebrado. No hospedeiro mamífero, amastigotas intracelulares transformam-se em tripomastigotas passando através de um estágio epimastigota intermediário. Todas essas formas do parasito estão presentes no inseto-vetor. Por outro lado, se as diferenças antigênicas de importância imunológica existem entre tripanossomos metacíclicos no inseto-vetor e tripomastigotas sangüícolas no hospedeiro mamífero, essas diferenças precisam ser elucidadas. Que os antígenos espécie-específicos (não os estágio-específicos) são os principais responsáveis pelas respostas imunes, levando à imunidade não-estéril observada nas infecções pelo *T. cruzi*, pode ser observado na existência de imunidade cruzada entre estoques dos parasitos de diferentes origens e ganha mais apoio no fato de que a resistência parcial contra infecções experimentais podem ser induzidas por antígenos de qualquer forma evolutiva do parasito.

H – RELAÇÕES PARASITO/HOSPEDEIRO

1. Adaptação, resistência e susceptibilidade

Vários padrões de relações parasito/hospedeiro podem ser observados entre as várias classes de mamíferos que podem adquirir infecções pelo *T. cruzi* na natureza, ou através de inoculações no laboratório. Em geral, animais silvestres que têm habitado o Novo Mundo desde os dias pré-colombianos podem servir como reservatórios do *T. cruzi* e freqüentemente mostram um grau considerável de adaptação à infecção. Exemplos típicos desta situação são encontrados em tatus, raposas e preguiças^{8, 10, 15, 16}. Um firme equilíbrio parasito/hospedeiro é usualmente encontrado, o que resulta na ausência de dano a esses animais a despeito de que parasitemias patentes de longa duração são usualmente vistas. Todavia, parece existir uma exceção entre os primatas, Rhesus, Cebus e outras espécies de macacos, que têm sido suspeitados de desenvolver a doença de Chagas após a aquisição de infecções pelo *T. cruzi* *in natura*.

Por outro lado, uma ampla variação de relações parasito/hospedeiro pode ser distinguida entre os indivíduos introduzidos no Novo Mundo durante a civilização pós-colombiana, em quem nem sempre é encontrado o equilíbrio parasito/hospedeiro¹. Esta situação é melhor exemplificada nos colonos de origens européia e africana, e em seus animais domésticos trazidos para o Continente Americano. Vários graus de resistência e/ou susceptibilidade podem ser observados. Humanos e coelhos são muito

resistentes e usualmente sobrevivem às infecções agudas pelo *T. cruzi*, enquanto gatos e cães são geralmente muito sensíveis e usualmente morrem da infecção aguda⁵⁴. Em conjunto, os padrões de relações parasito/hospedeiro que têm sido observados são sugestivos de que uma seleção natural teria permitido a adaptação do protozoário em animais silvestres, que teria acontecido desde épocas imemoriais e continuaria em indivíduos introduzidos no Novo Mundo. Em favor deste postulado está a observação de que existem diferentes padrões de transmissão pelo vetor e de adaptação do *T. cruzi* em populações que vivem em áreas endêmicas, nas quais três coortes podem ser distinguidos: 1) indivíduos que dificilmente adquirem a infecção transmitida pelo vetor; 2) indivíduos que adquirem a infecção mas não morrem de doença de Chagas; e 3) indivíduos que adquirem a infecção pelo *T. cruzi* e morrem de doença de Chagas. Os indivíduos no primeiro grupo se comportam similarmente à população ameríndia e escapam à infecção. Certamente, os indivíduos do segundo grupo parecem estar melhor adaptados às infecções pelo *T. cruzi* do que aqueles no terceiro grupo.

2. Base genética.

A herança genética de parasitos e hospedeiros têm, definitivamente, a maior importância no controle de múltiplos fatores que modulam as relações parasito/hospedeiro. Muitos experimentos neste campo da pesquisa foram feitos com estoques de parasitos de grande heterogeneidade, e esta, *per se*, pode influenciar a evolução das infecções. Ainda que verdadeiras cepas de *T. cruzi* não tenham sido caracterizadas, espera-se que no futuro os clones obtidos no laboratório sejam definidos pelo encontro de um ou mais caracteres estáveis^{110, 156}.

Os estudos sobre as bases genéticas da resistência foram iniciados quando foram observadas variações na susceptibilidade de cepas de camundongos isogênicos ao *T. cruzi*¹⁵⁷. Diferentes susceptibilidades às infecções agudas foram determinadas em nove cepas isogênicas de camundongos¹⁵⁸. Enquanto uma cepa altamente susceptível (C3H) desenvolvia alta parasitemia e morria, cepas altamente resistentes (C57B2/10) desenvolviam parasitemias baixas e sobreviviam. Entretanto, as relações entre parasitemia e sobrevivência não estavam claras¹⁵⁹. Em algumas cepas de camundongos isogênicos, capazes de controlar a parasitemia e sobreviver, as respostas imunes parecem estar associadas à resistência inata. As diferenças em susceptibilidade não estavam relacionadas ao complexo maior de histocompatibilidade (H-2), onde se localizam os genes da resposta imune. Camundongos congênicos, que diferiam em uma região H-2, não mostravam diferenças nos níveis de parasitemias durante as infecções¹⁶⁰. Ademais, foi mostrado que a resistência parece estar sob o controle de múltiplos fatores genéticos

herdados de maneira dominante e diferentes genes parecem ser responsáveis pela resistência, pelo menos em algumas cepas de camundongos^{159, 160}. Também, vários graus de susceptibilidade ficaram aparentes entre oito cepas isogênicas de ratos. As diferenças não estavam relacionadas ao haplotipo Rt-1. Além do mais, os níveis de parasitemias observados não correlacionavam com a sobrevivência do hospedeiro. Este fato tornou-se evidente porque hospedeiros F344 machos e fêmeas foram similarmente susceptíveis ao *T. cruzi*, mas somente as fêmeas sobreviveram¹⁶¹. Por último, já foi mostrado que a resistência contra infecções de humanos pelo *T. cruzi* não está associada com qualquer haplotipo HLA particular.

3. Imunidade *in vivo*

Animais poicilotérmicos não abrigam *T. cruzi* por longos períodos de tempo. Foi descrito há muitos anos que alguns répteis (*Tropidurus torquatus*, *Ameiva surinamensis*) e anfíbios (*Leptodactylus ocellatus*, *Bufo crucifer*) não fornecem infecção patente após injeção subcutânea de formas tripomastigotas do sangue^{163, 164}. Entretanto, as lagartixas (*Gerrhonotus multicarinatus* e *Cnemidophorus tigris multiscutatus*) tornaram-se infectadas após receberem por via oral formas metacíclicas presentes em material fecal de triatomíneos, e permaneceram infectantes quando alimentaram triatomíneos não-contaminados, criados no laboratório, no período compreendido entre a primeira e a décima semana pós-infecção⁶. Parece que tripomastigotas do sangue não são infectantes para as lagartixas venezuelanas (*Tropidurus hispidus*, *Ameiva ameiva*, *Cnemidophorus lemniscatus*, *Polychrus marmoratus* e *Phyllodactylus ventralis*), que podem ser infectadas de outra forma, com epimastigotas ou com tripomastigotas de cultura de tecido de lagartixa, após pré-tratamento com droga imunossupressiva⁷. Infecções crípticas são a regra. Ainda que os parasitos não sejam vistos nos tecidos, camundongos inoculados com sangue ou homogenados de tecidos de lagartixas infectadas tornaram-se infectados^{6,7}.

Os fatores responsáveis pela resistência natural de animais poicilotérmicos à infecção são parcialmente conhecidos. Parasitos extracelulares são vistos no fluido peritoneal de lagartixas até 24 horas após inoculação e amastigotas intracelulares são vistas em poucos macrófagos 48-72 horas mais tarde⁷. Parece que os parasitos intracelulares não se multiplicam, sugerindo um microambiente inadequado. A ação de macrófagos de animais de sangue-frio no *T. cruzi* é desconhecida³⁹. Todavia, já foi mostrado que soros de rãs e sapos têm efeito lítico sobre tripomastigotas metacíclicas¹⁶⁴. Desde que algumas espécies de lagartixas tornaram-se particularmente adequadas para infecções pelo *T. cruzi* após imunossupressão, o papel que as respostas imunes têm na resistência natural de vertebrados de sangue-frio contra o *T. cruzi* necessita mais investigações.

As aves são notoriamente refratárias ao *T. cruzi* e sua resistência natural aparece durante a eclosão^{165, 166}. É possível estabelecer a infecção somente durante a vida embrionária de aves. A refratariedade das aves pode estar relacionada aos efeitos da alta temperatura corporal (a temperatura da cloaca da galinha é de 41-42°C)¹⁶⁷. É bem conhecido que o *T. cruzi* requer certa faixa de temperatura para sobreviver e o parasito tende a reduzir sua multiplicação *in vitro* quando é mantido acima de 38°C¹⁶⁸. Também é conhecido o efeito da temperatura em culturas parasitadas de músculos estriados. A incubação durante a noite a 41.5°C resultou na morte de todas as formas do parasito (nossas observações não-publicadas).

Em adição, a resistência de aves ao *T. cruzi* parece estar relacionada com a atividade do complemento do soro, capaz de lisar as formas tripomastigotas infectantes^{169, 170}. Em decorrência do encontro de anticorpos heterófilos, reativos contra o *T. cruzi*, no soro de galinhas normais, pensou-se que o parasito seria lisado através da ativação do complemento pela via clássica, desencadeada por complexos antígeno-anticorpo. Entretanto, uma série de experimentos demonstrou a irrelevância de anticorpos naturais para a lise *in vitro* do *T. cruzi* e mostrou a importância da via alternativa de ativação do complemento para a resistência de aves contra a infecção¹⁷⁰. Ainda que imunoglobulinas de mamíferos não pareçam ativar o complemento de aves, esta possibilidade foi completamente excluída por experimentos feitos com formas tripomastigotas obtidas de camundongos letalmente irradiados ou de culturas de células, nas quais os anticorpos específicos não estão presentes. O tratamento desses tripomastigotas com soro de galinha agamaglobulinêmica resultou em lise. A reação lítica foi inibida pela decomplementação do soro de galinha com fator veneno de cobra, pela inativação dos fatores do complemento sérico a 56° por 30 minutos e pela quelação do cálcio e magnésio com EDTA. Todavia, a lise ainda era observada na presença de íons de magnésio, após remoção do cálcio com EDTA. Dessa forma, lise dos tripomastigotas do sangue foi dependente da ativação do complemento pela via alternativa, que requer íons de magnésio, sem requerer a ativação da via clássica, que depende de íons de cálcio e de magnésio. Depleção do complemento com fator veneno de cobra prejudicou consideravelmente a resistência de galinhas agamaglobulinêmicas ao *T. cruzi*. Parasitos que desapareciam em seis minutos ou menos, passaram a tomar várias horas até alcançar níveis não-detectáveis no sangue das aves com depleção do complemento¹⁷⁰.

Mamíferos de várias classes são freqüentemente susceptíveis ao *T. cruzi*, ainda que vários graus de resistência natural possam se manifestar. Diferentes fatores têm sido implicados na resistência inata. Tem sido descrito que camundongos infectados com vários protozoários apresentam aumento da produção de interferon, um agente que pode ser

secretado por fagócitos mononucleares e outros tipos de células, que regulam divisão e crescimento celulares, e parece modular a resposta imune^{171, 172}. Camundongos com infecção aguda pelo *T. cruzi* mostram níveis séricos elevados de interferon, que é termolábil, resistente a pH ácido, sensível a tripsina e a actinomicina D e pode ser inativado pelo anticorpo específico. Alfa e beta interferon não afetam diretamente a viabilidade do *T. cruzi*, motilidade, infectividade e virulência. Entretanto, camundongos que receberam injeções diárias de interferon exógeno tiveram a resistência aumentada, quando comparados com os animais infectados que receberam uma preparação placebo faltando a atividade do interferon. Também, tem sido descrito que alfa e beta interferon estimulam a fagocitose e ativam macrófagos^{172, 173}.

Ademais, o produto sintético hidrocloreto de tilerone, que é indutor de interferon, tem sido usado como meio de exploração dos mecanismos naturais de resistência. Administração de tilerone a camundongos C57/BL/6J resultou na sobrevivência de 50 por cento dos camundongos tratados, enquanto os animais não-tratados morriam dentro de 30 dias de infecção aguda¹⁷³. Os níveis de interferon sérico pareceram correlacionar de maneira significativa com a atividade das células esplênicas NK (*natural killer*). O papel das células NK na resistência foi examinado em camundongos deficientes em células NK e em seus heterozigotos fenotipicamente normais (bg +)¹⁷³. Pareceu que a atividade das células NK, induzidas pelo interferon, pode participar no mecanismo de resistência contra infecções pelo *T. cruzi* em camundongos. Nesse estudo o tratamento com tilerone pareceu aumentar a sobrevivência nos animais heterozigotos fenotipicamente normais, em comparação aos homozigotos deficientes em células NK¹⁷³. Também, verificou-se que camundongos tratados com o ácido poliinosinicocitodílico (poli-IC) ou infectados com *T. cruzi* aumentaram a atividade de células NK em vários órgãos e na cavidade peritoneal e isso parecia correlacionar-se com a habilidade de destruir as formas do parasito¹⁷⁴. Nesses experimentos, antes de acrescentar os parasitos nos ensaios citotóxicos, populações de células não-aderentes foram tratadas com complemento, com anti-soro contra o antígeno NK 1.2 mais complemento, ou com anti-soro contra o antígeno Thv 1.2 mais complemento. A atividade citotóxica contra o *T. cruzi* foi eliminada apenas quando as células esplênicas ou peritoneais de camundongos estimulados com poli-IC foram tratadas com anti-soro contra antígeno NK 1.2 mais complemento. Portanto, os elementos com atividade citotóxica aumentada contra o protozoário nesses ensaios *in vitro* pareceram ser células NK típicas¹⁷⁴. O mecanismo pelo qual células NK destroem *T. cruzi* ainda é obscuro e a contribuição atual dessa população de células para a resistência natural permanece desconhecida. Ademais, atividade aumentada de células NK contra células tumorais YAC foi encontrada em cepas de camundongos resistentes e susceptíveis ao *T.*

cruzi. Esse fenômeno e a resistência fenotípica em camundongos mutantes que mostram caracteristicamente uma resposta NK baixa durante a infecção parecem não favorecer a possibilidade de que as células NK exerçam alguma influência na resistência contra o *T. cruzi*^{175, 176}.

Todo um grupo de evidências laboratoriais mostram que o mais importante mecanismo natural de defesa contra *T. cruzi* parece ser a fagocitose, que ocorre inicialmente no sítio de entrada do parasito no corpo. Assim, quando as formas do parasito de baixa virulência são injetadas em camundongos não-imunes, eles são largamente destruídos no sítio de inoculação. Por outro lado, formas do *T. cruzi* altamente virulentas multiplicam-se em macrófagos por divisão binária e, ainda que muitos sejam destruídos nas células fagocíticas, alguns transformam-se em tripomastigotas que escapam e infectam outras células^{177, 178}. Macrófagos normais podem controlar uma infecção na proporção de 1:1 (parasito para célula hospedeira), mas podem ser destruídos *in vitro* em face de uma infecção na proporção 10:1^{179, 180}. Observações ao microscópio eletrônico mostraram os organismos invasores em vacúolos fagocíticos, muito embora amastigotas em divisão possam permanecer livres no citoplasma da célula hospedeira. Seria concebível que a sobrevivência imediata do *T. cruzi*, após sua captura pelos macrófagos, no ponto de entrada, possa estar relacionada a sua habilidade de escapar dos fagolisossomos para o citoplasma, onde os macrófagos são desprovidos de mecanismo específico de destruição do parasito¹⁸¹. Macrófagos normais podem, portanto, se prestar a infecções com tripomastigotas e são capazes de manter o crescimento de amastigotas virulentos intracelulares. Entretanto, uma significativa resistência de macrófagos contra o *T. cruzi* pode ser induzida pelo dipeptídeo muramil, possivelmente devido à capacidade da droga induzir a ativação da célula fagocítica. Esse glicopeptídeo ocorre naturalmente como um componente da parede celular de uma variedade de microorganismos e tem sido reconhecido como um potente adjuvante^{182, 183}.

4. Imunidade adquirida

Em adição aos fatores envolvidos na resistência natural descrita nas páginas precedentes, as evidências existentes não deixam dúvida de que um grau considerável de resistência adquirida surge após a infecção pelo *T. cruzi* em alguns hospedeiros vertebrados. Ainda que as evidências sejam muito limitadas a observações em humanos e alguns animais de laboratório, têm sido aceito unânimemente que esses hospedeiros vertebrados, sobreviventes de infecções agudas pelo *T. cruzi*, não passam por uma nova fase aguda, se reinfectados, em conseqüência do nível significativo de imunidade adquirida. Entretanto, tem sido mostrado que os animais imunizados podem ser prontamente reinfectados com formas virulentas, do *T. cruzi*, a despeito de que as parasitemias patentes, pelos organismos

do desafio, sejam usualmente mais baixas e de menor duração do que aquelas determinadas pelas infecções primárias¹⁶⁷. O papel da resistência adquirida nas infecções pelo *T. cruzi* será considerado aqui no contexto de uma imunidade não-estéril resultante. Mais adiante o leitor será informado da importância da imunidade adquirida na imunopatologia da doença de Chagas. Nesse ínterim, nós trabalharemos com aqueles mecanismos imunes diversos que induzem graus significantes de proteção contra as infecções pelo *T. cruzi*.

a) *Imunidade humoral.*

A imunogenicidade do *T. cruzi* tem sido demonstrada em diferentes espécies de animais. Para efeito de comparação, foi feito um estudo para avaliar a resposta imunitária humoral em frangos, refratários à infecção, em coelhos altamente resistentes ao parasito e em gambás, que são reservatórios naturais e, como tais, acredita-se que estejam adaptados a sobreviver às infecções pelo *T. cruzi*, por meio de um equilíbrio parasito/hospedeiro bem balanceado. Obtiveram-se, similarmente, respostas qualitativas positivas contra as preparações antigênicas usadas em todas as espécies de animais, e também em anti-soros humanos testados por hemaglutinação indireta e por imunodifusão¹⁸⁴.

Os títulos mais elevados de anticorpos humorais são detectados no soro durante a fase aguda da doença de Chagas, quando grande número de parasitos estão circulando no sangue¹⁶⁷. Esses anticorpos têm sido estudados nas infecções agudas humanas, onde dentro de um período de 2-3 meses eles são principalmente do tipo IgM^{185, 186}, muito embora anticorpos das classes IgG e IgA também estejam presentes. Picos de anticorpos IgM não são detectados na fase crônica das infecções, na qual as imunoglobulinas específicas são principalmente IgG, ainda que títulos baixos de IgA sérica possam estar presentes em alguns pacientes crônicos^{167, 185, 187}.

O papel da imunidade humoral na resistência do hospedeiro ainda continua controverso^{167, 188}, mas todo um corpo de informações trazido para a literatura nos últimos cinco anos têm mostrado que os fatores humorais participam na resistência de várias formas. Ainda que o *T. cruzi* circule transientemente no sangue de animais hiperimunizados, existe sempre a possibilidade de escapar da lise imune pela entrada numa célula hospedeira, onde ele parece ser inacessível aos fatores humorais. Exames feitos de rotina em pacientes de áreas endêmicas mostram ocasionalmente tripomastigotas no sangue. Essas formas do parasito permanecem vivas no sangue contendo títulos altos de imunoglobulinas específicas e fatores líticos do soro, por longos períodos de tempo. De fato, a sobrevivência do *T. cruzi* em sangue citratado mantido no refrigerador por muitos dias ou semanas possibilita sua transmissão pela transfusão⁴³.

Multiplicação de tripomastigotas no soro de pacientes com títulos altos de anticorpos IgM ou IgG e até 200 unidades hemolíticas CH_{50} de complemento têm sido olhada com atenção sob observação direta ao microscópio. Estudos ao microscópio eletrônico usando anticorpos específicos acoplados à ferritina mostraram as partículas elétrondensas ligadas à membrana do parasito, em vacúolos fagocíticos e dentro de fagolisossomos, onde eles podem ser degradados até aminoácidos¹⁸² (Fig. 4). Endocitose de constituintes do meio é um mecanismo normal de nutrição pelo *T. cruzi*^{1, 190-192}. Sabe-se também que qualquer célula viva pode endocitar moléculas aderidas em sua membrana¹⁹³⁻¹⁹⁶. A interiorização de anticorpos específicos já foi demonstrada em *T. lewisi*¹⁹⁷. Ainda permanece para ser demonstrado se este fenômeno ocorre ao acaso ou, consistentemente, em taxa elevada, de acordo com a disponibilidade de nutrientes. A interiorização de moléculas de anticorpo pelo *T. cruzi* serviria duas funções distintas: 1) Nutrição; 2) Mecanismo de escape. Ambas as funções parecem ser relevantes para a sobrevivência imediata do parasito. O papel desempenhado pela endocitose de imunoglobulinas como um meio pelo qual *T. cruzi* escapa da resposta imune humoral do hospedeiro requer avaliação.

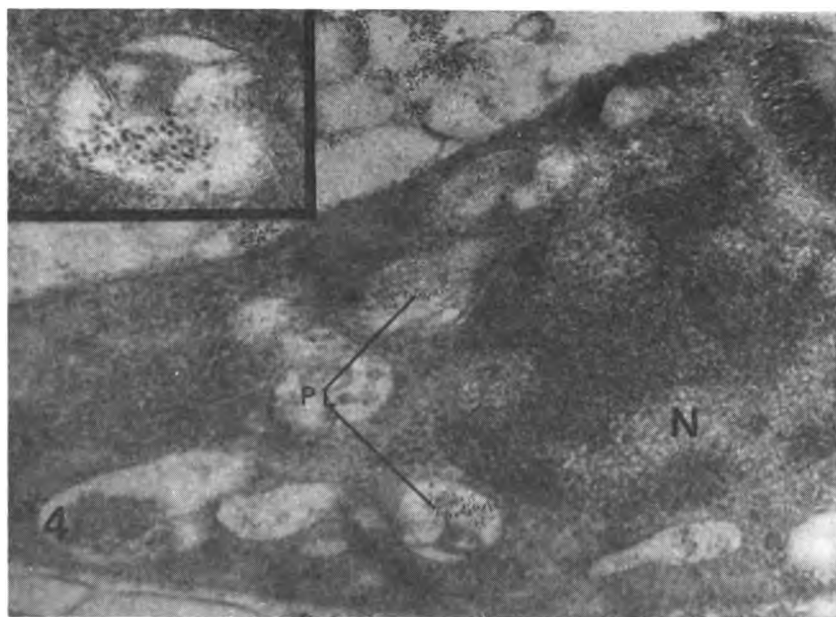


Fig. 4. Secção de um *Trypanosoma cruzi* após 30 minutos de encubação com anti-IgG humana conjugada com ferritina. Note os grânulos de ferritina dentro de muitos fagolisossomos. N: núcleo; Pl: fagolisossomos; K: cinetoplasto. No detalhe observam-se grânulos de ferritina dentro de um fagolisossomo em alta magnificação. (Reproduzido de Abelha, J. e cols., ref. 189).

A ação dos anticorpos humorais específicos foi parcialmente caracterizado *in vitro* contra diferentes componentes do corpo do parasito. Todos anticorpos anti-*T. cruzi* sensibilizaram hemácias de carneiro, mas a capacidade fixadora do complemento dos anticorpos antiflagelar e anticitosol foram mais altas do que a dos anticorpos antimicrosoma. O anticorpo antiflagelar foi particularmente eficiente na neutralização de tripomastigotas do sangue de camundongos¹⁹⁸. O papel das diferentes classes de anticorpos na proteção contra a infecção pelo *T. cruzi* têm sido estudado no camundongo. O pré-tratamento de camundongos normais com imunoglobulinas isólogas IgM, IgG, IgG1 ou IgG2 + IgG3, obtidas de soros imunes, mostraram que os anticorpos protetores são principalmente IgG2, particularmente da subclasse IgG2b. IgM e IgG1 tiveram pouca ou nenhuma proteção¹⁹⁹. Foi sugerido que a resposta de IgG que aparece no hospedeiro durante o período prepatente da infecção é importante para a proteção²⁰⁰.

Tem sido mostrado que soros imunes de uma variedade de mamíferos podem ter algum efeito protetor contra infecções pelo *T. cruzi*^{167, 168}. Por exemplo, soros imunes de animais com doença de Chagas crônica aglutinam tripomastigotas do estoque Y e sua infectividade fica diminuída quando eles são inoculados em camundongos normais. Entretanto, os tripomastigotas do estoque CL nem aglutinam, nem sua infectividade fica diminuída após a incubação com soros imunes²⁰¹. Que a capacidade formadora de anticorpos e os próprios anticorpos são mecanismos importantes de resistência ficou demonstrado nos camundongos Biozzi bons e maus respondedores. Encontrou-se que camundongos maus formadores de anticorpos são mais susceptíveis à infecção do que camundongos com alta capacidade de formar anticorpos. Havia uma correlação entre a capacidade de formar anticorpos e a resistência às infecções com os estoques Y ou Tulahuén do *T. cruzi*. Foi interessante anotar que, embora a sobrevivência dos camundongos maus formadores de anticorpos à infecção desafiante não era melhorada pela imunização profilática, eles eram protegidos pela transferência passiva de soro imune²⁰². O papel da resposta imunitária humoral na proteção foi também avaliado em camundongos congenitamente atímicos, que são deficientes no seu compartimento de células T e são hipersusceptíveis à infecção pelo *T. cruzi*²⁰³. Camundongos atímicos, que receberam profilaticamente soros imunes, tiveram as parasitemias e a mortalidade retardadas, quando comparados com animais-controle injetados com soro de camundongo normal, nos quais as parasitemias eram precoces e a mortalidade elevada. O papel protetor da imunidade humoral na resistência do hospedeiro contra infecções pelo *T. cruzi* pode ser particularmente enfatizado nesses experimentos porque o parasito causa uma doença rapidamente fatal em camundongos atímicos deficientes em células T²⁰⁴. Por outro lado, supressão da síntese de imunoglobulina por

injeções de anticorpo antiimune no período neonatal têm resultado em aumento de susceptibilidade. Esse tratamento resulta em deficiência de linfócitos B com diminuição da produção de anticorpos, onde houve depressão seletiva da síntese de IgG e IgG2a²⁰⁵.

A natureza da imunidade contra o *Trypanosoma cruzi* foi estudada em camundongos que se recuperaram de uma infecção aguda²⁰⁶. Soros imunes ou células esplênicas de camundongos que tinham vencido a fase aguda da infecção fizeram com que camundongos normais ficassem resistentes contra um desafio letal com *T. cruzi* virulento do estoque Y. Uma resposta anamnésica foi produzida pela encubação de formas epimastigotas congeladas-descongeladas com células imunes, e os anticorpos resultantes conferiram proteção aos recipientes normais. Remoção dos linfócitos B por filtração através de uma coluna de anti-Ig aboliu a habilidade das células esplênicas transferirem a imunidade. A depleção de linfócitos T pelo tratamento com anti-Thy 1.2 mais complemento reduziu um pouco a resposta do anticorpo. Portanto, parece que algum grau de imunidade protetora em camundongos convalescentes das infecções pelo *T. cruzi* foi provavelmente mediada por linfócitos B, enquanto o envolvimento dos linfócitos T foi restrito a um papel auxiliar²⁰⁶. Assim, linfócitos T auxiliares, parasito-específicos, foram prontamente induzidos durante as infecções pelo *T. cruzi* em camundongos. Sensibilização e resposta dos linfócitos T ao *T. cruzi* foi detectada precocemente e era mantida durante toda a infecção. A atividade da célula T auxiliar parasito-específica pode ser aumentada em camundongos infectados, e as células T auxiliares interagiram com linfócitos B para induzir a resposta de anticorpos²⁰⁷.

Os estudos iniciais sobre a resposta imune-humoral nas infecções pelo *T. cruzi* mostraram a ocorrência de anticorpos “naturais” nas fases aguda e crônica das infecções²⁰⁸⁻²¹⁴. Esses anticorpos naturais ou heterófilos podem reagir contra constituintes próprios de células ou estruturas teciduais. Usualmente, os níveis de anticorpos heterófilos acompanham os níveis de parasitemias na fase aguda da infecção em camundongos. Por último, foi mostrado que a ativação policlonal que ocorre durante as infecções pelo *T. cruzi* pode ser acompanhada de aumento dos níveis de colônias formadoras de placas não-específicas, contra antígenos heterólogos ou auto-antígenos, e isso guarda paralelismo com o número de células no baço durante um período de acentuada esplenomegalia²¹⁵. O número de células produtoras de imunoglobulinas no baço, durante o curso da infecção, correlaciona-se com a cinética da produção de anticorpos contra o *T. cruzi*. Essas observações sugerem que a especificidade das células produtoras de imunoglobulinas podem não ser o resultado de uma exaustiva ativação policlonal de células B. Portanto, se a ativação policlonal ocorre durante a infecção pelo *T. cruzi*, ela poderia interferir de maneira limitada na produção de imunoglobulinas especí-

ficas²⁰⁷. Assim, mostrou-se que algumas alterações nas populações de células esplênicas podem correlacionar com a capacidade de resposta à estimulação antigênica. A despeito de que os números de linfócitos B diminuíram acentuadamente durante a infecção aguda pelo *T. cruzi* em camundongos, o percentual de células T permaneceu relativamente inalterado, enquanto o número de macrófagos aumentou várias vezes²¹⁶. Existe, pois, a possibilidade de que alterações na proporção de células B, células T e macrófagos, durante a infecção, possam afetar a resposta imunitária humoral de hospedeiros imunizados contra estimulação antigênicas. Por outro lado, a habilidade de produzir respostas primárias de anticorpos não-específicos durante infecções agudas pelo *T. cruzi* em camundongos parece correlacionar com o grau de resistência do hospedeiro. Em contraste, a descrição da relação de susceptibilidade com níveis altos de anticorpos heterófilos, a alta resistência contra as infecções pelo *T. cruzi*, correlaciona-se com uma resposta aumentada de anticorpos contra hemácias de carneiro, e a inibição dessa resposta correlaciona-se com maior susceptibilidade²¹⁷.

Tripomastigotas derivados de sangue de camundongos com a infecção aguda são revestidos com imunoglobulinas que podem ser visualizadas pelos testes de imunofluorescência²¹⁸. Os anticorpos ligados à membrana do parasito induzem mobilidade dos antígenos de superfície. Verificou-se que os antígenos na superfície dos tripomastigotas apresentam mobilidade e coalescem formando agregados únicos ou múltiplos na superfície, após encubação com soro imune²¹⁹⁻²²⁰. Ademais, a agregação dos antígenos de superfície pela ligação com os anticorpos específicos usualmente forma uma capa na extremidade posterior do parasito. Esse fenômeno é dependente do estoque e do estágio do parasito. Fica, então, a possibilidade de que a mobilidade dos antígenos de superfície, induzida pelo anticorpo, torna parte da população de *T. cruzi* resistente à lise mediada pelo complemento^{218, 219}. Que os estoques Y, CL e outros mostram ampla variação de susceptibilidade aos componentes do complemento foi demonstrado em vários experimentos²²¹⁻²²⁵.

Existem duas vias principais de ativação do complemento, conhecidas como via clássica e via alternativa. Pelo menos 11 componentes séricos estão envolvidos na ativação do sistema do complemento. C1, C2 e C4 são as primeiras proteínas a reagirem na via clássica; properdina e outros fatores presentes na superfície do parasito podem ativar o sistema do complemento através da via alternativa. C3, C5, C6, C7, C8 e C9 são as proteínas da via final comum, que são ativadas toda vez que as proteínas que iniciam as reações, pela via clássica ou alternativa, levam à reação em cascata. Mostrou-se que a depleção do complemento com veneno de cobra causa grande exacerbação da parasitemia em camundongos infec-

tados pelo *T. cruzi*. Mortalidade precoce foi observada em camundongos infectados e de complementados, quando comparada com a mortalidade dos animais não-tratados. A lise *in vitro* de tripomastigotas sangüícolas do estoque Tulahuén foi obtida quando soros imunes de pacientes, e de camundongos, ou soluções contendo gamaglobulina imune e uma fonte de complemento ativo eram usados. Os fatores do complemento pareceram ser ativados tanto via clássica como pela via alternada, durante a lise imune das formas do sangue do *T. cruzi*, produzida pelo soro humano. Quando foi usado soro de camundongo, a ativação seguia pela via alternativa²²². Em outro estudo mostrou-se que com o uso de soros de camundongos imunizados com formas mortas de cultivo dos estoques Y e Tulahuén houve efeito lítico cruzado nas formas tripomastigotas de ambos os estoques, enquanto os soros de camundongos normais não mostravam o efeito lítico. Nesses experimentos, a lise imune ocorreu sob condições que não requeriam íons cálcio e, portanto, a ativação do complemento pode ter seguido a via alternativa²²³. Entretanto, os estoques Y, CL e outros mostraram diferentes susceptibilidades à lise. Por exemplo, soro humano normal, fresco, lisou tripomastigotas do sangue de camundongos com infecções agudas pelos estoques Y e B, mas não pelo estoque CL. A lise pareceu ser mediada pela ativação do complemento tanto pela via clássica como alternativa e o efeito lítico foi induzido por anticorpos específicos ligados à superfície das formas tripomastigotas usadas. Foi de interesse particular a observação de que os tripomastigotas CL ligados às imunoglobulinas específicas não foram lisados pelo complemento de camundongo ou humano²²⁴. Também foi mostrado que tripomastigotas Y gradualmente perdiam a susceptibilidade à lise após encubação a 37° C por 1 hora. Quando esses parasitos foram reincubados com soro imune ocorreu lise. Esses resultados sugerem que lise do *T. cruzi in vitro* pode ocorrer sob certas condições que podem não existir no hospedeiro mamífero.

O papel que a lise mediada pelo complemento desempenha na resistência do hospedeiro foi ensaiado em outros experimentos que mostraram que a infecção pelo *T. cruzi* em uma cepa (B10.D2/old) geneticamente deficiente em C5 tem parasitemia igual ou mais baixa quando comparada àquela vista em uma cepa congênita normocomplementêmica (B10.D2/new). Essa observação foi confirmada em cobaias normocomplementêmicas e em cobaias deficientes em C4 que não produzem lise através da via clássica da ativação do complemento. Infecções pelo *T. cruzi* em ambas as cepas de cobaias não mostram qualquer diferença significativa na persistência de infecções subpatentes, ou taxas de mortalidade. A via clássica não pareceu ser ativada durante as infecções pelo *T. cruzi* em cobaias. Em conjunto, esses experimentos indicam que a lise mediada pelo complemento não têm um papel significativo na resposta do hospedeiro contra o *T. cruzi*²²⁵.

Redução dos níveis de complemento sérico foi consistentemente monitorada em duas cepas de camundongos que diferiam em susceptibilidade no *T. cruzi*. Mostrou-se que a despeito das diferenças em susceptibilidade, C3H (He) (suscetível) e C57BL/6 (resistente) permaneciam hipocomplementêmicos durante a infecção. Também, não houve correlação entre nível mínimo de complemento e sobrevivência, e, portanto, a significância da hipocomplementemia permaneceu desconhecida²²⁶. Em outro estudo, mostrou-se que tripomastigotas do sangue podem tornar-se susceptíveis à lise mediada pelo complemento pelo tratamento com tripsina, e, em menor grau, com sialidase. Esses achados sugerem que os tripomastigotas escapam da ação da lise mediada pelo complemento *in vivo* por causa da presença de moléculas reguladoras, sensíveis à tripsina e à sialidase, na sua superfície²²⁷. Em adição, foi mostrado que formas de *T. cruzi* crescidas *in vitro* liberam um fator ativador do complemento sérico que decompõe os soros humano, de cobaia e de camundongo. Administração do fator de decompõe a camundongo normal resulta em mais de cinquenta por cento de redução na atividade hemolítica do complemento.²²⁸

Em geral, organismos sororresistentes são mais patogênicos do que aqueles micróbios sorossensíveis, em modelos animais de infecção. A presença de lipopolissacarídes na membrana externa de bactérias gram-negativas é o fator característico de virulência mais claramente associado com resistência do soro²²⁹. Portanto, lesão letal da membrana externa pode não ser encontrada em organismos recuperados da corrente sanguínea a despeito do fato de que os componentes terminais do sistema complemento estejam depositados na superfície em quantidades significantes²³⁰. Lipopolissacarídes têm sido detectados na membrana externa do *T. cruzi*, mas o papel que essas moléculas desempenham na evasão do parasito da lise mediada pelo complemento, se existe, ainda está para ser determinado. Por outro lado, o *T. cruzi* é um protozoário muito ativo, e uma viragem no seu metabolismo de carboidrato na forma epimastigota para consumo de proteína na forma tripomastigota já foi descrita²³¹. Redistribuição e interiorização de imunoglobulinas de superfície podem também ser um mecanismo de escape eficiente, que possibilita os parasitos do sangue evadirem-se dos fatores líticos do hospedeiro¹⁸⁹⁻²²⁰.

Grande importância tem sido dada à descrição de anticorpos líticos contra tripomastigotas do estoque Y de *T. cruzi*, detectável pelo complemento mediante lise, no soro de camundongo com infecção crônica, enquanto camundongos imunizados com vários antígenos – formas de cultivo congeladas-descongeladas, tripomastigotas fixados com glutaraldeído, metabólicos secretados-excretados, e glicoproteínas de superfícies – mostraram apenas aqueles anticorpos “convencionais” detectáveis pelos testes de imunofluorescência²³². Este parece ser um fenômeno curioso que documentaria a existência de uma infecção ativa pelo *T. cruzi*.

A ausência de anticorpos líticos em um paciente chagásico, previamente conhecido como tendo lise mediada pelo complemento, indicaria que o parasito foi erradicado. Ampla significação imunobiológica têm sido creditada a este fenômeno. Por exemplo, foi sugerido que ele serve para monitorar proteção em experimentos de vacinação contra o *T. cruzi*²³², e também como critério de cura após tratamento com drogas tripanocidas. Mais recentemente, notou-se que a citotoxicidade celular mediada pelo anticorpo contra o *T. cruzi* é mediada unicamente por esses anticorpos líticos^{232a}.

b) Imunidade celular dependente de anticorpo.

Lise de formas de *T. cruzi*, que pode ser obtida por células que dependem do anticorpo e independem do complemento, tem sido descrita em vários ensaios *in vitro*. Células de baço de rato e camundongo mostram citotoxicidade aumentada ao *T. cruzi* quando cobertas com soros homólogos²³³. Outras investigações foram feitas com parasitos marcados com H³-uridina e com células esplênicas fracionadas, usando técnicas isotópicas seguidas de filtração em coluna de lã de *nylon* que ajudam a separar as células na base de suas propriedades adesivas²³⁴. Liberação elevada de H³-uridina foi observada quando parasitos marcados com radioisótopos ficavam na presença de polimorfonucleares e macrófagos. Em adição, tratamento de exsudatos peritoneais com ferrocarbonil e um magneto, para remover macrófagos e neutrófilos, resultou em aumento da citotoxicidade. Essas observações parecem indicar que eosinófilos podem matar o *T. cruzi*²³⁴. Outros experimentos mostram que a citotoxicidade por eosinófilos é negligenciável na ausência de anticorpo, enquanto o anticorpo aumenta a atividade de neutrófilos cerca de 8 vezes²³⁵. Granulócitos de rato, camundongo e homem são eficientes na liberação de RNA marcado com H³-uridina de epimastigotas²³⁶⁻²³⁸.

Populações de granulócitos obtidas de camundongos infectados com *S. mansoni* continham células efetoras. Ensaio de atividade citotóxica de populações enriquecidas de eosinófilos e neutrófilos mostraram que ambos os tipos de células são capazes de destruir tripomastigotas sangüícolas tratados com anticorpos, com taxa célula efetora: célula alvo tão baixa quanto 1:1. Em taxas mais altas, entretanto, a proporção de tripomastigotas pareceu não ser susceptível de lise mediada por anticorpo^{239, 240}. O papel desempenhado pela citotoxicidade dependente de anticorpo associada a eosinófilos e neutrófilos na resistência contra a infecção foi ainda avaliado em camundongos. Somente camundongos injetados com tripomastigotas do sangue e encubados com células efetoras na presença de soros imunes sobreviveram mais do que três semanas após as infecções²⁴⁰. Alguns graus de imunoproteção foram portanto observados como sendo resultado da ação de granulócitos nos

parasitos. A morte intracelular de formas de *T. cruzi* por eosinófilos e neutrófilos de ratos já foi descrita²⁴¹, enquanto a morte extracelular parece ser mais fácil de ocorrer quando granulócitos de camundongos são usados²⁴⁰.

Tem sido sugerido que focos inflamatórios agudos contendo eosinófilos e neutrófilos, que são vistos freqüentemente nas infecções iniciais pelo *T. cruzi*, podem representar sítios de destruição, mediada por granulócitos dependentes de anticorpos^{240, 242}. De fato, a demonstração de que leucócitos polimorfonucleares humanos sensibilizados com anticorpos específicos tornam-se altamente citotóxicos para formas do parasito parece favorecer este postulado²⁴³. O efeito citotóxico parecer ser dependente da IgG presente no soro imune e no receptor Fc das células efetoras²⁴⁴. Destruição intracelular segue dessa forma um aumento inicial do consumo de oxigênio, que é seguido por um grande aumento da produção de H₂O₂. Este mecanismo citotóxico não parece ser afetado pela adição de fenilbutazona, cianeto ou azida. Portanto, a ação de produtos de redução de oxigênio ativo e mieloperoxidase pode ser responsável pela destruição do *T. cruzi* por granulócitos²⁴³. A citotoxicidade, mediada por células, dependente de anticorpo é certamente consistente com observações clássicas prévias em parasitos mantidos vivos em câmaras de miliporos implantadas em animais imunes, onde eles permaneceriam vivos enquanto eram acessíveis aos fatores humorais, mas não às células fagocíticas do hospedeiro²⁴⁵. Resultados dessas observações mostram claramente que a imunidade mediada por células têm um papel central na defesa do hospedeiro contra infecções pelo *T. cruzi*.

c) Imunidade mediada por célula

Imunidade contra *T. cruzi*, mediada por linfócitos T, têm sido demonstrada em humanos e animais de experimentação. Esses estudos têm implicado consistentemente a função imune timo-dependente no desenvolvimento e manutenção da resistência. Manipulações do sistema imune resultaram em um corpo de informações que têm sido consideradas indisputáveis evidências da importância do papel desempenhado pelas reações celulares. Por exemplo, bloqueio do sistema fagocítico mononuclear de camundongos com dióxido de tório, ou pela administração intravenosa de partículas de sílica, antes do desafio com *T. cruzi*, resultou em aumento da parasitemia, período patente prolongado e aumento da mortalidade²⁴⁶. Administração de drogas imunossupressoras tóxicas para linfócitos T, tal como ciclofosfamida, irradiação total do corpo e injeção de soro antitimócito para remover células T, resultaram em exacerbação das infecções pelo *T. cruzi* em camundongos e ratos^{247, 248}. Em adição, reativação de infecções agudas em pacientes sob quimioterapia de leucemia linfocítica aguda, enquanto a resposta imune humoral

permanecia intacta, permite especular a respeito do papel crítico desempenhado pela resposta imunitária celular na resistência de humanos contra infecções pelo *T. cruzi*²⁴⁹.

Outra demonstração da dependência tímica da resposta celular primária na resistência contra *T. cruzi* foi sugerida por estudos iniciais que mostravam alta parasitemia e mortalidade em camundongos submetidos à timectomia neonatal do que em controles não-timectomizados²⁵⁰. Também, mostrou-se que camundongos nu/nu (BALB/c) atímicos eram significativamente mais susceptíveis do que seus heterozigotos (nu +) que tinham timo. Ademais, transplantação neonatal de timo em camundongos atímicos restabelecia a resistência do *T. cruzi* de forma similar àquela vista em camundongos normais²⁵¹. Todos esses experimentos descritivos acima constituem evidências conclusivas de que a importante maquinaria ativa na defesa do hospedeiro, no curso das infecções pelo *T. cruzi*, está sob controle do timo. Em adição, a dependência da resposta imune pela célula T foi mostrada também na atividade T auxiliar. Ratos nu/nu atímicos, que são altamente susceptíveis às infecções pelo *T. cruzi*, mostram níveis mais baixos de anticorpos IgG2a do que seus heterozigotos que possuem timo²⁵².

Transferência passiva de imunidade mediada por célula de animais infectados pelo *T. cruzi* para recipientes normais por meio de células linfóides têm sido obtida consistentemente^{118, 253-256}. De interesse, camundongos normais recipientes de linfócitos singênicos de doadores que superaram a infecção aguda tornaram-se resistentes a um desafio²⁵³⁻²⁵⁸. Por exemplo, camundongos isogênicos C57B1/10 injetados com formas de cultura de *T. cruzi* ficaram resistentes ao desafio com as formas sanguíneas virulentas. Células esplênicas de doadores imunizados conferiram proteção parcial aos recipientes normais, e as preparações enriquecidas de linfócitos T foram significativamente mais protetoras do que as populações enriquecidas de linfócitos B. A proteção não foi observada em recipientes de soro, a despeito da presença de altos níveis de anticorpos aglutinadores²⁵⁸. Transferência adotiva de resistência que podia ser obtida consistentemente com linfócitos T nem sempre podia ser obtida em recipientes de soros imunes, ainda que algum grau de sucesso tenha sido alcançado^{202-205, 259-262}. Tem sido sugerido que as discrepâncias em resultados relativos à transferência passiva de soros imunes podem ser devidas às diferentes ações protetoras oferecidas por classes distintas de imunoglobulinas²⁶³. A atividade protetora parece estar restrita à subclasse IgG2b²⁰⁰.

Ultimamente, os efeitos da depleção de células T na memória imunológica para este parasito foram estudados em um sistema de camundongos singênicos²⁶⁴. Como esperado, exacerbação das infecções ocorreu em camundongos (TX) C57BL/6J, timectomizados, irradiados, com medula óssea reconstituída, quando foram comparados aos

camundongos-controle (STX). A reconstituição dos camundongos TX com tímócitos restaurou a resistência para os mesmos níveis daqueles animais STX. A memória imunológica em células esplênicas de camundongos convalescentes pode ser apagada pela destruição dos linfócitos T com soro antiteta mais complemento, mas não com soro anti-Ig. Essas observações indicam que a indução da resposta imune primária e da memória imunológica requerida para um tipo secundário de resposta contra o *T. cruzi* depende dos linfócitos derivados do timo^{264, 265}.

Os correspondentes *in vitro* da imunidade mediada por células têm sido descritos em humanos e infecções experimentais pelo *T. cruzi*. Inibição do espalhamento de macrófagos e a migração de macrófagos pela interação com linfócitos T sensibilizados pelo *T. cruzi*, têm sido observadas há muitos anos^{185,259-266}. Além disso, a resposta proliferativa de células T tem sido demonstrada ou pela estimulação com antígenos específicos ou com mitógenos^{118, 185, 267-269}. Todos esses ensaios têm se tornado marcadores úteis da competência imune no curso da infecção. Vários padrões de reatividade têm sido observados pela utilização desses testes correlatos, cujos aspectos peculiares são reconhecidos de acordo com a fase da infecção^{178, 258-270}, conquanto o estado de responsividade possa estar deprimido na fase aguda²⁷¹⁻²⁷⁸. Os aspectos imunorregulatórios envolvidos nas respostas mediadas por células nas infecções agudas e crônicas pelo *T. cruzi* serão discutidos mais adiante.

As cinéticas da resposta de linfócitos à estimulação com concanavolina A e fito-hemo-aglutinina (mitógenos de células T), e com lipopolissacáride (mitógeno de célula B) foram estudadas em camundongos infectados com *T. cruzi*²⁷⁹. Uma redução acentuada nas respostas foi observada durante a fase aguda, enquanto níveis normais de respostas foram obtidos durante a fase crônica da infecção. Foi interessante observar que a transição da hipo-responsividade para o normal ocorreu por volta de 40 dias pós-infecção, o que coincide com um declínio acentuado nos níveis de parasitemia e aumento na sobrevivência. Os números de células esplênicas T diminuíram significativamente durante o estágio agudo, enquanto os números absolutos de células B contendo Ig aumentaram.

Todavia, ambas as populações celulares retornaram aos níveis normais durante as fases crônicas. Ademais, tratamento das infecções crônicas pelo *T. cruzi* com ciclofosfamida levou à recrudescência das parasitemias. Esses dados estão de acordo com o papel das células T na imunossupressão e sugerem que a imunidade mediada por células T está relacionada com o controle da infecção pelo *T. cruzi*, pelo hospedeiro e na manutenção da cronicidade²⁷⁹. Em outro estudo, a blastogênese induzida por mitógeno revelou um tipo dicotômico de respostas, que foram expressadas por um efeito supressivo no início da infecção e por efeito de reforço detectado nos estágios tardios²⁸⁰. O papel da imunidade mediada por células na resistência tem sido relacionado com a habilidade de células

esplênicas de camundongos infectados produzirem fator (es) capaz (es) de tornar macrófagos efetivamente tripanocidas. Camundongos imunes resistentes geram altos níveis de fator (es) quando comparados com camundongos susceptíveis e a remoção dos linfócitos B contendo Ig das células imunes esplênicas não prejudicou a transferência passiva da resistência nem a geração desse (s) fator (es)²⁵⁷. Ainda mais, a capacidade de camundongos C57BL/6, infectados com *T. cruzi*, liberar linfotóxina foi sempre bem acima daquela vista em animais não-infectados, e esta capacidade permaneceu alta mesmo após a parasitemia ter-se tornado subpatente²⁸¹. De interesse, os sobrenadantes de esplênócitos de camundongos C57BL/6 infectados pareceram inibir a motilidade de tripomastigotas sangüícolas e, também, a infectividade para células WI38 de culturas embrionárias de pulmão humano. Preparações similares obtidas de camundongos C3H/HeJ, que não são capazes de gerar linfotóxina, não tiveram qualquer ação contra tripomastigotas do sangue, nem preveniram a infecção de células WI38. Ainda que linfócitos sensibilizados de animais infectados cronicamente não tivessem qualquer efeito tóxico direto nos tripomastigotas *in vitro*, sobrenadantes de células esplênicas imunes obtidas de hospedeiros resistentes apresentaram ação direta contra tripomastigotas do *T. cruzi*, em adição a sua habilidade de estimular macrófagos residentes à atividade microbicida^{257, 281}.

As respostas imunes mediadas por células que têm sido estudadas em humanos infectados naturalmente e em animais infectados experimentalmente podem induzir reações eficientes contra tripomastigotas extracelulares. Esses mecanismos de destruição do parasito são da maior importância na resistência. Em adição, reações imunes mediadas por células podem ser particularmente importantes na proteção contra as formas do parasito que ficam escondidas intracelularmente nos tecidos do hospedeiro e, portanto, inacessíveis aos fatores humorais. Células parasitadas foram encontradas com antígenos do parasito expressos na superfície^{282, 283}. Reconhecimento desses determinantes antigênicos pelos linfócitos T sensibilizados pelo *T. cruzi* poderia iniciar um ataque imune. A destruição de células cardíacas parasitadas, fibroblastos e outras células hospedeiras por linfócitos T citotóxicos tornariam os estágios intracelulares do parasito susceptíveis a uma imunofagocitose eficiente²⁸⁴⁻²⁸⁸. Entretanto, destruição de células do hospedeiro por linfócitos T imunes pode ser perigosa, desde que ela possa resultar em dano tecidual²⁸⁷. Este aspecto será discutido mais adiante, na seção sobre imunopatologia e patogênese.

d) Imunofagocitose

Os eventos que ocorrem inicialmente no sítio de entrada do parasito no corpo são cruciais para determinar a distribuição dos parasitos

emergentes, após o primeiro ciclo intracelular em macrófagos residentes e outras células fagocíticas. Um período de encubação, variável segue a penetração de *T. cruzi* em macrófagos, antes do início de sua reprodução. As amastigotas em divisão diferenciam em tripomastigota que escapam da célula hospedeira usualmente seis dias após a infecção²⁸⁹. Nesse ínterim, antígenos do parasito são liberados e, ou diretamente ou através da apresentação de macrófagos, estimulam células linfóides imunocompetentes, que passam por proliferações subseqüentes nos linfonodos satélites hiperplasiados. Todos os eventos que acontecem a seguir serão significativamente alterados pela ação de produtos das respostas imunes humoral e celular.

Ainda que tripomastigotas sejam capazes de infectar células adjacentes imediatamente após escapar da célula onde elas tinham completado seu ciclo de vida²⁸⁹, redistribuição do parasito para infectar outras células à distância depende do tropismo tissular peculiar que é exibido por diferentes estoques do *T. cruzi*²⁹⁰⁻²⁹³. Localização preferencial do parasito em certos órgãos e células teciduais poderia distinguir pelo menos dois padrões de tropismo, quais sejam, reticulotropismo e cardiotropismo. Parasitismo de células mononucleares fagocíticas do baço, fígado e medula óssea é visto usualmente com o estoque reticulotrópico Y e Tulahuén²⁸⁹⁻²⁹¹, enquanto o parasitismo de fibras musculares estriadas cardíacas e esqueléticas e também de fibras musculares lisas, é usualmente visto com vários outros isolados de *T. cruzi*²⁹²⁻²⁹⁶. Recentemente, foi mostrado que o estoque Brasil, cardiotrópico, parasita seletivamente as fibras musculares esqueléticas vermelhas, caracterizadas histoquimicamente como tipo I, em uma taxa aproximadamente cinco vezes maior do que as fibras brancas estriadas do tipo II²⁹⁷. Foi mostrado também que o estoque Y penetrava macrófagos em uma taxa muitas vezes maior do que aquela do estoque CL²⁹⁸. Os fatores que tornam o *T. cruzi* atraído para certas células hospedeiras não são conhecidos²⁹⁹, mas receptores específicos estão, possivelmente, envolvidos nas interações parasito/membrana da célula hospedeira. O conteúdo de carboidrato de alguns receptores tem sido suspeitado porque o tratamento das células com lecitinas ou pelo bloqueio dos receptores com monossacárides, tal como N-acetilglucosamina, diminui significativamente a taxa de infecção³⁰⁰. Portanto, a redistribuição de tripomastigotas circulantes de diferentes estoques de *T. cruzi* em hospedeiros imunizados, de forma a invadir outras células, parece estar sob controle imunobiológico muito complexo²⁸²⁻²⁸⁶. Células não-fagocíticas parasitadas podem ser reconhecidas e destruídas por linfócitos T citotóxicos com liberação subseqüente de todas as formas do parasito, as quais se tornam susceptíveis a outros mecanismos de resistência. O remarcável papel da imunofagocitose na desaceleração das infecções pelo *T. cruzi* no hospedeiro imunizado pode ser apreciado nas observações que seguem abaixo.

Um achado marcante em camundongos inoculados com estoques reticulotrópicos do *T. cruzi* é um intenso processo de destruição dos parasitos intracelulares, em macrófagos na polga vermelha do baço e em células de Kupffer no fígado, que ocorre repentinamente após o sétimo dia pós-infecção²⁹³. A captação de metionina-³⁵S de tripomastigotas marcadas, tanto pelo fígado quanto pelas células do baço, foi estudada quantitativamente³⁰¹. O estoque Y de tripomastigotas rádio-marcado, que foram injetados intravenosamente em camundongos normais, prontamente redistribuíram no fígado e baço, conforme ficou indicado pela concentração do material radioativo nesses órgãos. De interesse, opsonização das formas do parasito com soro imune de camundongos infectados cronicamente promoveu um grande aumento da captação de parasitos emissores de radiação gama, tanto no fígado quanto no baço, e as parasitemias observadas nesses camundongos foram mais baixas do que nos animais-controle que receberam *T. cruzi* não-opsonizado. Portanto, parece que a opsonização facilitou a captação e destruição dos tripomastigotas infectantes pelo fígado e baço. Uma análise mais detalhada da interação do parasito com macrófagos mostrou macrófagos de camundongos imunes, quantitativamente e qualitativamente, mais eficientes na destruição do *T. cruzi* do que macrófagos normais. A opsonização aumentou a captação de ambas as formas do parasito. Enquanto a lise de epimastigotas foi notada dentro de macrófagos normais ou imunes, a opsonização de tripomastigotas pareceu ser essencial para a destruição do parasito dentro dos macrófagos imunes³⁰². As amastigotas parecem ser particularmente susceptíveis à fagocitose na presença de soro imune³⁰³.

A susceptibilidade de vários estágios do ciclo de vida do *T. cruzi* à resistência do hospedeiro mediada pela imunofagocitose foi estudada usando-se como parâmetro o percentual de macrófagos peritoneais infectados no fim do primeiro ciclo intracelular, por volta do quarto dia após o desafio intraperitoneal³⁰⁴. Todos os estágios do parasito mostraram ser infectantes para camundongos na seguinte ordem decrescente: tripomastigotas do sangue > tripomastigotas metacíclicos > epimastigotas. Observou-se que todos os estágios do parasito infectavam macrófagos de camundongos normais, enquanto macrófagos ativados de camundongos sobreviventes, após múltiplas reinoculações de *T. cruzi*, raramente mostraram parasitismo intracelular. Por outro lado, camundongos normais recipientes de soros imunes sempre albergavam numerosos macrófagos parasitados³⁰⁴. Nesses experimentos, células sensibilizadas e fatores humorais não pareceram discriminar qualquer estágio do ciclo de vida do parasito e, portanto, os macrófagos peritoneais ativados expressam uma larga habilidade de destruir qualquer estágio do ciclo de vida do *T. cruzi*.

Há ampla documentação da eficiência da resistência de macrófagos de animais imunes contra infecções com *T. cruzi*, ainda que esta resistência adquirida não seja necessariamente específica. Por exemplo, macrófagos de camundongos imunes ao *T. cruzi* foram resistentes à infecção *in vitro* com *Listeria monocytogenes*, enquanto macrófagos de camundongos imunizados com BCG conferiram resistência contra o *T. cruzi*^{305, 306}. Estudos de microscopia eletrônica mostraram que macrófagos ativados podem controlar uma infecção pelo *T. cruzi* significativamente maior do que acontece com macrófagos normais^{307, 308}. Lisossomas secundários marcados com dióxido de tório foram encontrados em maior quantidade em macrófagos ativados do que nos normais, e a função dos fagossomas contendo parasitos com lisossomas secundários precedeu a destruição dos parasitos³⁰⁹. Em todo caso, a resistência pareceu assentar-se sobre a ativação de macrófagos por fatores liberados por células esplênicas imunes. A geração de fatores de células esplênicas que induzem a ativação de macrófagos foi considerada ser uma função timo-dependente. A depleção de linfócitos T pelo tratamento de células esplênicas imunes com soro antiteta mais complemento impediu a produção de fatores ativadores de macrófagos. Portanto, a atividade microbicida de macrófagos parece depender de certa forma da estimulação de células T imunes pelo antígeno específico³⁰⁹⁻³¹⁶.

Macrófagos ativados possuem muitas propriedades reforçadas, tais como espalhamento rápido, atividade de membrana aumentada, secreção de níveis elevados de ativador do plasminogênio e maior habilidade de secreção intracelular de oxigênio e produtos de redução³¹⁰⁻³¹³. Macrófagos ativados podem ser colhidos de camundongos inoculados com *T. cruzi* ou BCG, os quais mostram atividade microbicida *in vitro* contra o *T. cruzi*. Por exemplo, níveis máximos de secreção de ativador de plasminogênio podem ser obtidos pela encubação de macrófagos ativados por um fator de indução produzido por populações de células esplênicas imunes³¹⁰. A atividade microbicida contra tripomastigotas de *T. cruzi* pode ser induzida *in vitro* através da exposição de macrófagos inflamatórios aos produtos de células esplênicas sensibilizadas e estimuladas com o antígeno. A atividade microbicida ótima pode ser obtida pela exposição continuada de macrófagos aos fatores de células esplênicas, até que os parasitos intracelulares tenham desaparecido. Entretanto, a sobrevivência desses organismos pode retomar o crescimento toda vez que os fatores das células esplênicas sejam removidos antes de alcançar a erradicação completa dos parasitos intracelulares^{311, 312}. Ademais, ativação de macrófagos *in vitro* com fatores de células esplênicas leva a um aumento da produção de H₂O₂ endógena, que se correlaciona com as propriedades microbicidas³¹³. A geração de H₂O₂ e outros produtos de redução do oxigênio pode explicar o aumento da capacidade de macrófagos ativados na destruição dos organismos intracelulares.

O efeito microbicida da redução ativa de produtos do oxigênio sobre formas intracelulares do *T. cruzi* foi ainda avaliado com a ajuda de uma linhagem de células murinas com características de macrófagos (clone 16), capaz de utilizar o ciclo da hexose monofosfato para oxidar glucose e produzir O_2^- e H_2O_2 , e também, com uma linhagem de célula variante (clone C36) que é incapaz de produzir O_2^- sob condições similares³¹⁴. Destruição significante ou inibição do crescimento dos parasitos foi observada com o clone de células da linhagem 16 infectadas com *T. cruzi*, enquanto os parasitos foram capazes de crescer no variante oxidativo clone C36. A estimulação do metabolismo do oxigênio resultou na redução do nitroazul tetrazolium, tão logo a reação foi iniciada pela infecção do clone de células 16. Esses resultados parecem corresponder a outros experimentos nos quais os parasitos foram testados em suspensões livres de células de xantina-xantina oxidase. Nesse sistema *in vitro*, a destruição pareceu ser catalase sensitiva e dependente da produção de H_2O_2 , com doses letais de 6,0 a 8,7 nmol/ml/min, para epimastigotas e tripomastigotas, respectivamente. Dessa forma, a destruição intracelular de formas do *T. cruzi* por macrófagos foi resultante da ativação de mecanismo oxidativo citocida³¹⁴. Outras evidências em favor desse mecanismo foram trazidas com a demonstração de destruição intracelular do *T. cruzi* após tratamento dos macrófagos infectados com os carreadores elétron-catiônicos, metossulfato de fenazina, azul cresil brilhante e cristal violeta³¹⁵.

A contribuição da célula hospedeira e do parasito no processo fagocítico que pode resultar ou em proliferação do parasito intracelularmente ou em inibição do crescimento e destruição, é atualmente um assunto importante relacionado às relações parasito/hospedeiro. A interação do parasito com a membrana do macrófago parece ser um processo ativo da parte de ambas as células. Por muito tempo se considerava que apenas o parasito desempenhava um papel ativo^{289, 307}, mas as evidências correntes também indicam a possibilidade de captação do parasito por fagocitose³¹⁶. Em cada caso, o parasito parece ser ligado a estruturas protease-sensitivas na membrana plasmática da célula hospedeira. Os receptores da membrana do macrófago que mediam a ingestão dos tripomastigotas sangüícolas podem ser removidos por tratamento com pronase, mas não com tripsina ou quimiotripsina³⁰⁷. Recuperação da atividade fagocítica usualmente segue um período de tempo necessário para ressíntese e relocação dos receptores na superfície da célula e pode ser prevenida por inibidores da síntese de proteína ou da motilidade celular. Receptores Fc e C3b de macrófagos não parecem ser essenciais no processo fagocítico³¹⁷. Tratamento dos tripomastigotas com tripsina facilitou sua captação pelos macrófagos e não interferiu na habilidade do parasito multiplicar-se dentro da célula hospedeira²²⁷. Ademais, a infectividade dos tripomastigotas do sangue para uma célula hospedeira

pode ser acentuadamente reduzida pelo tratamento dos parasitos com pactamicina, que inibe a síntese protéica irreversivelmente. A proliferação intracelular do parasito também foi significativamente diminuída ³¹⁸. Além disso, os efeitos dos inibidores de RNA, proteína e biossíntese de glicoproteína na infectividade e diferenciação do *T. cruzi* nas células hospedeiras têm sido estudados. Puromicina bloqueia o desenvolvimento de adesão e penetração do parasito; actinomicina e tunicamicina inibem a infectividade sem bloquear adesão, enquanto alta concentração de actinomicina D bloqueia adesão e transformação intracelular ^{319, 320}. De importância, a supressão da infectividade com tunicamicina sugere que a estrutura da membrana da célula hospedeira envolvida na penetração do *T. cruzi* é possível de conter uma glicoproteína com N-glicosídios ligados a oligossacárides ³²⁰. De fato, glicoproteína de superfície têm sido descritas no *T. cruzi*, e seu envolvimento no processo de interiorização em células mamíferas tem sido considerado ³²¹.

I – IMUNOSSUPRESSÃO NAS INFECÇÕES PELO *T. CRUZI*

Tem sido descrita a ocorrência de imunossupressão em infecções agudas pelo *T. cruzi* em humanos e camundongos ²⁷⁴⁻²⁸¹. Foi mostrado que humanos com infecções agudas pelo *T. cruzi*, que eram agrupados de acordo com suas manifestações clínicas, mostravam dicotomia em suas respostas imunes. Os pacientes sintomáticos, com doença de Chagas aguda manifesta, tinham fortes reações cutâneas de tipo retardada contra um antígeno do parasito e a migração de seus leucócitos do sangue era inibida na presença desse antígeno ^{275, 322}. Em contraste, as infecções agudas inaparentes, assintomáticas, não produziam uma reação cutânea do tipo retardada positiva, e a migração de suas células não era inibida pelo antígeno. de interesse, somente os pacientes assintomáticos têm hipersensibilidade retardada diminuída, como se verificou pelas respostas cutâneas contra uma bateria de antígenos T-dependentes, não-relacionados. Essa observação documenta prejuízo severo da função timo-dependente somente naqueles indivíduos que não tinham manifestações agudas da infecção. Por outro lado, uma correlação direta pode ser traçada entre as manifestações clínicas da doença de Chagas e a capacidade de produzir uma reação de hipersensibilidade do tipo retardada contra o parasito. O estado de imunodepressão nos indivíduos com as infecções inaparentes perdurou pelo menos seis meses ²⁷⁵. A despeito da ausência de sintomas no início da infecção, não há garantia de que esses pacientes possam ter melhor prognóstico do que aqueles com a infecção aguda manifesta, desde que os pacientes imunossuprimidos viraram para o grupo reativo, mais tarde, no curso da infecção crônica, e, portanto, tornaram-se indistinguíveis no que concerne à função da célula. T.

O fenômeno de imunossupressão tem sido mais explorado no sistema murino. O corpo de informações que se tem acumulado nos

últimos anos mostra que o estado de imunossupressão que aparece no início da infecção pode persistir, em graus variados, na fase crônica em alguns animais. Muitos mecanismos têm sido descritos como sendo importantes na indução e manutenção do estado de imunossupressão em camundongos. Esses mecanismos incluem células T supressoras, macrófagos supressores, depleção de células necessárias para gerar respostas imunes, ativação policlonal com deleção clonal subsequente, fatores séricos supressores, e, também, um fator supressor do parasito. Usualmente, esses mecanismos operam em uma fase aguda precoce da infecção; há pouca evidência mostrando sua atividade na fase crônica. Muito progresso tem sido feito no entendimento dos aspectos imunorregulatórios de infecções murinas pelo *T. cruzi*, mas os mecanismos intrincados pelos quais o sistema imune do hospedeiro vira atrás e evita exacerbação das respostas imunes, como se fosse para garantir um estado delicado de balanceamento da homeostasia, ainda continuam desconhecidos.

Os primeiros experimentos sobre imunossupressão mostraram diminuição das respostas celulares formadoras de anticorpos 19S e 7S, contra eritrócitos de burro injetadas em camundongos infectados com *T. cruzi*.^{273, 277} Nesse ínterim, a supressão da imunidade mediada por células contra antígenos não-relacionados foi documentada^{274, 276, 323}. Os prováveis mecanismos de supressão dos anticorpos humorais implicam a ação de ambos, antígenos T-dependentes e T-independentes sobre células aderentes à lã de nylon, Thy 1,2 negativas^{276, 278}, enquanto as células Thy 1,2 positivas, não-aderentes (células T supressoras) pareciam não afetar a função timo-dependente²⁷⁴. Outros experimentos mostraram que a supressão da resposta imune primária induzida pelo *T. cruzi* em camundongos era dependente da população de macrófagos aderente ao plástico^{324, 325}. A supressão *in vitro* da resposta imune primária contra hemácias de carneiro em cultura de células murinas era também dependente de macrófagos³²⁶. Ademais, uma substância supressora do soro foi identificada, a qual parecia regular as respostas imunes mediadas por células diretamente pela supressão da ação de células e indiretamente pela indução da liberação de um fator de células esplênicas aderentes. Este fator macrofágico teve marcada habilidade de abolir a capacidade de resposta de linfócitos T³²⁵.

Células esplênicas aderentes, esterase-positivas não-específicas, obtidas de camundongos infectados com *T. cruzi*, causaram redução das respostas de células esplênicas normais aos mitógenos específicos para células B e T³²⁶. Quando aqueles esplenócitos aderentes foram substituídos por células aderentes de camundongos normais, foram obtidas respostas aumentadas aos mitógenos de células B e T. Tratamento das suspensões de células de camundongos infectados com indometacina melhorou a resposta aos mitógenos. Essas observações sugeririam que a

imunossupressão da doença de Chagas aguda é, pelo menos em parte, mediada por uma célula com características de macrófago e é dependente de um mecanismo mediado por prostaglandina ³²⁶. De fato, as infecções pelo *T. cruzi* parecem aumentar significativamente o conteúdo de macrófagos, possuidores de antígenos associados à região Ia, de dez por cento (em exsudato peritoneal normal) para cem por cento após a infecção. Parece que grande proporção do influxo de macrófagos Ia positivos foi mediada por células T. Considerando-se que as células Ia positivas são essenciais para a maioria das reações das células T, foi sugerido que o aumento na população de macrófagos Ia pode ser um importante evento imunorregulatório nas infecções pelo *T. cruzi* ³²⁷.

Tanto as substâncias supressoras quanto as células supressoras parecem jogar importante papel nos mecanismos imunossupressores durante as infecções experimentais pelo *T. cruzi*. Uma substância supressora induzida pelo parasito no soro de camundongos infectados pelo *T. cruzi* foi identificada e parcialmente caracterizada ³²⁸. A substância supressora é termolábil a 70°C, sensível ao tratamento com tripsina e tem massa relativa (M_r) entre 196 e 200 Kd. Essa substância não foi absorvida com esplenócitos alogênicos, culturas de *T. cruzi*, eritrócitos isólogos ou heterólogos e permaneceu ativa após tratamento com anti-soro contra imunoglobulina murina. Ativação dos esplenócitos murinos com atividade supressora requereu 48 horas de encubação com a substância supressora ou 72 horas após transferência *in vivo*. Foi mostrado ainda que a manifestação desse efeito supressivo na indução das respostas de anticorpos antitrinitrofenil e anti-hemácia de carneiro requereu células aderentes ao plástico ³²⁸. Transferência passiva da substância supressora para recipientes singênicos normais inibiu as respostas imunes primária e secundária a antígenos T-dependentes e T-independentes. Também foi mostrado que a eficiência dos fatores supressores séricos estava relacionada ao haplotipo H-2 do recipiente ³²⁹. O fator supressor sérico pareceu interagir com esplenócitos via uma estrutura da membrana sensível à tripsina e regenerável. Sobrenadantes de culturas de células esplênicas obtidas de camundongos tratados com fator supressor ou de camundongos infectados com *T. cruzi* não ativaram diretamente as células supressoras, mas provavelmente o fizeram indiretamente através de um fator supressor gerado *in vitro* ³³⁰. Além disso, um fator supressor não-específico foi produzido *in vitro* pela encubação de células esplênicas de camundongos infectados com uma fração (104.000 x g) de homogeneizados de *T. cruzi*. Esse fator supressor pode também ser obtido pela encubação das células esplênicas imunes com epimastigotas vivas ou tripomastigotas. Entretanto, sua insensibilidade ao indometacin parece indicar que esse mecanismo pode não estar relacionado a prostaglandina ³³¹. Diferenças na regulação das respostas humorais entre camundongos infectados com *T. cruzi* e camundongos administrados com substância

supressora induzida pela infecção foram notadas. A infecção ativa levou a uma atividade alterada das células T auxiliares e a um reduzido número de precursores de células B, mas o fator supressor não afetou qualquer das populações. Finalmente, as células B de camundongos infectados com *T. cruzi* induziram esplenócitos normais a respostas diminuídas ao antígeno em pauta, enquanto o fator supressor não causou tal efeito ^{328, 332}.

Tripomastigotas do sangue foram considerados participar ativamente na inibição das respostas de linfócitos induzidas por antígenos não-específicos. Vários graus de supressão das respostas das células esplênicas normais para concanavalina A e endotoxina lipopolissacáride pareceram ser dose-dependente, mas a ação inibitória dos parasitos não foi eliminada por um excesso de mitógeno, além dos níveis ótimos. Outra demonstração de que a resposta proliferativa de linfócitos pode ser inibida com um sonicado preparado de *T. cruzi*, incorporado no sistema de cultura durante as primeiras 24 horas, sugeriria que a blastogênese das células T e B é efetuada por antígenos do parasito em um estágio precoce da ativação do linfócito ³³³. Adicionalmente, a resposta imune primária a hemácias de carneiro foi deprimida pela fração (Fad) derivada de cultura de epimastigotas injetadas em camundongos BALB/c 15 minutos antes do aloantígeno. Células que secretam IgG foram deprimidas quando Fad foi injetada antes da primeira dose, enquanto ambas, IgM e IgG formadoras de placa, estavam deprimidas quando Fad foi administrada antes da injeção de reforço ³³⁴. A supressão da imunidade humoral a hemácias de carneiro pareceu ocorrer nos estágios agudo e crônico da infecção pelo *T. cruzi*, mas o reforço da supressão foi observado somente nas infecções iniciais ³³⁵.

A heterogeneidade antigênica do *T. cruzi* tem sido considerada como uma possível explicação para a enorme diversidade na especificidade dos anticorpos encontrados nas infecções humanas naturais e em animais de laboratório ^{42, 208}. Ativação policlonal de linfócitos B foi demonstrada ocorrer durante infecção do *T. cruzi* em camundongos A/J, conforme foi avaliada pela resposta de células que formam placas espontaneamente contra o trinitrofenil e contra eritrócitos de cabra, eqüino e de carneiro, os quais se elevam 5 a 6 dias pós-infecção. Interessantemente, uma resposta policlonal contra eritrócitos singênicos envelhecidos foi observada. Ainda, células formadoras de placa por estimulação policlonal contra gama globulina também pode ser detectada tardiamente na infecção aguda durante um período de acentuada esplenomegalia e parasitemia ²¹⁵. Isto sugeriria, portanto, que ativação policlonal de células B pode ser responsável pela ampla diversidade em imunoglobulinas que ocorre nas infecções pelo *T. cruzi*. Ademais, ativação policlonal de células B foi descrita em camundongos BALB/c injetados com um extrato de formas tripomastigotas do sangue. Um aumento em células formadoras de placa contra hemácias de carneiro foi detectado quando os esplenócitos foram usados e o número de unidades formadoras de colônias na medula óssea

também aumentou quando foram administrados a camundongos singênicos, simultaneamente, o extrato do parasito com as células da medula. Resultados desses experimentos sugeririam que a ativação policlonal das células B pode estar relacionada à imunossupressão humoral observada em camundongos ²¹³. Entretanto, a comparação da cinética da resposta do anticorpo contra a infecção pareceu indicar que um grande número de células produtoras de imunoglobulinas estaria produzindo anticorpos específicos, que não poderiam ser resultantes de uma exaustiva ativação policlonal de células B ²¹⁶. De acordo com os últimos dados, depleção clonal seria excluída como uma base para imunossupressão.

Imunossupressão também tem sido descrita nos estágios crônicos das infecções pelo *T. cruzi* em camundongos. As respostas de células esplênicas formadoras de placas aos antígenos T-dependentes (trinitrofenil-BCG) e T-independentes (trinitrofenilficol) foram suprimidas em camundongos, três meses após as infecções pelo *T. cruzi*. ³³⁶ Camundongos com infecção aguda tiveram respostas de células formadoras de placas IgG suprimidas contra os antígenos T-dependentes e T-independentes, e respostas IgM normais a ambos antígenos. Esses resultados sugerem a persistência de células T supressoras não-específicas durante infecções crônicas pelo *T. cruzi* ³³⁶. Ademais, foi mostrado que camundongos infectados cronicamente com *T. cruzi* têm células supressoras antígeno-específicas que inibem a elicitação da reatividade retardada contra um antígeno do parasito. O fenômeno supressivo foi observado em animais com infecção crônica, mas não em animais imunizados com antígenos mortos de *T. cruzi*. No último caso, reação tipo retardada característica mostrou predominantemente infiltração mononuclear e pode ser transferida para recipientes normais com células. No primeiro caso, uma inchação da planta do pé iniciada após 3 horas e que persistia por 24 horas foi identificada histologicamente como reação de Arthus típica. Células T supressoras que foram detectadas em camundongos infectados cronicamente eram radiorresistentes e foram removidas da população de células esplênicas por fracionamento em coluna de lã de nylon e tratamento com soro ThY 1, 2 mais complemento ³³⁷.

As respostas de células esplênicas de camundongos infectados com *T. cruzi* aos ativadores policlonais de células T e B foram avaliadas nos estágios agudo e crônico ³³⁸. Respostas a fito-hemoaglutinina, concanavalina A e polissacaríde bacteriano ficaram reduzidas marcadamente até três semanas pós-infecção. Entretanto, as respostas obtidas aos três meses pós-infecção foram similares àquelas de células esplênicas de camundongos normais. Populações de linfócitos T e B que estavam relativamente reduzidas na fase aguda retornaram aos valores normais durante a fase crônica. Esses resultados sugerem que a transição das fases aguda para crônica da infecção pode ser imunologicamente regulada, depois do retorno das respostas dos linfócitos T e B aos valores normais ³³⁸. Em

outro estudo, foi mostrado que a imunossupressão de camundongos infectados cronicamente com ciclofosfamida levou a um retorno temporário às condições de infecção aguda. Recrudescência da parasitemia após imunossupressão sugere que mecanismos imunológicos mediados por células participam integralmente no controle da infecção e na manutenção do estado crônico^{249, 279, 339}.

J – DIAGNÓSTICO

A demonstração do *T. cruzi* no sangue dos indivíduos pode ser feita pelo exame microscópico direto do sangue infectado, na fase aguda. Nos estágios crônicos da infecção a parasitemia torna-se subpatente mas os parasitos ainda podem ser demonstrados pelo xenodiagnóstico em um número considerável de pacientes. A influência que reinfeções possam ter no aumento dos níveis de parasitemias ainda não foi determinada em áreas endêmicas. Não obstante, o percentual de pacientes em todos grupos etários com parasitemias demonstráveis pelo xenodiagnóstico variou de 36,7 por cento, quando 10 Triatomíneos foram examinados, a 58,7 por cento, quando 80 Triatomíneos foram usados para sugar o sangue de indivíduos infectados³⁴⁰. Um estudo longitudinal revelou que 59,8 por cento de um grupo de 346 pessoas de 1 a 12 anos de idade tinham xenodiagnósticos positivos. À medida que a doença torna-se crônica, a freqüência dos xenodiagnósticos positivos diminui cerca de 40 por cento em 10 anos de evolução³⁴¹. Vários fatores parecem influenciar o resultado de um teste. Proximidade do tempo de aquisição da infecção aguda é um fator importante que correlaciona com a freqüência com que um xenodiagnóstico positivo pode ser obtido. Em outro estudo de campo, todos os indivíduos soropositivos com menos de 5 anos de idade tinham parasitemia, enquanto somente um terço dos adultos soropositivos acima de 19 anos de idade foi positivo³⁴². Em um terceiro estudo de campo, a ausência de parasitemias demonstráveis após três xenodiagnósticos, cada um deles com 40 ninfas de primeiro estágio de *Dipetalogaster maximus*, foi notada em 47,4 por cento entre 292 pacientes que tinham mostrado, previamente, três testes sorológicos positivos para doença de Chagas³⁴³. Uma curva mostrando o percentual de indivíduos com parasitemias não-demonstráveis, de acordo com os grupos etários, aparece na Fig. 6. Hemocultura e subinoculação de tecidos infectados em animais de laboratório também têm sido usados para demonstrações parasitológicas do *T. cruzi*, mas com sucesso muito limitado.

Respostas imunes mediadas por células e humoral em indivíduos infectados com *T. cruzi* parecem persistir por toda a vida. Detecção de respostas imunes específicas a antígenos do parasito é, portanto, um método indireto confiável para diagnosticar infecções crônicas pelo *T. cruzi*. A esse respeito, muitos testes sorológicos têm sido aplicados com graus variáveis de sucesso. Imunodiagnóstico das infecções pelo *T. cruzi*

pode ser realizado por precipitação, floculação, aglutinação direta, hemaglutinação passiva, fixação do complemento, imunofluorescência e métodos imunoenzimáticos de reação ao anticorpo com antígenos do parasito ³⁴⁴. Muitos desses testes fornecem resultados específicos, e sua alta sensibilidade permite diagnóstico amplamente acurado da infecção. Entretanto, combinação de pelo menos dois desses testes, tais como imunofluorescência e hemaglutinação passiva ou fixação de complemento, tem sido recomendada naqueles pacientes em quem a demonstração parasitológica segura não foi obtida. Reações cruzadas com soros de pacientes com outras doenças infecciosas são achadas por todos os métodos sorológicos usados, o que está de acordo com a enorme diversidade antigênica que tem sido observada em *T. cruzi*. Em vista da discrepância entre os testes realizados em vários laboratórios, o bom controle de qualidade dos antígenos e reagentes, e o estabelecimento de padrões positivos e negativos de referência são extremamente necessários.

Um teste intradérmico muito simples e prático para o diagnóstico da doença de Chagas foi descrito recentemente ³²². (Fig. 5). Este teste consiste em registrar uma reação cutânea de hipersensibilidade retardada que segue à injeção do antígeno T12E do parasito*. Após vários estudos sobre a inocuidade, em coelhos, foi feito um inquérito pré-clínico em uma

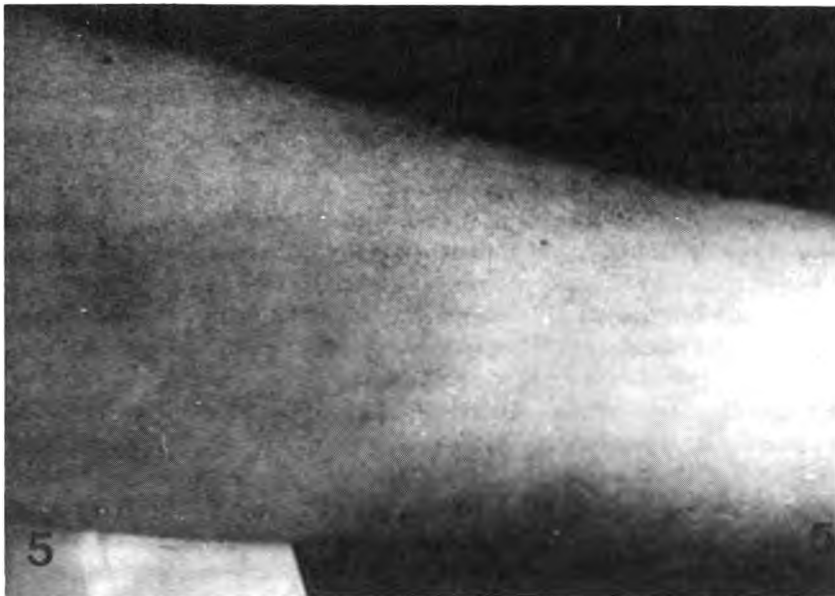


Fig. 5. Teste intradérmico para doença de Chagas: uma lesão cutânea indurada é vista no antebraço de um paciente 48 horas após a injeção de diminuta quantidade do antígeno T12E (vide texto).

área endêmica para doença de Chagas que mostrou resultados consistentes, quando comparados com aqueles obtidos com imunofluorescência e hemaglutinação passiva. Entre 842 indivíduos de um inquérito, 35,7 por cento tiveram teste cutâneo positivo e foram suspeitos de ter a infecção ativa pelo *T. cruzi*. Os testes sorológicos feitos nesses indivíduos mostraram 35 e 35,6 por cento de resultados positivos pela imunofluorescência e hemaglutinação, respectivamente. Aqui, se fica decidido aceitar como sendo um portador de *T. cruzi* toda pessoa que tem os testes de imunofluorescência e hemaglutinação positivos, isto resultaria que 33 por cento daquela população estaria infectada com *T. cruzi*, como fica demonstrado pela combinação dos resultados dados pelos testes sorológicos. Mais além, comparação dos resultados obtidos com esses testes sorológicos com aqueles obtidos com o teste intradérmico mostrou todos os três testes sendo consistentemente positivos em 88,2 por cento dos indivíduos, que devem ser considerados como portadores da doença de Chagas. Entretanto, uma correlação definitiva de co-positividade entre os testes sorológicos e intradérmicos foi encontrada em 93 pessoas que tinham resultados de xenodiagnósticos positivos. Hemaglutinação foi positiva em todos esses pacientes e a imunofluorescência foi positiva em 89 (95,7 por cento), enquanto o teste cutâneo permitiu a identificação de 87 (93,5 por cento) desses indivíduos infectados com o *T. cruzi*. Uma curva com a variação de intensidade das reações cutâneas de hipersensibilidade tardia, de acordo com os grupos etários, é mostrada na Fig. 6.

K – IMUNOPATOLOGIA

1. Hipersensibilidade de tipo retardado.

Ainda que hipersensibilidade de tipo retardado tenha sido reconhecida a longo tempo como um marco característico da imunidade mediada por células *in vivo*, e, como tal, usada como sinônimo, foi decidido aqui usar esses termos separadamente, porque isso beneficiará alguns aspectos práticos e úteis: 1) Elicitação da hipersensibilidade retardada evoca outros mecanismos imunes em adição à imunidade celular. isto tem sido caracterizado como um fenômeno em duas etapas, em que um evento menor, precoce, relacionado com ativação de mastócitos, antecipa um componente maior mediado por células T; 2) A imunidade mediada por células tem sido considerada como o principal mecanismo de resistência contra infecções pelo *T. cruzi*, enquanto a hipersensibilidade tardia tem sido implicada naquelas reações do tipo alérgico relacionadas com as lesões cardíacas e outras que resultam nas manifestações clínicas da doença de Chagas; 3) A despeito das tentativas iniciais de dissociar a imunidade mediada por células de seu componente tóxico (ou alérgico) de tipo retardado, os resultados obtidos foram desapontadores. Todavia,

as abordagens correntes que visam à imunoprofilaxia ainda restariam na possibilidade de encontrar um antígeno do parasito que evocaria a imunidade protetora sem produzir dano no hospedeiro. Nas páginas seguintes serão descritas as cascatas de eventos que culminam na hipersensibilidade tardia e a maneira pela qual esse tipo de reação pode se manifestar em indivíduos infectados pelo *T. cruzi*.

Reações de hipersensibilidade de tipo retardado são respostas imunes timo-dependentes típicas, mediadas por interações celulares seqüenciais. No curso de infecções pelo *T. cruzi* no homem e em animais experimentais, o desafio local com antígeno do parasito provoca uma resposta inflamatória na pele. Os eventos imediatos nessa reação são expressados pela inchação local resultante de alterações vasculares, congestão, aumento da permeabilidade vascular, eritema e edema. Nas horas seguintes esses aspectos exsudativos tendem a evanescer e a reação endurece constantemente, alcançando um máximo de 24-48 horas mais tarde^{118, 185, 284, 322, 337, 345-347}. O primeiro componente desta reação de hipersensibilidade retardada típica parece ser evocado por um fator antigênico derivado de célula T que ativa os mastócitos da pele³⁴⁸. Foi mostrado que a liberação de serotonina murina pelos mastócitos induz contração das células endoteliais de vênulas pós-capilares, causando frestas entre as células endoteliais, resultando em permeabilidade vascular aumentada. A importância desse primeiro componente tem sido determinada ou pelas reações deficientes de hipersensibilidade retardada em camundongos com defeitos genéticos que levam à deficiência de seus mastócitos ou pela sua inibição com drogas que depletam, antagonizam ou bloqueiam a liberação de aminas vasoativas pelos mastócitos³⁴⁹. Além disso, nem o fator antigênico nem as células T que mediam o componente inicial da hipersensibilidade tardia parecem ser H-2 restritos. A transferência passiva mostrou que o componente inicial também tem influência na ocorrência dos fenômenos tardios das reações retardadas dependentes de células T, as quais já se mostram independentes de mais liberação de aminas vasoativas pelos mastócitos. De fato, o componente retardado provavelmente depende da habilidade de uma segunda população de células T na liberação de linfocinas quimioatrativas, que causam recrutamento de células mononucleares e leucócitos polimorfonucleares, para infiltrar os sítios da reação³⁴⁹.

Reações cutâneas de hipersensibilidade do tipo retardado têm sido extensivamente estudadas em coelhos brancos Nova Zelândia infectados com *T. cruzi*, pelo desafio local com antígenos do parasito^{118, 345, 346}. Fortes reações cutâneas retardadas foram obtidas com antígenos microsossomais, enquanto outras reações de intensidades variáveis puderam ser obtidas com extratos totais de formas de *T. cruzi* e, em menor grau, com as proteínas solúveis ou antígenos citoplasmáticos. Por último, foi isolado um antígeno microssomal (T12E) de formas de cultivo do estoque

Ernestina do *T. cruzi*, que produz reações muito fortes de tipo retardado na pele de coelhos³²². Quando uma pequena quantidade de proteína contida nesse antígeno é injetada intradermicamente, uma cascata de eventos típica é estimulada, que causa lesão endurecida caracterizada histologicamente por infiltrado de células mononucleares, persistindo 24 horas ou mais. Pode acompanhar a lesão cutânea linfonodos satélites aumentados em alguns animais sensibilizados. Administração daquela quantidade de antígeno T12E, a cada semana, em coelhos normais, não determina reatividade cutânea, mesmo quando se repete o procedimento até quatro vezes, e os testes sorológicos não detectam anticorpos humorais específicos nesses animais submetidos a testes cutâneos repetidos. Transferência passiva de imunidade de coelhos infectados com *T. cruzi* para recipientes normais, foi obtida com células ou com extratos de células mononucleares do sangue periférico, mas não com soro. A imunidade adotiva tornou o recipiente sensibilizado, o que podia ser demonstrado pela produção da reação cutânea no animal, pela injeção do antígeno do parasito. As cinéticas das reações cutâneas de hipersensibilidade tardia foram estudadas em coelhos isogênicos III/J infectados com *T. cruzi*. Usualmente, reações cutâneas muito fortes, com engurgitamento de linfonodos satélites, foram observadas 15 dias pós-infecção. Trinta dias pós-infecção as reações tornaram-se mais fracas ou mesmo ausentes, e permaneceram fracamente positivas até o fim do terceiro mês. Daí em diante, os animais na fase crônica da infecção mostraram testes cutâneos cuja intensidade aumentava progressivamente, após injeções do antígeno do parasito, até alcançar a intensidade observada 15 dias pós-infecção (Fig. 8). Coelhos isogênicos-controle, normais, tiveram, consistentemente, respostas cutâneas negativas³⁴⁶.

O desenvolvimento precoce e a flutuação na intensidade das reações de hipersensibilidade também têm sido observadas em camundongos infectados com *T. cruzi*³⁴⁷. Hipersensibilidade cutânea de animais infectados contra um extrato do parasito foi observada como uma resposta modesta na segunda semana pós-infecção. Em seguida, a expressão da resposta pareceu seguir um descenso da parasitemia, quando o componente retardado da reação cutânea tornou-se aparente. Em adição às respostas cutâneas que têm sido obtidas em camundongos^{337, 347}, em coelhos^{118, 345, 346}, macacos³⁵⁰, e em humanos^{185, 322, 345, 351}, após a injeção local de antígenos do parasito, lesões inflamatórias que se assemelham a reações de hipersensibilidade de tipo retardado também têm sido vistas no coração, músculo esquelético e em outras estruturas teciduais de indivíduos infectados com *T. cruzi*. Por exemplo, as reações inflamatórias na porta de entrada do parasito no corpo (sinal de Romana e chagoma) são tipicamente lesões endurecidas caracterizadas por infiltrados linfocitários^{185, 275}. A miocardite crônica da doença de Chagas tem sido descrita como uma inflamação de tipo

alérgico com destruição de fibras cardíacas associadas com infiltrados linfocitários^{94, 185}. Interessantemente, mastócitos têm sido descritos consistentemente nos infiltrados inflamatórios³⁵²⁻³⁵⁴. Miosite e ganglionite que têm sido descritas em homens e animais experimentais também podem ser consideradas, com base no aspecto histopatológico, como reações típicas de hipersensibilidade retardada, em que as células-alvo do hospedeiro podem ser atacadas pelos linfócitos imunes¹⁸⁵.

2. *Patologia, hipersensibilidade tardia e parasitismo*

As lesões patológicas da doença de Chagas eram creditadas à ação isolada das formas intracelulares do parasito; a destruição da célula hospedeira pelo parasito, que pode ocorrer após vários ciclos de multiplicação, era considerada como a base da patogenia da doença de Chagas. A intensa inflamação que é a característica mais marcante da cardiomiopatia da doença de Chagas era entendida como resultante da ação de produtos tóxicos dos “pseudocistos” contendo parasitos, os quais seriam liberados depois da rutura. Entretanto, as primeiras descrições da miocardite aguda da doença de Chagas já referia a parasitismo quiescente de células teciduais, contrastando com lesões inflamatórias onde não havia parasitos^{23, 185}. De fato, lesões inflamatórias no coração, músculos esqueléticos e trato digestivo de pacientes com doença de Chagas crônica não estão usualmente associadas com a presença do parasito. Além disso, as tentativas de explicar a patogênese da doença de Chagas com base nas ações tóxicas e mecânicas do parasito deixaram de responder a muitas perguntas práticas, com amplas implicações nas abordagens que visam à imunoprofilaxia e quimioterapia, como sejam: Por que vários mamíferos, reservatórios naturais do *T. cruzi* não se tornam doentes em consequência das infecções? Por que as infecções agudas pelo *T. cruzi* em infantes e crianças usualmente passam despercebidas e usualmente cedem espontaneamente? Por que taxas elevadas de morbidade e mortalidade em doença de Chagas são freqüentemente encontradas após a fase aguda da infecção? Por que os parasitos são difíceis de serem demonstrados e não são associados às lesões encontradas nos indivíduos que falecem de doença de Chagas crônica?

Parece que as respostas a essas questões, que não puderam ser respondidas pelos conceitos antigos, devem agora ser procuradas pelo exame do papel que os mecanismos de imunidade exercem na modulação das relações parasito/hospedeiro. Por exemplo, o papel que as reações imunes têm na patogênese pode ser prontamente apreciado pelo exame das relações entre parasitemias, intensidade de reações cutâneas retardadas, produzidas por um antígeno do parasito, e a curva de mortalidade devido à doença de Chagas, como mostra a Fig. 6.

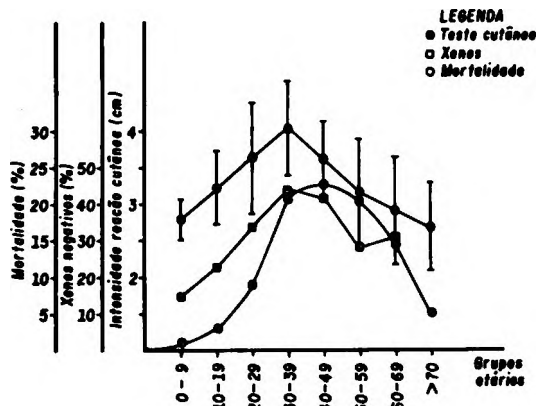


Fig. 6. Relação entre a intensidade das reações cutâneas de tipo retardado produzidas pelo antígeno do parasito (●—●), ausência de parasitemia demonstrada pelo xenodiagnóstico (■—■), e mortalidade devido à doença de Chagas (□—□). (Os dados sobre parasitemia foram uma cortesia de Castro, C. N., Tese, Universidade de Brasília, 1978).

Entre 137 autópsias em pacientes que faleceram diretamente em consequência da doença de Chagas no Hospital de Sobradinho, Universidade de Brasília, foi encontrado que 71,5 por cento dos pacientes faleceram quando tinham entre 30 a 50 anos de idade. Por outro lado, verificou-se que entre 842 pacientes que vivem numa área endêmica de doença de Chagas, as reações cutâneas de tipo retardada contra antígeno do parasito eram obtidas em pacientes entre 25 a 50 anos de idade. Entretanto, registros de parasitemias em pacientes nos grupos etários de 30 a 50 anos foram usualmente muito menos freqüentes do que em outros grupos etários. Isto quer dizer que a grande maioria dos pacientes em quem as parasitemias não puderam ser demonstradas pelos xenodiagnósticos também tinha, coincidentemente, as reações de hipersensibilidade tardia mais intensas, e isto correlacionou com as taxas mais elevadas de mortalidade (Fig. 6). Portanto, a relação negativa que tem sido observada entre os níveis de parasitemias e a presença de distúrbios digestivos e cardíacos severos, que são freqüentemente responsáveis pelas altas taxas de mortalidade encontradas na doença de Chagas, parece estar bem evidente. Por outro lado, altas taxas de morbidade coincidiram nos mesmos grupos etários com reações de hipersensibilidade tardia intensas. Essas coincidências tornam-se particularmente interessantes porque os parasitos não estiveram associados às lesões cardíacas e digestivas registradas para aqueles pacientes que faleceram de doença de Chagas. As lesões microscópicas típicas consistiram de miocitólise e neuronólise associadas a linfócitos que aderem à superfície do citoplasma de células hospedeiras não-parasitadas.

3. Modelo animal da doença humana.

Um modelo animal da doença humana deveria reproduzir os achados típicos à semelhança daqueles descritos em pacientes naturalmente infectados com *T. cruzi*^{345, 346}. Um modelo laboratorial conveniente seria de grande valor para os estudos de imunopatologia, imunoprofilaxia e avaliação dos efeitos quimioterapêuticos de drogas. A maioria dos estudos experimentais tem sido feita em camundongos e cães, que são muito susceptíveis ao *T. cruzi*^{345, 355, 356}. Entretanto, as observações em hospedeiros susceptíveis são usualmente limitadas à fase aguda da infecção, provavelmente devido às altas taxas de mortalidade que seguem à inoculação do parasito. Estoques virulentos de *T. cruzi* podem produzir infecções severas em camundongos, as quais usualmente são letais dentro de poucas semanas. Ainda que haja a possibilidade de que alguns camundongos infectados com *T. cruzi* possam sobreviver à fase aguda, não existem evidências conclusivas mostrando que os sobreviventes faleçam de doença de Chagas crônica. Modificações das condições relacionadas à infecção, tal como uso de inóculo pequeno, pela injeção de parasitos de baixa virulência ou pelo uso de cepas de camundongos relativamente mais resistentes, resultaram em taxas mais baixas de mortalidade. Entretanto, essas modificações das condições experimentais freqüentemente resultaram em infecções não-letais²⁸⁸. Em geral, camundongos e ratos com infecções crônicas pelo *T. cruzi* apresentam curso errático e os sintomas são sempre discretos³⁴⁶. Não obstante, já foi descrito que camundongos C3H infectados com formas sangüícolas de um isolado de *T. cruzi* proveniente da Colômbia pareceram desenvolver miocardite crônica progressiva e faleceram³⁵⁷. O modelo murino da doença de Chagas seria particularmente valioso em vista de sua vida média curta, a disponibilidade de numerosas cepas isogênicas e a grande quantidade de informações disponíveis sobre seu sistema imune. Não obstante, a grande maioria das observações que têm sido publicadas até o presente momento sugerem que infecções de camundongos pelo *T. cruzi* não se assemelham à doença de Chagas humana. Similarmente, a alta susceptibilidade de cães ao *T. cruzi* pode resultar em infecções agudas uniformemente fatais³⁴⁶.

Em contraste aos camundongos e cães, coelhos e alguns primatas são mais resistentes às infecções pelo *T. cruzi*. As parasitemias após inoculação de *T. cruzi* nessas espécies animais são usualmente auto-limitadas e duram poucos meses. O curso da doença de Chagas experimental em coelhos brancos Nova Zelândia tem sido estudado extensivamente^{55, 285, 345}. Esses coelhos usualmente mostram parasitemias patentes e chagomas típicos são vistos em alguns animais, caracterizando a fase aguda das infecções. Além disso, a infecção aguda do *T. cruzi* no coelho é usualmente assintomática e passa despercebida. A fase de

latência que segue as infecções crônicas assintomáticas é indicada por parasitemias subpatentes e ausência de alterações eletrocardiográficas (ECG), mas a persistência de testes sorológicos positivos e reações cutâneas de tipo retardada contra um antígeno do parasito são evidências de uma infecção progressiva. Alterações eletrocardiográficas consistentes com aumento e sobrecarga das câmaras cardíacas, arritmias, batimentos ectópicos, alterações S-T e diversos graus de bloqueios atrioventriculares são freqüentemente registrados na fase crônica da doença de Chagas. Têm considerável interesse o fato de que a sobrevivência da infecção pelo *T. cruzi* não foi relacionada com o nível, nem com a duração da parasitemia demonstrada em cada coelho infectado³⁴⁵. A Fig. 7 mostra que todos os

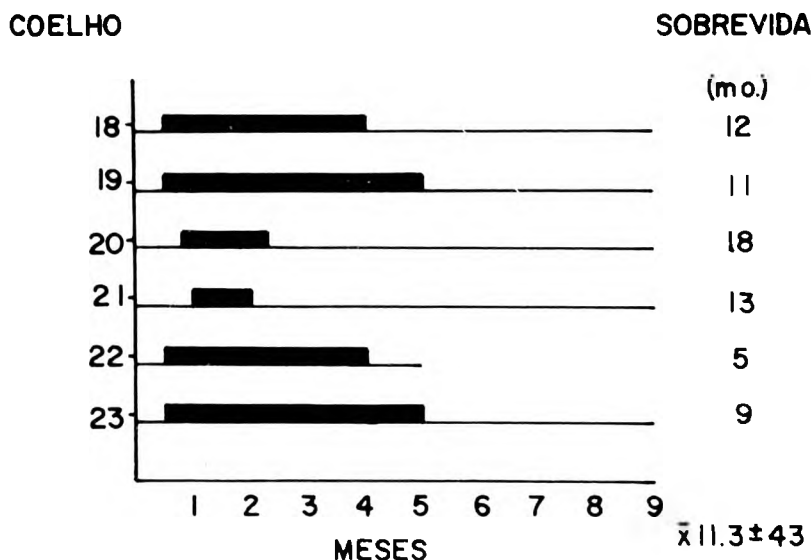


Fig. 7. Duração de parasitemias demonstráveis e sobrevivência às infecções pelo *T. cruzi* em coelhos brancos Nova Zelândia. As barras indicam uma fase da infecção com parasitemia patente; as linhas mostram as fases pré-patente e subpatente da infecção. (Reproduzido de Teixeira, A.R.L. e cols., ref. 345).

coelhos sobrevivem às infecções pelo *T. cruzi* enquanto em parasitemias patentes, mas morrem muitos meses depois quando as parasitemias não são mais demonstradas pelos xenodiagnósticos. Portanto, se a virulência do parasito, da forma que é indicada por sua habilidade de multiplicar-se na célula hospedeira e aparecer no sangue, é um determinante maior de patogenicidade na doença de Chagas, ela não pode ser relacionada aos níveis de parasitemia observados, provavelmente em consequência das respostas imunes do hospedeiro. Todas essas observações têm paralelismo com o que têm sido descrito em humanos naturalmente infectados com *T. cruzi*. Ademais, as manifestações patológicas de alterações do ECG foram confirmadas nas autópsias de cada coelho experimental. Insufi-

ciência cardíaca congestiva e tromboembolismo pulmonar relacionados à miocardite crônica da doença de Chagas foram causas freqüentes de morte. Doença de Chagas cardíaca foi considerada como diretamente responsável pela morte em 53 por cento dos coelhos e megacôlon chagásico foi considerado como causa de morte em 2,9 por cento dos animais. Em vista das observações de que parasitemias detectáveis foram relativamente limitadas, a falta de correlação entre parasitemias e severidade das manifestações patológicas, e o fato de que todos os animais infectados mostraram evidências histopatológicas de miocardite, assim como hipersensibilidade cutânea retardada a antígenos do *T. cruzi*, parece ser razoável acreditar que existe um modelo animal da doença humana³⁴⁵.

O curso das infecções pelo *T. cruzi* em coelhos isogênicos III/J mostrou, também, que as manifestações clínicas, parasitológicas, imunológicas e patológicas da doença de Chagas nesse modelo experimental são similares àquelas que têm sido descritas em humanos³⁴⁶. Os níveis de parasitemias observados em coelhos isogênicos inoculados com tripomastigotas clonados do estoque Ernestina foram determinados a cada semana pelo xenodiagnóstico. A resposta cutânea retardada ao antígeno T12E do parasito era averiguada antes de cada xenodiagnóstico e o tamanho de uma lesão endurecida no local de injeção do antígeno era medido 24 horas mais tarde. Os registros do ECG eram tomados imediatamente após a realização de cada xenodiagnóstico. Os resultados dos xenodiagnósticos, reatividade cutânea retardada e registros eletrocardiográficos, estão apresentados na Fig. 8. As parasitemias em coelhos isogênicos III/J

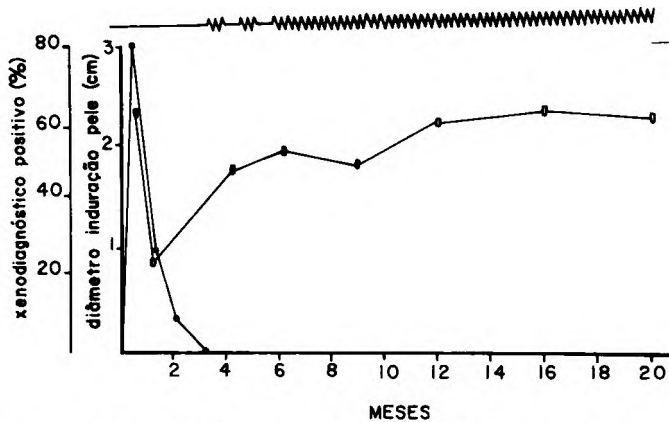


Fig. 8. Relações entre a duração das parasitemias demonstráveis (■—■), intensidade reações cutâneas de tipo retardado (●—●) e início e estabelecimento de alterações eletrocardiográficas (vetor ondulado acima) em coelhos isogênicos III/J infectados por *T. cruzi*.

duraram três meses e subsequentemente permaneceram consistentemente negativas. Entretanto, as alterações do ECG não foram encontradas durante a fase aguda da infecção, enquanto a parasitemia era patente. Alterações transitórias do ECG foram observadas durante o quarto e quinto meses de infecção e, em seguida, foi possível encontrar alterações persistentes do ECG. A mortalidade devida à doença de Chagas crônica foi observada nos coelhos infectados com *T. cruzi* muitos meses após a parasitemia ter-se tornado negativa, e as manifestações patológicas das alterações do ECG foram confirmadas na autópsia. (Fig. 9). Esses

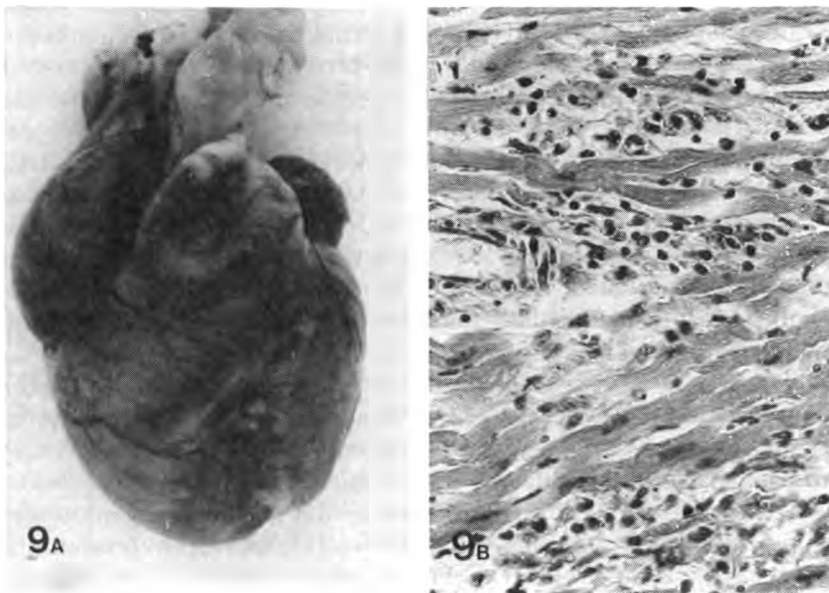


Fig. 9. a) Cardiomegalia em um coelho infectado pelo *T. cruzi*, que morreu de insuficiência cardíaca direita um ano após a inoculação do parasito. Note dilatação das câmaras cardíacas, com proeminência do cone da pulmonar e um grande átrio direito.

b) Secção histopatológica mostrando a miocardite típica da doença de Chagas: lise de células cardíacas pelos linfócitos na ausência do parasito *in situ*

experimentos sugerem que a morbidade e a mortalidade observadas no curso da doença de Chagas crônica em coelhos não estão relacionadas à parasitemia. Uma relação direta pode ser estabelecida entre a intensidade da reatividade cutânea de tipo retardada contra um antígeno do parasito e as manifestações patológicas da doença de Chagas. A exacerbação dos mecanismos imunes que induzem a resistência do hospedeiro à infecção parece, portanto, desempenhar um papel central na patogênese da doença de Chagas³⁴⁶.

4. Auto-imunidade na doença de Chagas

As pessoas normalmente não reagem contra seus próprios constituintes, a não ser que células imunocompetentes possam tornar-se sensibilizadas contra seus autocomponentes por imunógenos que tenham estruturas dissimilares, exceto um epitopo particular³⁵⁸, ou se o autocomponente tornar-se modificado (haptênizado) pelo imunógeno³⁵⁹. Conhecimento e reconhecimento de antígeno por linfócito T imunocompetente é bem diverso daquilo que corresponde às células B. Linfócitos T citotóxicos de roedores e de humanos parecem reconhecer determinantes antigênicos estranhos associados com o complexo maior de histocompatibilidade (MHC). Desta forma, os antígenos estranhos e os autocomponentes restritos ao MHC são reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos. Adicionalmente, tem sido descrito que as auto-estruturas não associadas ao MHC podem ser reconhecidas juntamente com os determinantes antigênicos estranhos. Portanto, autodeterminantes não-MHC restritos também podem ser envolvidos na geração de reações citotóxicas contra autocomponentes³⁵⁹. Em conseqüência de seu complexo mosaico antigênico, que varia durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* é capaz de induzir uma enorme variedade de respostas imunes ao hospedeiro vertebrado, algumas das quais dirigidas contra autocomponentes e não necessariamente restritas ao MHC.

Antígenos associados ao *T. cruzi* induzem respostas proliferativas e diferenciativas em clones de células imunocompetentes. Em conseqüência de sua diversidade antigênica, imunoglobulinas com especificidade relacionada a vários antígenos não-parasitários e linfócitos citotóxicos com atividade lítica espontânea contra células tumorais alogênicas têm sido descritos^{207, 211, 360, 361}. Tem sido sugerido que alguns produtos da resposta imune podem estar relacionados a uma vigilância imunológica aumentada nos animais infectados pelo *T. cruzi*^{361, 362}. Além disso, a presença de anticorpos de reação cruzada nos soros de animais infectados, reativos contra coração e fibras musculares esqueléticas^{55, 363}, células endoteliais e estruturas vasculares³⁶⁴, nervo periférico³⁶⁵, lamina³⁶⁶ e de fatores reumatóides e anticorpos antinucleares, seriam indicadores da possibilidade de um processo autoimune^{39, 367}. Por exemplo, a presença de anticorpos anticoração nos soros de pacientes com doença de Chagas e de animais experimentais infectados com *T. cruzi*, tem levantado a possibilidade de auto-imunidade, e alguns pesquisadores têm postulado que esses anticorpos desempenharam um papel na patogênese. Também, anticorpos reativos contra endocárdio, estruturas vasculares e interstício de músculo estriado (tipo EVI), que foram descritos em quase todos os casos de miocardite crônica chagásica e em aproximadamente a metade dos indivíduos assintomáticos, foram considerados como capazes de ativar o sistema do complemento. Graus

variáveis de lesão tecidual seriam esperados resultarem da presença dessas imunoglobulinas ligadas *in vivo*⁹². Entretanto, a descrição de anticorpos heterófilos que dão padrão de imunofluorescência indistinguível daquele do anticorpo EVI, em algumas pessoas de regiões onde não há doença de Chagas, parece não sustentar sua participação na patogênese^{212, 214}. Estudos de absorção desses anticorpos com *T. cruzi* sugeriram que a atividade EVI está direcionada contra um antígeno de reação cruzada presente tanto na célula hospedeira como no parasito³⁶⁸. A esse respeito, uma imunoglobulina presente nos soros de pacientes com doença de Chagas tem sido sugerida como marcador imunológico para células endoteliais de cérebro de roedores³⁶⁷. Também existe a sugestão de que o fator EVI possa ser um anticorpo contra muitos determinantes antigênicos presentes no coração, músculo esquelético e estruturas vasculares, a maioria dos quais dão reação cruzada com o *T. cruzi*²¹². Ademais, um anticorpo reativo com a bainha de Schwann de nervo periférico autonômico não-mielinizado e somático mielinizado foi encontrado em 85 por cento dos soros chagásicos examinados. Esse anticorpo pode ser absorvido com formas de *T. cruzi* liofilizadas³⁶⁶. Em outro estudo foi mostrado que soros de humanos com doença de Chagas e de macacos Rhesus infectados com *T. Cruzi* contêm IgM e IgG que reagem com estruturas de uma variedade de tecido conectivo³⁶⁶. Do maior interesse, esses anticorpos parecem ser específicos para laminina, uma glicoproteína da membrana basal que media a ligação de células epiteliais e endoteliais ao colágeno do tipo IV. Formas tripomastigotas e amastigotas puderam ser coradas fortemente em uma reação de imunofluorescência indireta usando esses anticorpos, após purificação em coluna de laminina-sefaroze. Portanto, isto parece ser uma evidência adicional mostrando que os soros de indivíduos infectados com *T. cruzi* contêm anticorpos de reação cruzada, que podem ser produzidos em resposta a moléculas parecidas à laminina, presentes no parasito³⁶⁶. A doença de Chagas ataca preferencialmente as fibras musculares e os neurônios autonômicos, parassimpáticos, e, portanto, o papel desses anticorpos, contra várias estruturas amplamente distribuídas no corpo, na patogênese da doença parece ser remota.

Tem sido descrito que o *T. cruzi* emergente após a replicação intracelular na célula hospedeira poderia adquirir certas características semelhantes à membrana da célula hospedeira³⁶⁹. A demonstração da reversibilidade de tal aquisição, resultante ou por deleção ou por endocitose pelo parasito, indicaria que um significado imunológico para esse fenômeno ainda não é indetectável. Em contraste, ligação de antígeno do parasito à membrana de células mamíferas pode resultar na indução de um ataque por células imunocompetentes. Antígenos do parasito têm sido localizados na superfície de células musculares e neuronais de culturas, infectados com o *T. cruzi*, os quais tornariam essas

células hospedeiras susceptíveis à lise imune^{282, 283}. Essa observação poderia esclarecer a destruição imune *in vitro* de células-alvo parasitadas, conforme se tem descrito²⁸³⁻²⁸⁶. A destruição de células hospedeiras parasitadas por linfócitos imunes na fase aguda da doença de Chagas pode ser um mecanismo primário de imunidade contra o *T. cruzi*. Entretanto, seria também uma reação auto-imune de alto risco no coração de indivíduos com a infecção aguda: a lise imune de células cardíacas parasitadas no hospedeiro mamífero pode ser extremamente perigosa na fase aguda da doença de Chagas quando o coração está intensamente parasitado. A destruição imune de milhares de miofibras prejudicaria a força de contração do coração e levaria à insuficiência cardíaca em alguns pacientes com forte reatividade a antígenos do parasito.

Em adição, um antígeno microsossomal de células cardíacas, que inibe a migração de células mononucleares do sangue de coelhos infectados com *T. cruzi*, já foi identificado⁹⁵. Resultados similares *in vitro* têm sido descritos em infecções humanas e de murinos^{185, 275, 285, 287, 288, 370, 371, 371a}. Todas essas observações indicam a presença de um determinante antigênico comum ao *T. cruzi* e à célula cardíaca, que pode ser reconhecido pela célula T imune. Portanto, o reconhecimento de antígeno de reação cruzada da célula cardíaca pelos linfócitos imunes pelo *T. cruzi* pode ser a base patogênica para a injúria subsequente da célula hospedeira na doença de Chagas^{95, 288}. De fato, linfócitos imunes aderem e lisam tanto as células cardíacas de coelhos como as humanas, parasitadas e não-parasitadas, *in vitro*^{95, 285}. Ademais, outros estudos mostraram que a liberação de Cr⁵¹ de células cardíacas fetais humanas é mediada por linfócitos T de pacientes com as formas aguda, latente, ou crônica da doença de Chagas²⁸⁷. Essas observações indicam que linfócitos T de pacientes sem evidência clínica da doença crônica (i. e., com a forma indeterminada) são tão citotóxicas para as células cardíacas como os linfócitos de pacientes com cardiomiopatia chagásica. O grau de órgão-especificidade dessa reação citotóxica foi indicado quando se observou que linfócitos imunes pelo *T. cruzi* não destruíram células hepáticas ou renais homólogas. A participação dos antígenos MHC (HLA) nessa reação citotóxica é pouco provável. O ataque de células cardíacas por linfócitos T imunes é órgão-específico e, portanto, a possibilidade de que células T alogênicas pudessem ter uma especificidade preformada para fibras cardíacas, mas não para as células renais, deve ser descartada²⁸⁷. Adicionalmente, a aderência de linfócito T de coelhos isogênicos III/J infectados com *T. cruzi* contra células cardíacas isólogas *in vitro* resultou na cessação das pulsações 1 hora após a encubação. Alterações morfológicas consistentes com lise das células-alvo apareceram 6 horas após na presença de células T efetoras. Além disso, a transferência passiva da doença cardíaca de camundongos BALB/c com infecções crônicas pelo *T. cruzi* para recipientes singênicos têm sido obtida por meio de células

imunocompetentes. Infiltrados linfocitários intensos e lise de células cardíacas foram observados no coração de camundongos dois dias após ter recebido células T imunes³⁷². O fato de que a lesão cardíaca possa ser induzida por imunizações repetidas com frações subcelulares de *T. cruzi* favoreceria o conceito atual de que a citotoxicidade pode resultar de um antígeno de reação cruzada, comum a ambos, ao *T. cruzi* e ao tecido cardíaco⁵⁵. Evidências em favor da associação *in vivo* entre os linfócitos imunes e as células foram também obtidas de biópsias de miocárdio, onde foram observadas íntimas interações entre células-alvo e efetoras, com imbricação das membranas plasmáticas, desaparecimento da lâmina basal e da membrana sarcolemal-alvo, permitindo assim aos prolongamentos citoplasmáticos da célula efetora inserirem-se nas estruturas miofibrilares do sarcoplasma das células cardíacas^{93, 285, 292}. Em conjunto, todas estas observações sugerem que a destruição das células cardíacas pelos linfócitos T imunes pode ocorrer a qualquer momento no curso da infecção pelo *T. cruzi*. O progresso rápido da doença em humanos, numa ocasião em que os pacientes passam da fase latente totalmente assintomática para a fase crônica, em que os sintomas cardíacos e digestivos podem se manifestar, pode ser considerado um efeito de viragem, que só é aparente depois que a capacidade dos órgãos envolvidos na compensação pela perda de suas células alcança seu limite³⁹.

Outras manifestações da doença de Chagas estão relacionadas com a presença dos “megas” nas fases crônicas das infecções pelo *T. cruzi*. O desenvolvimento de atividade antineuronal durante a infecção não parece ser uma consequência de lesão associada ao parasitismo tissular, mesmo porque parasitismo de células ganglionares é praticamente impossível de demonstrar. Vários graus de neuronólise associada com infiltração linfocítica dos gânglios parassimpáticos têm sido descritos em animais experimentais e em pacientes com doença de Chagas. A esse respeito, antígenos neuronais e do *T. cruzi* têm sido reconhecidos por um anticorpo monoclonal gerado contra gânglios da raiz dorsal de mamíferos, os quais são importantes no estudo dos eventos patogênicos que acontecem neste distúrbio³⁵⁸. Isso poderia explicar, por exemplo, a afinidade seletiva de linfócitos de coelhos chagásicos para neurônios parassimpáticos³⁷³. O papel de mecanismos auto-imunes na destruição de células neuronais do tubo digestivo não pode ser descartado com base na aderência de linfócitos e lise de células ganglionares observadas quando preparações de gânglios do parassimpático intestinal foram encubados com células mononucleares de coelhos chagásicos crônicos³⁷³. A despopulação de células ganglionares parassimpáticas do plexo mioentérico, observada nesta doença, têm permitido a muitos pesquisadores estabelecer uma relação direta entre este achado morfológico e a presença de megasôfago e/ou megacólon. Todavia, outros estudos são necessários para esclarecer muitos aspectos da patogênese. A base molecular das reações auto-

imunes levando à destruição de células do hospedeiro na doença de Chagas permanece desconhecida.

Outras manifestações auto-imunes da doença de Chagas foram descritas ultimamente. Pacientes naturalmente infectados com *T. cruzi* podem produzir anticorpos antinucleares e anticorpos que se assemelham ao fator reumatóide^{366, 374}. Esse fator reumatóide foi demonstrado ser uma imunoglobulina M altamente reativa com gamaglobulina, o que sugere que ele é verdadeiro auto-anticorpo. Fatores reumatóides foram descritos em 95 por cento dos pacientes a partir do início da doença até um ano e em 25 por cento dos pacientes com a doença de Chagas crônica³⁷⁴. Também tem sido descrito o envolvimento muscular nesta tripanossomíase^{92, 93, 375, 376}, enquanto síndrome polimiosítica foi descrita como um achado importante da doença de Chagas em um paciente com artrite reumatóide³⁶⁶. A associação entre outras doenças auto-imunes e doença de Chagas deve ser esperada, mas este campo de investigação tem sido negligenciado. Entretanto, em um trabalho experimental foi demonstrado que aberrações auto-imunes subjacentes podem contribuir para as conseqüências imunopatológicas da doença de Chagas.

Em um estudo, quatro cepas isogênicas de camundongos possuidoras de um gene auto-somal recessivo (1 pr), que controla certas manifestações auto-imunes, foram altamente susceptíveis a infecções pelo *T. cruzi*. Esses resultados mostram que o gene 1 pr, que controla certas manifestações auto-imunes, foram altamente susceptíveis a infecções pelo *T. cruzi*. Esses resultados mostram que o gene 1 pr, que controla a linfoproliferação e está associado com auto-imunidade, pode influenciar o resultado da infecção. Em outro estudo, verificou-se também que camundongos das cepas BXSB e NZB, susceptíveis a desenvolver doenças auto-imunes, tiveram alta susceptibilidade a infecções agudas pelo *T. cruzi*. Enquanto as fêmeas BXSB, que só tardiamente têm doença auto-imune, recuperaram-se de infecções com tripanossomos virulentos, os machos BXSB-Y^{sb}, que desenvolvem, precocemente, doença auto-imune apresentaram alta mortalidade. Fenômeno similar foi observado com camundongos NZB, altamente susceptíveis ao *T. cruzi*, enquanto os camundongos NZW e NZB/W eram resistentes. Esses dados indicam que a maior susceptibilidade dos camundongos BXSB-Y^{sb} e NZB ao *T. cruzi* deve ser controlada, geneticamente, por fatores associados aos genes 1pr e Y^{sb}.^{377, 377a}

Os estudos sobre imunopatologia da doença de Chagas mostram que mecanismos de auto-imunidade intensos podem se estabelecer precocemente no curso da infecção e que esses mecanismos podem se perpetuar no curso da doença de Chagas crônica por estimulação antigênica continuada. Ademais, a demonstração de que a citotoxicidade de linfócitos T imunes para células cardíacas guarda certa relação com a

intensidade da resposta cutânea de hipersensibilidade retardada a antígenos do *T. cruzi*, parece indicar que pacientes com respostas cutâneas intensas contra os antígenos podem ter o potencial para desenvolver lesões cardíacas e digestivas vistas na doença. A investigação do papel dos mecanismos auto-ímmunes na patogênese da doença de Chagas parece explicar, satisfatoriamente, a variação da severidade da fase aguda e, também, a latência e as manifestações tardias da doença de Chagas crônica. Em conjunto com os mecanismos naturais de resistência, a imunidade adquirida é apenas parcialmente eficiente no controle das infecções pelo *T. cruzi* em mamíferos e, a despeito de diminuir a parasitemia, o hospedeiro imunizado permanece infectado indefinidamente²⁴. Desgraçadamente, a imunidade adquirida na doença de Chagas parece ter um efeito secundário, pois as evidências disponíveis indicam que a destruição auto-ímmune das células-alvo nessa doença é produzida por hipersensibilidade retardada mediada por linfócitos T sensibilizados pelo *T. cruzi*. Esta interpretação explicaria a razão da alta prevalência de manifestações clínicas da doença em pacientes sem parasitemia demonstrável.

L – IMUNOPROFILAXIA

Evidências experimentais deixam pouca dúvida de que a significativa resistência adquirida contra o *T. cruzi* resulta de imunizações prévias. Essas evidências estão de acordo com as primeiras observações, mostrando que o homem e animais de experimentação, sobreviventes de infecções agudas, não sofrem recrudescência clínica de suas doenças após reinfecções. Além disso, outros fatores que são considerados como impeditivos da obtenção de imunoprofilaxia prática contra malária e Tripanossomíase Africana, tais como o fato da imunidade protetora ser específica para o estágio do parasito e a demonstração de variações antigênicas, respectivamente, não têm sido descritos na tripanossomíase americana^{138, 297}. De fato, a imunidade adquirida que tem sido obtida com vários estoques de *T. cruzi* tem produzido algum grau de resistência contra desafio com qualquer estágio do ciclo evolutivo do *T. cruzi*. Todas essas observações sugeririam que, na prática, a imunoprofilaxia contra a doença de Chagas seria alcançada. Entretanto, essas observações parecem ser ultrapassadas por muitas dificuldades encontradas nos estudos que visam à obtenção da vacinação contra uma infecção crônica por protozoário. Os problemas remanescentes após muitas tentativas de produzir uma vacina efetiva contra a doença de Chagas serão discutidos a seguir. Os resultados da imunoproteção experimental obtida com “vacinas vivas” são mostrados nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1

IMUNOPROTEÇÃO EXPERIMENTAL CONTRA INFECÇÕES AGUDAS PELO *T. CRUZI*¹a) "VACINAS VIVAS" CONTRA ESTOQUES HOMÓLOGOS DE *T. CRUZI*

Referência/ano	Método de obtenção de infecções atenuadas	Hospedeiro	Estoque <i>T. cruzi</i>	Sobrevivência	Parasitemia*
INFECÇÕES PELO <i>T. CRUZI</i> VIVO ATENUADO					
378/1950	Bayer 7602	camundongo	DBH	100% sobrevivência indefinida	+
379/1952	Primaquina	camundongo	Tulahuén	100% após (?)	+
380/1963	Formas de cultivo	camundongo	Y	maior que controles	+
381/1968	Passagens seriadas em cultura	camundongo	Y	90% após 80 dias	+
382/1969	Passagens seriadas em culturas	cão	Y	100% após (?)	+
383/1972	Formas de cultura	camundongo	D1	80 a 100% após nove meses	+
384/1975	Passagens seriadas	camundongo	Y (PF)	Indefinida	+
385/1967	Furaladona	camundongo	Retenice, FL	100% após 11 dias	+
386/1982	Passagens seriadas em culturas	camundongo	Tulahuén	maior que controles	+
387/1982	Passagens seriadas em culturas	coelho	Tulahuén (TCC)	não publicada	+
297/1982	Baixo inóculo de formas sanguíneas	camundongo	Y	não publicada	+
388/1983	Baixo inóculo de formas sanguíneas	camundongo	Y, F	maior que controles	+
<i>T. CRUZI</i> VIVO, NÃO-PROLIFERANTE					
389/1981	Tripaflavina	camundongo	?	100% após 90 dias	+
390/1966	Actinomicina D	camundongo	Y	100% após 13 dias	+
391/1976	Irradiação	camundongo	Y	mesmo que controles	+
392/1976	Irradiação	camundongo	Brasil	100% após 6 semanas	+
393/1980	Irradiação	cão	Brasil	mesmo que controles	+
394/1981	Mitomicina	camundongo	Brasil	mesmo que controles	+
395/1982	Bioneto de etídio	macaco	Brasil	Indefinido	+
396/1982	Irradiação	camundongo	Tulahuén	mesmo que controles	+

¹ Adaptado e aumentado da Ref. 357

* +, parasitemia presente; - parasitemia não-demonstrável.

1. Vacinas vivas atenuadas

a) Imunoproteção contra *T. cruzi* homólogo.

Os procedimentos usados e os resultados obtidos nos estudos de vacinação com infecções vivas atenuadas são mostrados na Tabela 1. Em geral, os animais que receberam uma infecção primária sobreviveram ao desafio com estoques homólogos de *T. cruzi*, usualmente por tempo mais longo do que os animais-controle. Obviamente, a premunição produziu algum grau de proteção contra doença de Chagas aguda em camundongos e cães, que são muito susceptíveis às infecções e freqüentemente morrem precocemente na fase aguda da tripanossomíase. Entretanto, os animais imunizados continuam a albergar o parasito e não se tem conhecimento de relato no qual os animais vacinados seriam indicados como tendo morrido ou não de doença de Chagas crônica.

Parece que uma vacina constituída de parasitos vivos atenuados não pode ser aceitável porque podem produzir infecções subpatentes, que produziriam mecanismos de auto-imunidade relacionados à patogênese

da doença. De fato, evidências clínicas e experimentais mostram que humanos, macacos e coelhos, que são relativamente resistentes e usualmente sobrevivem às infecções agudas, mostram as taxas mais elevadas de morbidade e mortalidade devido à doença de Chagas crônica, quando eles estão em parasitemias subpatentes e apresentam reações de hipersensibilidade cutânea muito intensas. A possibilidade de que a inoculação de camundongos com *T. cruzi* Tulahuén (TCC), atenuado por passagens seriadas em culturas, poderia induzir imunidade estéril não deve ser considerada^{384, 386}, pois todos os demais experimentos que aparecem na Tabela I não confirmam tal observação. Em sentido oposto, têm sido amplamente descrito que uma vez que o *T. cruzi* instala-se no corpo do hospedeiro ele permanece lá, quiçá, por toda a vida, como fica indicado pelos testes sorológicos persistentemente positivos. Por exemplo, quando as chamadas cepas TCC atenuadas foram injetadas em coelhos, foram obtidas hemoculturas positivas³⁸⁷. Além disso, coelhos não-imunizados usualmente sobrevivem à infecção aguda³⁴⁵, à semelhança do que aconteceu com os coelhos imunizados com parasitos atenuados³⁸⁷. A avaliação dos benefícios da vacinação não deve se limitar apenas ao período inicial do tempo após a reinfecção e, portanto, deve aguardar o aparecimento ou não de manifestações tardias da doença. Entre as vantagens de ter um modelo animal da doença humana parece estar exatamente a necessidade de avaliar os benefícios tardios de vacinações. Lamentavelmente, o seguimento dos animais com doença de Chagas crônicas, inoculados com estoques de *T. cruzi* vivos, atenuados, e desafiados com parasitos virulentos, não tem sido publicado na literatura.

Várias tentativas foram feitas para produzir uma vacina viva, não-proliferativa, que evitasse com sucesso o inconveniente dos procedimentos com vacinas vivas atenuadas, discutidas acima. Vários métodos foram usados para tornar o parasito incapaz de multiplicar-se (Tabela 1). Vários graus de sucesso foram descritos quando foram usados tripaflavina³⁸⁹, actinomicina D³⁹⁰, mitomicina C³⁹⁴ e brometo de etídio³⁹⁵. Além disso, radiação ionizante também tem sido usada para tornar o parasito não-infectivo³⁹¹⁻³⁹⁴. Procedimentos padronizados para monitoração da não-infectividade do *T. cruzi* tratado por métodos físicos e químicos consistiram de inoculação em camundongos e em culturas de células, seguidos de tentativas de recuperação dos parasitos ou através de subinoculações ou de subculturas^{390-396, 419}. Quando parasitos tratados com tripaflavina ou actinomicina D foram inoculados em camundongos, observou-se um aumento da resistência que tornou os animais vacinados protegidos parcialmente contra desafio com formas virulentas de *T. cruzi*, conforme foi julgado pela diminuição da mortalidade^{389, 390}. Resultados discrepantes têm sido descritos com a preparação do parasito vivo tornado não-infectante pelo tratamento com brometo de etídio. Vacinação de *Macaca fascicularis* e *Cebus appela* resultou em uma proteção considerável contra

desafio com o estoque Brasil do parasito virulento³⁹⁵. Entretanto, camundongos e cães que receberam vacina atenuada pelo brometo de etídio não se tornaram protegidos contra o desafio^{404, 420}. Uma abordagem interessante com respeito à avaliação da proteção imune consistiu em enviar cães vacinados para uma área onde a transmissão ativa pelo vetor podia acontecer. A prontidão com que 49 cães vacinados e 41 cães normais adquiriram doença de Chagas foi observada durante o período de um ano. Este método de avaliação da eficácia da vacinação permitiu demonstrar que dos 14 animais que adquiriram as infecções, oito haviam sido vacinados e seis eram controles. A prontidão da aquisição da infecção para ambos grupos, vacinados e controles, foi calculada como sendo da ordem de aproximadamente 15 por cento/ano. Porém, existe a possibilidade de que diferentes espécies de animais adquiriram infecção pelo *T. cruzi* com graus diferentes de prontidão. De fato, a afinidade do vetor foi mostrada ser quatro vezes maior para cães do que para humanos⁴²¹. Esses resultados parecem ter importância prática porque, em adição às diferenças com respeito ao potencial de gravidade da infecção, também levantam a questão sobre o aspecto de que espécies de animais mais resistentes teriam maior dificuldade de adquirir as infecções pelo *T. cruzi* do que as espécies susceptíveis. Assim as observações de que vacinas atenuadas pelo brometo de etídio teriam produzido graus diferentes de proteção em macacos, cães e camundongos, poderiam ser explicadas com base nos diferentes níveis de resistência e susceptibilidade que se encontram nessas espécies de animais. Similarmente, tentativas de imunizar camundongos e cães com culturas irradiadas de *T. cruzi* induziram diversos graus de proteção ou mesmo nenhuma proteção. Enquanto alguns camundongos imunizados sobreviveram após desafio com *T. cruzi* virulento, outros experimentos mostraram que a vacina era totalmente ineficaz^{391, 392, 396}. Além do mais, quando os parasitos vivos, irradiados, não-proliferantes, foram inoculados em cães, as parasitemias observadas após o desafio eram muito mais baixas do que aquelas observadas nos grupos não-imunizados. Nesses experimentos, não ocorreu morte nem parasitemia nos cães não-infectados, mas apenas vacinados com parasitos irradiados ou com cultura de células Vero irradiada³⁹³. Não obstante, a mortalidade precoce foi mais alta após o desafio dos cães vacinados do que entre os cães não-vacinados, apenas infectados com *T. cruzi*. Mais de 87 por cento dos animais vacinados morreram antes da quinta semana da infecção, e o estudo histopatológico dos corações mostraram severa miocardite granulomatosa, necrotizante³⁹³. Por fim, as tentativas de imunizar camundongos susceptíveis com parasitos tratados com mitomicina-C, não-replicáveis, não encontraram melhor sucesso a despeito do pequeno aumento da sobrevivência dos camundongos imunizados, quando comparado com os camundongos-controle, não-imunizados. De maior interesse foi ter observado que os

TABELA 2

IMUNOPROTEÇÃO EXPERIMENTAL CONTRA INFEÇÕES AGUDAS PELO *T. CRUZI*¹b) "VACINAS VIVAS" CONTRA ESTOQUES HETERÓLOGOS DE *T. CRUZI*

Referência/ano	Hospedeiro	Infeção (Estoque de <i>T. cruzi</i>)	Desafo (Estoque de <i>T. cruzi</i>)	Sobrevivência	Parasi- temia*
398/1918	camundongo	Bahia	Chagas	45% após 100 dias	+
378/1950	camundongo	Brasil	WBH	100% sobrevivência indefinida	+
"	"	Culbertson	WBH	100% sobrevivência indefinida	+
"	"	Panamá	WBH	100% sobrevivência indefinida	+
"	"	Macaco	WBH	100% sobrevivência indefinida	+
"	"	Tatu	WBH	100% sobrevivência indefinida	+
"	"	Texas	WBH	100% sobrevivência indefinida	+
399/1959	çães	Houston	C. Christi	100% após 70 dias	-
"	"	Houston	Brasil	" " " "	+
"	"	C. Christi	Brasil	" " " "	+
"	"	Patuxent	Brasil	" " " "	+
400/1961	camundongo	FH4-preguiça	Tulahuén	Mais longa que controles	+
"	"	FH4-preguiça	"	Mais longa que controles	+
"	"	OR21-preguiça	"	Mais longa que controles	+
"	"	FR4-preguiça	"	Mais longa que controles	+
"	"	Raposa	"	Mais longa que controles	+
"	"	Gambá	"	Mais longa que controles	+
"	"	C. Christi	"	Mais longa que controles	+
"	"	Brasil	"	Mais longa que controles	+
"	"	Macaco	"	Mais longa que controles	+
380/1963	camundongo	L	Y	Mais longa que controles	+
"	"	M	Y	Mais longa que controles	+
"	"	8857	Y	Mais longa que controles	+
"	"	OPF	Y	Mais longa que controles	+
"	"	8717	Y	Mais longa que controles	+
385/1967	camundongo	Berenice	FL	100% após 11 dias	+
"	"	FL	Berenice	100% após 11 dias	+
401/1967	camundongo	C. Christi	Brasil	Mais longa que controles	+
382/1969	camundongo	PF	M 1418	Mais longa que controles	+
"	"	PF	Berenice	Mais longa que controles	+
382/1969	camundongo	PF	ABC	Mais longa que controles	+
"	"	PF	RC 1729	Mais longa que controles	+
402/1969	camundongo	Estoque 7	Peru	100% após 3 meses	+
403/1970	camundongo	Colombiana	Y	Mais longa que controles	+
383/1972	camundongo	Mary	D1	80 a 100% após 9 meses	+
"	"	CC	D1	" " " "	+
"	"	Tulahuén	Brasil	100% após 100 dias	+
"	"	FH5	"	" " " "	+
"	"	FH4	"	" " " "	+
"	"	CDC	"	" " " "	+
414/1978**	çães	Brasil	Unai	O mesmo que controles	+
"	"	Brasil	São Felipe	O mesmo que controles	+
"	"	Brasil	Y	O mesmo que controles	+
405/1983	camundongo	2	Y	Não-indicada	+
"	"	2	CL	Não-indicada	+
"	"	5	Y	Não-indicada	-
"	"	5	CL	Não-indicada	+
"	"	7	Y	Não-indicada	-
"	"	7	CL	Não-indicada	-
"	"	8	Y	Não-indicada	+
"	"	8	CL	Não-indicada	+

1. Adaptada e aumentada da referência 397.

* + parasitemias patentes; - parasitemias não-demonstráveis.

** Çães foram imunizados com formas de cultura de *T. cruzi*, não-proliferantes, atenuadas com brometo de etídio - e desafiados com estoques heterólogos de *T. cruzi*.

parasitos atenuados induziram uma supressão transitória da resposta imune a alo-antígenos, que estava presente uma semana após a imunização e durava duas semanas³⁹⁴. Porém, permanece ainda para ser discutido aqui aquela tentativa curiosa de imunizar camundongos com

formas de *T. cruzi* mantidas em câmaras de miliporo implantadas na cavidade peritoneal. Após 21 dias, os camundongos que receberam as câmaras de difusão contendo formas epimastigotas desenvolveram discreta imunoproteção marginal. Todavia, os parasitos nas câmaras mostravam alterações cíclicas e um pequeno aumento no seu número foi observado por certo tempo²³⁸.

b) *Imunoproteção contra estoques heterólogos de T. cruzi*

A Tabela 2 mostra bem como a imunoproteção experimental contra estoques heterólogos de *T. cruzi* tem sido exaustivamente estudada. Em geral, graus variados de imunoproteção foram descritos, como ficou indicado pelo aumento da sobrevivência de alguns animais vacinados e pela abreviação das parasitemias na fase aguda da infecção. Todos esses experimentos têm ganho uma maior importância à medida que eles mostram, consistentemente, reatividade cruzada entre mais de 50 estoques de *T. cruzi* obtidos de diferentes fontes e provenientes de várias regiões geográficas do Continente Americano, desde o Sul dos Estados Unidos até o Sul da Argentina. Em outras palavras, a reatividade cruzada que se expressa por graus variados de imunoproteção tem servido como mais um meio de classificar um novo flagelado *Stercoraria* como sendo *T. cruzi*. Além disso, esses estudos têm mostrado que camundongos e cães amplamente imunizados permanecem como parasitemias positivas e, portanto, retêm o potencial de alta susceptibilidade para desenvolver as lesões patológicas da doença de Chagas. A enorme versatilidade de vários estoques de *T. cruzi*, que foram isolados recentemente de infecções humanas agudas naturalmente adquiridas, também pode ser observada⁴⁰⁵. Tem-se verificado que muitos desses produzem baixas parasitemias após inoculação em camundongos susceptíveis (Tabela 2). Observou-se que camundongos que receberam 10^5 tripomastigotas sanguíneas de qualquer desses estoques sobreviviam freqüentemente às infecções agudas e evoluíam para cronicidade. De mais interesse, os sobreviventes ficaram protegidos contra uma infecção desafiante com os estoques de *T. cruzi* Y e CL, altamente virulentos, mantidos no laboratório por passagens seriadas em camundongos⁴⁰⁵. Os resultados desses experimentos são similares àqueles em que os chamados parasitos "avirulentos" foram usados³⁹⁸⁻⁴⁰⁴. Uma palavra de precaução deve ser colocada aqui, com respeito ao conceito de avirulência ou de baixa virulência de certos estoques de *T. cruzi*, antes que o comportamento em várias espécies de hospedeiros tenha sido cuidadosamente determinado. Em certo estudo, a infectividade relativamente baixa de formas de cultura do estoque Corpus Christi (CC) do *T. cruzi* permitiu o uso dessas formas do parasito para avaliar a proteção imune em seis cepas isogênicas de camundongos, contra o desafio com o estoque virulento do *T. cruzi* Brasil. A infecção CC

produziu alguma proteção contra o *T. cruzi* mais virulento em quatro das seis linhagens de camundongos. Verificou-se que os camundongos C3H-HeJ e C57BR-cdJ foram muito menos protegidos do que os LAF₁ e SWR-J⁴⁰¹. Em conjunto com os fatores da imunidade natural, a vacina viva pareceu ser responsável pela maior sobrevivência observada nas duas últimas cepas de camundongos.

Ainda que vacinas vivas atenuadas possam induzir algum grau de resistência adquirida contra a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, seu uso em medicina humana e veterinária é inaceitável porque os chamados estoques avirulentos podem produzir doença de Chagas crônica. Vacinação em massa aumentaria, portanto, o número de indivíduos infectados e, como conseqüência, a dinâmica da transmissão seria reforçada. Além disso, nenhum dos experimentos sumariados nas Tabelas 1 e 2 fizeram referência às questões relativas à mortalidade subsequente dos animais vacinados, devido à doença de Chagas crônica. O envolvimento da auto-imunidade na doença de Chagas sugere que os prospectos relativos ao desenvolvimento de uma vacina com estoques de *T. cruzi* avirulentos ou atenuados, não são promissores. Também, aqueles experimentos que foram feitos com parasitos da família Trypanosomatidae, visando à indução de resistência contra o *T. cruzi*, resultaram sem sucesso¹⁶⁰. Entre os vários tripanossomatídeos que foram testados, imunoproteção marginal foi observada apenas com *Leptomonas samuelpessoi*^{422, 423}, um protozoário monogenético de inseto não-patogênico. Esta linha de pesquisa está, atualmente, desacelerada.

2. Vacinas mortas

Foram feitas muitas tentativas de produzir vacinas com o *T. cruzi* morto ou com seus produtos, como se verifica na Tabela 3. Muitas investigações têm mostrado o valor protetor das formas mortas do parasito, quando usadas como agente imunizante. Imunoproteção parcial tem sido descrita em muitos experimentos e a imunidade não-estérel tem sido considerada responsável pelo aumento da sobrevivência dos animais após desafio com estoques homólogos ou heterólogos de *T. cruzi*. Em um estudo⁴¹⁴, os camundongos vacinados com vacina de epimastigotas, preparada por congelamentos e descongelamentos, resistiram ao desafio com 2×10^4 tripomastigotas Y virulentos. Entretanto, o desafio com apenas dois parasitos infectantes produziam infecções subpatentes e persistentes nos camundongos vacinados. Ficou evidente que a vacina capaz de evitar a morte de camundongos vacinados e desafiados com muitos tripanossomas não era capaz de impedir o estabelecimento de uma infecção persistente, mesmo quando o animal era desafiado com apenas dois protozoários⁴¹⁴. As tentativas de avaliação histopatológica de lesões teciduais nos camundongos vacinados com um antígeno flagelar, e

TABELA 3

IMUNOPROTEÇÃO EXPERIMENTAL CONTRA INFECÇÕES AGUDAS PELO *T. CRUZI*¹

"VACINAS MORTAS": PARASITO INTEIRO OU SEUS PRODUTOS

Referência /ano	Hospedeiro	T. Cruzi (Estoque)	Antígenos Mortos (Método)	Desafio (Estoque T. cruzi)	Sobrevivência
VACINA COM TODO MOSAICO ANTIGÊNICO DO PARASITO					
406/1946	Macaco		Timersol	?	Mesma que controles
578/1950	camundongo	Panamá	Formalina	WRH	" "
		Texas	Formalina	WRH	" "
	"	WBH	Formalina	WRH	" "
		WRH baço	Liofilização	WRH	Pouco efeito
407/1959	camundongo	Y	Triturade	Y	Maior que controles
408/1961	camundongo	Tulahuén	Timersol	Tulahuén	Mesma que controles
409/1963	camundongo	Y	Congelamento/ descongelamento	Y	Maior que controles
410/1964	camundongo	Brasil	Ultra-sonicação	Brasil	" "
411/1965	camundongo	Y	Liofilização	Y	Mesma que controles
122/1966	camundongo	Tulahuén	Sonicação	Tulahuén	Pouco efeito
			Formalina		Mesma que controles
			Sulfato amônico		Aumentada 25 vezes
412/1974			Pressão		80% após 4 meses
413/1975			Ferclorato de sódio		Maior que controles
414/1978	camundongo	Y, M, RG, Peru Tulahuén	Congelamento/ descongelamento	Y	Maior que controles
				M	" "
				RG	" "
				Peru	" "
				Tulahuén	" "
VACINA COM PRODUTOS EXTRAÍDOS DO PARASITO					
122/1966	camundongo	Tulahuén	Polissacáride	Tulahuén	100% após 40 dias
415/1976		Y	Ribossomas	Y	Pouco efeito
119/1977		WH	Flagelo	Tulahuén	50% após 60 dias
		F	Flagelo		" "
		M	Flagelo		" "
416/1979	camundongo	Y	Glicoproteína	Y	Maior que controles
417/1980		Y	Polirribossomas	Y	Maior que controles
418/1982		Y	RNA polissomal	Y	Maior que controles

1 Adaptada e aumentada da referência 397

desafiados com *T. cruzi* virulento, têm sugerido que a alta proteção estaria relacionada a um menor nível de dano tecidual¹²⁰. Entretanto, experimentos com outras preparações antigênicas resultaram em lesões teciduais indistinguíveis daquelas encontradas nos controles não-vacinados^{393, 424}. Outrossim, têm sido levantados alguns argumentos contra o uso, na prática, dos antígenos mortos, em vista da existência de reatividade cruzada entre *T. cruzi* e células cardíacas e nervosas de mamíferos^{34, 363-366}. Com respeito às observações de que injeções repetidas de antígenos em coelhos levaram às lesões inflamatórias no coração⁵⁵, tem sido postulado que as imunizações com todo mosaico antigênico carregaria consigo o potencial de induzir auto-imunidade. E, para evitar esse tipo de dificuldade, têm sido feitas tentativas de obtenção de produtos purificados do parasito. Resultados encorajadores, preliminares, foram obtidos com uma glicoproteína de M_r 90Kd isolada da superfície do *T. cruzi*⁴¹⁶ e que está presente em todos estágios do parasito.

A combinação da glicoproteína com adjuvante completo de Freund ou com saponina, permitiu que todos os camundongos imunizados reduzissem suas parasitemias e permanecessem vivos durante 35 dias, enquanto os animais-controle morreriam com parasitemias elevadas dentro de 25 dias. Os estudos de absorção sugeriram que a glicoproteína não dava reação cruzada com antígenos teciduais, o que parecia indicar que tal estrutura representaria apenas uma parcela diminuta do todo antigênico do parasito. Entretanto, em vista das observações de que a infectividade do parasito para células hospedeiras é facilitada por uma glicoproteína^{313, 314}, permanece para esclarecimentos de que maneira a glicoproteína de 90 Kd participaria nas relações parasito/hospedeiro.

O desenvolvimento de uma vacina contra a doença de Chagas dependeria da possibilidade de obtenção de um antígeno do parasito, quimicamente definido, que produzisse uma imunoproteção sólida, sem excitar as reações tóxicas ou alérgicas de hipersensibilidade. Grande expectativa tem sido voltada para os progressos mais recentes nas áreas de imun química e biologia molecular, com referência à identificação e produção de antígenos com a finalidade de vacinação. Entretanto, os anticorpos monoclonais que poderiam ser produzidos para identificar os antígenos importantes do parasito ainda não permitiram qualquer avanço quanto às possibilidades de obtenção de tal super-antígeno e muita dúvida tem sido posta quanto à sua existência. Mesmo porque, seria prematuro discutir aqui a produção de uma vacina anti-*T. cruzi* com a ajuda da tecnologia do DNA-recombinante, desde que as bases de DNA desejadas, encerrando esses antígenos para inserção no genoma da bactéria, ainda são desconhecidas. Se todos esses problemas técnicos preliminares fossem resolvidos, permaneceriam ainda outras questões técnicas que certamente teriam de esperar soluções por parte dos imunologistas. Por exemplo, tomando-se em consideração que as reações imunes mediadas pelo timo induzem resistência contra o *T. cruzi*, vários clones de linfócitos T, segregados no repertório da população de células imunocompetentes do hospedeiro, seriam necessários para gerar a imunoproteção. Neste caso, restaria para ser provado que uma imunização com tais características geraria um só clone de células T com a capacidade singular de induzir resistência adquirida. Os prospectos para alcançar este evento imunológico podem não ser promissores. Pois, seria provável que tal procedimento de imunização, capaz de conferir proteção parcial contra o *T. cruzi*, seria acompanhado de sensibilização de uma grande variedade de células T de ampla especificidade, inclusive aquelas células que estimulariam reações de hipersensibilidade de tipo retardado. De certo, todas essas questões podem ser adequadamente respondidas somente após a obtenção do antígeno quimicamente definido, e que tal antígeno indutor da proteção seja colocado à disposição para investigações científicas. Ademais, uma imunoprofilaxia eficiente contra a doença de Chagas parece

requerer imunidade estéril: isto é, qualquer vacinação efetiva contra doença de Chagas teria de evocar um estado sólido de imunidade muitas vezes mais potente do que aquele evocado no homem e em animais de experimentação infectados repetidas vezes com o parasito vivo. Finalmente, o envolvimento de auto-imunidade em doença de Chagas sugere que qualquer procedimento eficaz de vacinação ainda requereria muito trabalho adicional em um modelo animal da doença humana. Em resumo, na prática, a imunoprofilaxia contra a doença de Chagas pode não ser obtida pelo uso dos métodos convencionais descritos aqui.

M – TRATAMENTO

Presentemente há dois compostos nitroaromáticos usados largamente na quimioterapia da doença de Chagas ⁴²⁵. O Benzonidazole (N-benzyl-2-nitro-imidazolacetamida) tem sido descrito como sendo eficaz para supressão da parasitemia em pacientes com doença de Chagas, tratados no Brasil ⁴²⁶. O Nifurtimox (4- (5-nitrofurilidenoamino) tetrahidro-4-4-1, 4-tiazina-1,1 dióxido) tem sido considerado eficaz em pacientes com doença de Chagas, tratados na Argentina e no Chile ^{340, 427-429}. Nos Estados Unidos, o Nifurtimox só foi liberado para uso em investigações e o Centro para Controle de Doenças está controlando seu uso. A administração de compostos nitroaromáticos a pacientes e animais de experimentação com infecções agudas pelo *T. cruzi* usualmente abrevia a parasitemia ^{340, 385, 427-431}. Nas infecções crônicas pelo *T. cruzi* torna-se mesmo mais difícil a determinação da eficácia do tratamento, mas a persistência de sorologia positiva, que tem sido descrita por vários pesquisadores, é uma evidência convincente de uma infecção ativa ^{428, 431}. Desafortunadamente, não há evidência clínica de que o prognóstico da doença de Chagas seja melhorado pelo tratamento com qualquer dessas drogas nitroderivadas. Efeitos tóxicos muito severos foram descritos em pacientes submetidos à quimioterapia ^{428, 431}. Discrasias sangüíneas, agranulocitose, distúrbios neurológicos severos, polineuropatia periférica, erupções cutâneas, síndrome à semelhança de doença do soro, cefaléias, tonturas e distúrbios mentais têm sido descritos durante o tratamento ^{426, 431}. Alterações das respostas imunes têm sido induzidas em pacientes e animais de experimentação pela administração desses nitrofuranos e derivados nitroimidazólicos. De interesse, a resposta de anticorpos humorais ao *T. cruzi* e a antígenos não-relacionados não é alterada, mas a resposta cutânea de tipo retardado a antígenos do *T. cruzi*, em indivíduos chagásicos, ou ao PPD em cobaias ou coelhos imunizados com BCG, pode ser totalmente abolida no curso do tratamento ⁴³²⁻⁴³⁴. Também, já é bastante conhecido que drogas nitroderivadas, tal como azatioprina, são agentes imunossupressores ativos.

A quimioterapia da doença de Chagas com nitroderivados tem sido limitada pela ocorrência de toxicidade associada com o tratamento na

posologia de 5 a 15 mg/kg/60 dias. A citotoxicidade resultante da administração de compostos nitroaromáticos induz alterações no parasito e na célula hospedeira. A ação citotóxica surge com a redução do nitrogrupo^{435, 436}. A geração de radicais nitroanion por enzimas microsossomais na presença de NADPH aumenta a produção de anion superóxido, peróxido de hidrogênio e lipoperóxidos. Os radicais oxigênio e os produtos da lipoperoxidação podem induzir sérios danos às estruturas protoplasmáticas no nível molecular. O ataque peroxidativo às proteínas pode causar dano irreversível. A detoxicação pode ocorrer no fígado e envolve o ciclo da glutathiona reduzida que cataliza a conversão de lipídeos hidroperóxidos em hidroxiácidos inócuos^{435, 436}. Secreção biliar aumentada e perda de glutathiona hepática no fígado do rato já foi descrita, após tratamento com Nifurtimox⁴³⁷. Entretanto, há abundância de evidência na literatura mostrando que alguns derivados nitrofuranos e nitroimidazólicos podem produzir esterilidade, mutação, teratogênese e câncer em animais de experimentação^{438, 443}. Ademais, observações em coelhos infectados com *T. cruzi* e tratados com Benzonidazol resultaram no aparecimento de linfomas malignos em 30,7 por cento dos animais tratados. Nenhum dos coelhos-controle morreram de câncer no período de três anos em que os animais foram mantidos sob observação⁴⁴⁴. A mortalidade cumulativa entre coelhos infectados com *T. cruzi* e tratados foi maior do que entre os animais infectados e não-tratados. Além disso, a administração de ambos os nitroderivados a camundongos resultou na indução de um número significativo de neoplasias malignas, um ano após o tratamento (nossas observações não-publicadas). O uso destes ou de outros compostos similares na quimioterapia da doença de Chagas pode levar à indução de um número significativo de neoplasias malignas em muitas áreas da América Latina.

Finalmente, já se compreendeu que essa quimioterapia não deve ser usada como tentativa de resolver os problemas de controle da Tripanosomíase Americana. As drogas tripanocidas disponíveis são tóxicas, caras, difíceis de administrar e, certamente, criariam problemas adicionais. Além do mais, levariam ao desenvolvimento de tripanossomas resistentes às drogas. A esse respeito, uma cepa resistente ao Nifurtimox foi produzida *in vitro*, e ficou isenta quando subseqüentemente exposta a uma concentração da droga 100 vezes mais alta do que aquela letal na exposição inicial⁴⁴⁵. De qualquer forma, parece ser inaceitável depender da administração em massa de drogas tripanocidas para controlar a doença de Chagas. Mesmo porque, uma droga não-tóxica é que se faz necessária para o tratamento dessa doença. Evidências circunstanciais têm sugerido que a erradicação do parasito do corpo desaceleraria os mecanismos auto-ímmunes de maior importância, que produzem as lesões da doença de Chagas. Maiores esforços devem ser concentrados no desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos que poderiam

levantar a possibilidade de um tratamento eficaz e inócuo da Tripanosomíase Americana.

Deve ser encorajada toda tentativa de desenvolver novas drogas com atividade tripanocida e maiores esforços devem ser concentrados nas triagens de compostos naturais e sintéticos com acentuada atividade contra o *T. cruzi*. Apesar da pobreza de informações em disponibilidade nesta área da ciência, tem sido descrito que o metabolismo das poliaminas poderia servir com um alvo para a quimioterapia de infecções por protozoários. As poliaminas que são encontradas em tripanossomátides foram relacionadas com o crescimento e a proliferação celular⁴⁴⁶, e os níveis de poliaminas apresentaram alterações substanciais em todo o ciclo de desenvolvimento⁴⁴⁷. Foi demonstrado que a difluormetilornitina, que inibe a formação de putrescina a partir da ornitina, pela ornitina decarboxilase, foi capaz de curar camundongos infectados com *Trypanosoma brucei brucei*⁴⁴⁸. Esta observação trouxe boa expectativa por causa da facilidade com que a droga podia ser administrada na água e de sua notável não-toxicidade. A combinação sinérgica de difluormetilornitina com bleomicina, um agente antineoplásico usado correntemente, pareceu aumentar a eficiência do tratamento das manifestações severas do sistema nervoso central de camundongos infectados com *T. brucei brucei*⁴⁴⁹. Também, o efeito inibidor de poliaminas na ativação de proteínas-cinases de epimastigotas do *T. cruzi* foi demonstrada⁴⁴⁵. Uma proteína-cinase de alto peso molecular (> 200 Kd), que fosforila a fosvitina, foi inibida fortemente pela espermina e espermidina⁴⁵⁰. Entretanto, atividade tripanocida similar da α -difluormetilornitina contra *T. cruzi*, como já descrito para outros protozoários, ainda não foi demonstrada⁴⁵¹. Ultimamente, porém, foi mostrado que o gossipol [1,1', 6,6', 7,7', -hexahidroxixi-5-5 -diisopropil -3,3' -dimetil (2,2' -binaftaleno) -8,8' -dicarboxaldeído], um pigmento amarelo que se encontra em certas espécies do algodão é um potente inibidor de enzimas ligadas à nicotinamida-adeninadinucleotídeo em *T. cruzi*. Em concentrações tão baixas quanto 0,01 micromolar, gossipol inibe acentuadamente as atividades da desidrogenase α -hidroxilácida e a malato desidrogenase e reduz o crescimento do *T. cruzi in vitro*⁴⁵². Foi ainda demonstrado que a imobilização de epimastigotas do *T. cruzi* pelo gossipol é devida a alterações estruturais no cinetoplasto-mitocondrion. Os parasitos se arredondam e acumulam estruturas membranosas que são difíceis de relacionar com qualquer compartimento da célula⁴⁵³. Foi demonstrado também que o gossipol inibe várias oxiredutases do *T. cruzi*. Assim, inibe particularmente a malato desidrogenase e α -hidroxilácida, glutamato desidrogenase, enzima málica e a desidrogenase glucose-6-fostato⁴⁵⁴. Um estudo prévio mostrou que esse composto polifenólico inibe seletivamente a isozima X da lactato desidrogenase, que é associada à espermatogênese⁴⁵⁵. Por isso, tem sido sugerido que essa enzima está relacionada a processos metabóli-

cos que provêm energia para a motilidade e a sobrevivência do gameta masculino. Assim, o gossipol produz infertilidade em machos de várias espécies de mamíferos ⁴⁵⁶. O gossipol é há muito tempo conhecido na China, onde os estudos iniciais mostraram que sua administração oral induz infertilidade no homem. Uma variedade de alterações estruturais foram descritas nas células germinais dos testículos. Após descontinuidade do gossipol, o número e a morfologia do esperma gradualmente são recuperados. Entretanto, muitos efeitos colaterais têm sido descritos após a administração da droga e a segurança de sua administração prolongada ainda precisa ser conhecida. Portanto, o gossipol parece ser um agente promissor para determinar infertilidade masculina ⁴⁵⁷. Seria também promissor como agente terapêutico para tratamento da doença de Chagas se ele pudesse lesar o *T. cruzi* com a eficiência que produz danos nas células germinais. A ausência de informações quanto a sua eficiência contra infecções experimentais pelo *T. cruzi* parece ser uma indicação de que a droga não funciona bem *in vivo*.

Outra linha de pesquisa, que visa a imunoterapia da doença de Chagas, tem como base uma demonstração de que o anticorpo específico pode ser endocitado por mediação do receptor específico do *T. cruzi* ¹⁸⁹, e na descrição de que agentes citotóxicos ligados ao anticorpo são eficazes no tratamento de células cancerosas ⁴⁵⁸⁻⁴⁶⁰. Esses estudos mostram que a IgG purificada de pacientes com doença de Chagas crônica por cromatografia de afinidade em coluna de Proteína A-Sefarose 4B pode ser usada como peça carreadora para a ³H-Proteína A, e que o complexo radioativo resultante pode ser prontamente interiorizado por formas de cultivo do *T. cruzi*. A quantidade de material radioativo ingerido pelo parasito, após encubação a 37°C, com IgG anti-*T. cruzi* foi pelo menos dez vezes maior do que aquela ingerida quando IgG não-específica era usada. Quando 10⁶ formas do *T. cruzi* foram tratadas com ³H-Proteína A, conjugada com IgG anti-*T. cruzi*, o radioisótopo desapareceu gradualmente do sobrenadante, após tratamento do parasito com pronase e foi encontrado no sedimento do parasito íntegro, indicando que o anticorpo tinha sido interiorizado. Outros experimentos mostraram que uma alíquota do material radioativo era recuperada, como uma função do tempo, na fração não-precipitável após a adição de ácido tricloroacético à suspensão do parasito, o que mostra que o complexo anticorpo-proteína A radioativo havia sido degradado. Postulou-se em seguida que a IgG anti-*T. cruzi* conjugada à cadeia A do ricino poderia também ser interiorizada e, em consequência, os parasitos seriam mortos, uma vez que a toxina do ricino inibe irreversivelmente a síntese proteica.

Então, a IgG anti-*T. cruzi* foi acoplada à cadeia A do ricino pelo reagente heterobifuncional, contendo tióis, N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato⁴⁶⁰. Quando 10⁶ formas do *T. cruzi* foram expostas a 10/ μ g da cadeia A do ricino conjugada à IgG específica (imunotoxina chagási-

ca), essas formas perderam completamente a motilidade após 72 horas de encubação a 37°C. Pela incorporação de timidina triciada demonstrou-se a profunda inibição da divisão celular. Por outro lado, nem Igs nem a toxina do ricino, separadamente, produziram qualquer efeito. Foi particularmente interessante observar que o anticorpo específico discrimina as células parasitadas *in vitro*. A taxa de IgG anti-*T. cruzi* marcada com I¹²⁵ que se ligou às células infectadas foi quase dez vezes maior do que aquela observada quando a IgG não-específica foi usada. Quando 20 µg da imunotoxina chagásica foi adicionada às culturas de 5×10^4 células hospedeiras parasitadas, a liberação de tripomastigotas no meio de cultura foi significativamente menor do que nas culturas-controle. Ademais, somente as células parasitadas morreram (nossas observações não-publicadas). É possível matar formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas livres com a imunotoxina chagásica. Futuras investigações avaliarão a eficácia da imunotoxina contra a infecção *in vivo*. Nesse ínterim, fica como uma possibilidade para o futuro o uso do anticorpo específico como carreador de droga contra o *T. cruzi*.

N – PERSPECTIVA

A doença de Chagas é um problema de saúde que é conseqüência direta das pressões econômicas que afetam os habitantes das áreas rurais da América Latina, com conseqüências graves nos serviços de saúde e sociais dos países do Novo Mundo, que emergiram das colonizações dos espanhóis e portugueses. A endemicidade da doença de Chagas é baseada na transmissão do *Trypanosoma cruzi* pelo vetor. As infecções podem ser evitadas em larga escala pela borrifação das casas com compostos de hidrocarbono clorinado, que tem atividade inseticida residual de longa duração²⁹. A despeito da eficácia do uso de inseticidas para reduzir das populações os Triatomíneos domésticos, fato este demonstrado há mais de quatro décadas, somente certas áreas do Brasil, Argentina e Venezuela têm-se beneficiado desta tecnologia. Esta situação resulta, pelo menos em parte, do fato de que as populações humanas rurais não são capazes de impor uma modificação na baixa prioridade que se tem atribuído aos programas para erradicação dos insetos vetores domésticos. Esses programas são prejudicados por várias restrições econômicas, tais como: inflação, altos preços de óleo e inseticidas, fazendo com que as decisões políticas considerem a borrifação das casas como sendo uma operação muito cara e injustificável. Entretanto, é evidente que a assistência médica paliativa que se volta para grandes contingentes de pacientes chagásicos, o aumento na ocupação de leitos hospitalares e a ausência incidente nos trabalhos profissionais parecem ter, definitivamente, custos mais elevados do que aqueles que seriam necessários para prevenir a infecção transmitida pelo vetor. Indubitavelmente, um programa eficiente de

borrifação de casas, capaz de reduzir a transmissão do *T. cruzi* pelo vetor a um nível mínimo, requereria vigilância periódica para evitar reinvasão das casas por outras espécies de vetores, após o desaparecimento da atividade inseticida residual. Um programa bem organizado de borrifação das casas é, definitivamente, a medida mais urgente para a imediata profilaxia da doença de Chagas.

A despeito do considerável acervo de conhecimento obtido em relação aos mecanismos imunológicos subjacentes às infecções pelo *T. cruzi*, a evidência de auto-imunidade indicaria que a imunoprofilaxia contra a doença de Chagas aguarda mais conhecimentos, e isto parece não ser realizável em programas de curta duração. Por outro lado, a quimioterapia específica das infecções pelo *T. cruzi* é problemática e, portanto, a doença de Chagas permanece incurável. Há possibilidades de que um esforço, com probabilidades de resultados compensadores, deveria ser concentrado na obtenção de novos agentes quimioterápicos dotados de efeito tripanocida específico e baixa toxicidade. Entrementes, a doença de Chagas permanece, também, como um exemplo notável de uma doença transmissível contra a qual um programa eficaz de controle pode ser obtido através da elevação dos padrões de educação das populações que vivem nas áreas subdesenvolvidas da América Latina. Se tal programa educacional não for implementado, poderá ser necessário ainda que muitas gerações de descendentes de europeus e africanos estejam sujeitos a um processo de seleção natural, de forma a torná-los presas não-atrativas para os insetos vetores, como parece ter ocorrido com a população ameríndia.

II. *TRYPANOSOMA RANGELI*

Trypanosoma rangeli Tejera, 1920, tem sido considerado como sendo o segundo tripanossomo restrito às Américas, e, a despeito de não ser considerado patogênico para uma grande variedade de hospedeiros mamíferos, inclusive o homem, ele é dotado de tantas características peculiares que o seu estudo tem representado um assunto de pesquisa fascinante e controverso^{1, 146}. Além disso, *T. rangeli* tem larga importância médica e veterinária porque os vetores triatomíneos são comuns, e, também, porque eles são simpátricos em muitas regiões das Américas Central e do Sul^{461, 462}. Entretanto, os aspectos morfológicos desses tripanossomos, seus ciclos de vida nos hospedeiros vertebrado e invertebrado e suas acentuadas diferenças nas relações parasito/hospedeiro, permitem pronta identificação e caracterização dos flagelados^{1, 461, 463-466}. Um dos aspectos mais interessantes do *T. rangeli* é seu ciclo de desenvolvimento no Reduviídeo, assemelhando-se a ambos, *Stercoraria* e *Salivaria*^{1, 461}. Tem-se considerado que a transição do *T. rangeli*, de um padrão de desenvolvimento primitivo do *Stercoraria* para o padrão *Salivaria* mais sofisticado, está acontecendo sob nossos olhos¹. Por exemplo, a transmissão do *T. rangeli* é usualmente efetuada pela inoculação de tripomastigotas metacíclicos formados nas glândulas salivares, enquanto no presente estágio da evolução do parasito a transmissão por contaminação é incomum, mas não impossível, do ponto de vista de alguns pesquisadores^{1, 461-469}. Não obstante, as formas sanguíneas do *T. rangeli* são morfológicamente indistinguíveis do *T. lewisi*, o tipo-espécie do subgênero *Herpetosoma*, secção *Stercoraria*, e, em contraste com o *Salivaria*, eles podem ser igualmente cultivados em meio bifásico^{1, 461}. De interesse, epimastigotas do *T. rangeli* são as formas predominantes no inseto vetor, como seria esperado para a secção *Stercoraria*¹. Adicionalmente, a epidemiologia do *T. rangeli* e sua distribuição geográfica, sendo dependente da existência dos mesmos insetos vetores para transmissão das infecções, levantaria a possibilidade de ancestrais comuns para esses parasitos. Tomado em conjunto, esses argumentos parecem ser convincentes, de forma a manter *T. rangeli* entre os tripanossomos *Stercoraria*^{1, 461, 470}.

A – CICLO DE VIDA NO VETOR E NO HOSPEDEIRO

Ainda que certas espécies de Triatomíneos sejam vetores inadequados para *T. rangeli*, infecções naturais têm sido encontradas em *Rhodnius*

prolixus, *R. pallescens*, *R. brethesi*, *R. ecuadoriensis*, *R. robustus*, *R. pictipes*, *Triatoma dimidiata capitata*, *T. infestans*, *T. maculata*, *Panstrongylus megistus* e *Eratirus mucronatus*, que são amplamente distribuídos na região neotropical^{1, 461, 469}. *T. rangeli* é um protozoário polixênico e essa falta de especificidade de hospedeiro é, particularmente, contrastante para um membro do subgênero *Herpetossoma*⁴⁷⁰. Em adição ao homem e seus animais domésticos tem sido encontrada larga faixa de hospedeiros silvestres infectados naturalmente com *T. rangeli*, incluindo marsupiais, edentados, roedores, carnívoros e primatas não-humanos^{1, 461}.

O inseto vetor adquire *T. rangeli* enquanto se alimenta em hospedeiros mamíferos infectados e o parasito sempre consegue estabelecer-se no trato alimentar do vetor, onde ele sofre divisão e transformações seqüenciadas, resultando em grande número de epimastigotas e tripomastigotas^{1, 461, 469-473}. Além desse ciclo no intestino do vetor, *T. rangeli* penetra freqüentemente na parede intestinal para invadir a hemolinfa do inseto infectado, a partir de 24 horas após o repasto. Acredita-se que a invasão da hemolinfa pode ocorrer antes do estabelecimento da infecção intestinal⁴⁶⁶. Uma vez na hemolinfa os flagelados multiplicar-se-ão extracelularmente e provavelmente dentro dos hemócitos. Divisões constantes e transformações resultam em grande número de formas metacíclicas, e as glândulas salivares são ativamente invadidas pelos flagelados, usualmente após o terceiro dia pós-infecção^{1, 461, 466}. Entretanto, as taxas de infecções de glândulas salivares variam com o isolado do parasito e com a espécie do vetor^{461, 466, 474-476}. Entre *R. prolixus*, a invasão da glândula salivar alcança 25 a 30 por cento^{466, 471}. Em contraste, os parasitos não parecem ficar localizados na glândula salivar de *T. infestans* e, portanto, sua única possibilidade de transmissão da infecção seria através da contaminação⁴⁷⁶. *T. rangeli* alcança o tecido do hospedeiro em grande número e todas as formas do parasito, incluindo aquelas que passam por divisão binária, completam sua transformação para metacíclico ou tripomastigota sangüícola^{1, 461}. Os parasitos parecem crescer no hospedeiro durante os dias seguintes e, em seguida, permanecem inalterados até desaparecerem da circulação⁴⁷⁰. Publicações recentes confirmam indicações prévias de que *T. rangeli* não se multiplica em linfonodos, medula óssea, coração, cérebro, fígado, baço e rins do hospedeiro vertebrado^{466, 469, 474-476}. Infecções experimentais mostram que os parasitos inoculados no corpo podem durar por longo tempo, Em camundongos e ratos eles duram de três a sete meses⁴⁶¹. Inoculação experimental de 5×10^5 formas do *T. rangeli* em um voluntário humano resultou em homocultura positiva durante 18 meses, enquanto a infecção foi considerada ter demorado três anos em um *Cebus capucinus*⁴⁶¹.

B – PATOGENICIDADE PARA O INSETO-VETOR

Há concordância geral de que *T. rangeli* não causa qualquer efeito patogênico no hospedeiro vertebrado. A falta de patogenicidade foi demonstrada também em cinco voluntários humanos, dois dos quais adquiriram a infecção, detectada por hemoculturas positivas ⁴⁶¹. Em ambos os casos as infecções foram assintomáticas. Os outros indivíduos infectados não tiveram qualquer sinal da infecção e não foram encontradas alterações patológicas, quinze anos após a inoculação do parasito. Uma variedade de animais silvestres e de laboratório tem sido infectada experimentalmente com *T. rangeli*, o que demonstra falta de especificidade e de patogenicidade para o hospedeiro ⁴⁶⁶.

Por outro lado, a patogenicidade de *T. rangeli* para várias espécies de insetos-vetores já é conhecida ^{1, 461, 474-477}. Os efeitos patogênicos que foram descritos nos Triatominae podem também ocorrer em Címicideos, *Cimex lectularis* e *C. hemipterus*, que são ocasionalmente infectados com *T. rangeli* ⁴⁷⁸. No caminho do intestino para a hemolinfa os flagelados invadem células epiteliais do intestino médio e se estabelecem na *muscularis*. Superinfecções podem resultar em dano para os músculos do intestino ou quaisquer outros tecidos ^{1, 461, 474-477}. Graus diferentes de patogenicidade constituem a causa primária de deformidades e diminuição da sobrevivência ⁴⁷⁷. A mortalidade que segue à infecção do vetor é mais alta entre ninfas do que entre triatomíneos adultos. Infecções mais severas usualmente resultam em um retardo na muda, enquanto uma proporção aumentada de ninfas morre durante a muda ^{461, 474-477}. A patogenicidade parece estar relacionada ao volume da hemolinfa e vários tipos de deformidades que resultam da infecção têm sido descritas nos vários estágios de desenvolvimento do inseto ⁴⁶¹. Todos esses efeitos danosos indicariam que a adaptação mútua entre *T. rangeli* e o inseto vetor não alcançou equilíbrio balanceado, provavelmente por se tratar de uma relação estabelecida, relativamente, há pouco tempo ¹. *T. rangeli* tem sido considerado um complexo biológico. Tripanossomas parecidos a *T. rangeli* têm sido descritos em uma variedade de invertebrados e vertebrados, sendo que esses hospedeiros são encontrados em áreas de distribuição de *T. rangeli*. As informações disponíveis a respeito desses tripanossomas são fragmentadas, mas se tem admitido que qualquer tripanossomo Herpetossoma no Novo Mundo é *T. rangeli*, até que se prove o contrário ⁴⁶¹.

C – DIAGNÓSTICO

O diagnóstico diferencial de *T. rangeli* em áreas onde as infecções pelo *T. cruzi* são prevalentes, acrescenta considerável importância médica à identificação e caracterização adequada dessas duas tripanossomíases

humanas. Entretanto, demonstraco parasitolgica s pode ser estabelecida durante a fase inicial das infeces quando os agentes podem ser isolados pelo xenodiagnstico e hemocultura, permitindo a diferenciao aps observao do desenvolvimento nos seus hospedeiros invertebrados comuns. Em geral, a presena de *T. rangeli* em triatomneos e mamferos do Novo Mundo s pode ser aceita aps demonstraco dos estgios de desenvolvimento na glndula salivar do vetor ou por experimentos de transmisso ⁴⁶¹. Alm do mais, estudos morfolgicos e comportamentais em vrios sistemas biolgicos tm sido usados para diferenciao entre *T. rangeli* e *T. cruzi* ^{1, 461}. Uma diferena marcante na biologia desses tripanossomos est na falta de habilidade do *T. rangeli* de invadir e multiplicar dentro de clulas do hospedeiro mamfero, tanto *in vivo* como *in vitro* ⁴⁶¹. Porm, a durao relativamente curta de parasitemias demonstrveis que se seguem s infeces pelo *T. rangeli* e *T. cruzi* em mamferos, usualmente impede a caracterizao parasitolgica e, portanto, o diagnstico diferencial torna-se problemtico, pois passa a depender das evidncias sorolgicas indiretas.

Reatividade sorolgica cruzada entre *T. rangeli* e *T. cruzi* tem sido demonstrada pelos testes de fixao do complemento ⁴⁶¹. Usualmente, os ttulos de anticorpos so mais altos em pacientes com infeces pelo *T. cruzi* quando testados contra antgenos de *T. cruzi*, do que contra antgenos de *T. rangeli*. Experimentos de absoro com extratos do parasito podem permitir o diagnstico diferencial, desde que os extratos de *T. rangeli* no precipitem todos os tipos de anticorpos presentes nos anti-soros anti-*T. cruzi*. (Corredor-Ajona, A., comunicao pessoal). O diagnstico diferencial entre *T. cruzi* e *T. rangeli* parece ser o tipo de problema apropriado para ser resolvido pela tecnologia do hibridoma ^{479, 480}. De fato, soros de camundongos BALB/c hiperimunizados aps injees ou de *T. cruzi* ou de *T. rangeli* mostraram ausncia de espcie-especificidade quando seus anticorpos foram testados pelo teste ELISA e por imunofluorescncia indireta ⁴⁷⁹. Entretanto, hibridomas formados pela fuso de imunoblastos com clulas de plasmocitoma singnico sintetizaram vrios anticorpos espcie-especficos. Quatro clones sintetizaram anticorpos reativos contra antgenos do citoplasma, flagelo e contra epitopos da membrana plasmtica granular ou difusamente distribudos ⁴⁸⁰. Ademais, dois outros clones foram capazes de produzir anticorpos especficos para antgenos de *T. cruzi* ⁴⁸⁰. Ainda que infeces humanas por *T. rangeli* sejam espordicas em muitas regies das Amricas ⁴⁶¹, a disponibilidade de anticorpos monoclonais para o diagnstico preciso dessas infeces parece ter uma repercusso notvel. Espera-se que tais testes sorolgicos sejam importantes no somente para estabelecer o diagnstico diferencial, mas tambm como uma ferramenta auxiliar nos estudos que buscam confirmao da chamada falta de patogenicidade nas infeces crnicas pelo *T. rangeli*.

D – IMUNOLOGIA

Observações interessantes foram feitas associadas com o comportamento comparativo do parasito em *R. prolixus* e *T. infestans*^{466, 470-477}. Verificou-se que, após injeção intracelômica de *T. rangeli*, *R. prolixus* desenvolve a infecção mais grave e mostra uma queda na contagem dos hemócitos do que *T. infestans*⁴⁷⁶. Também já foi demonstrado que o *T. infestans* usualmente perde a infecção⁴⁶¹. A resistência deste último ao parasito está associada com a fagocitose de formas do parasito pelos hemócitos, pois o bloqueio das células fagocíticas pela injeção de tinta da Índia na hemolinfa, resultou em aumento da parasitemia^{476, 481}. Este mecanismo imune parece estar relacionado à prevenção da proliferação do parasito com posterior invasão das glândulas salivares⁴⁶⁶. Em favor desse argumento, de que o invertebrado adquire resistência contra *T. rangeli*, encontra-se a observação de que reinoculações em *R. prolixus* resulta em parasitemias muito mais baixas do que aquelas observadas após inoculações intracelômicas primárias⁴⁶¹. Em adição à fagocitose, tem sido postulado que outro fator de natureza humoral pode também estar envolvido na resistência do inseto contra a infecção⁴⁸¹. A resistência observada pode não ser alterada substancialmente pelo tratamento dos insetos com radiação gama antes da inoculação. Ademais, a virulência das infecções em insetos-controle irradiados e não-irradiados foi similar, pois ambos destruíram os parasitos inoculados na hemolinfa dentro de 48 horas⁴⁶¹. Também, a resistência às reinfecções podem ser apreciadas pelas observações que mostram que insetos reexpostos não aumentam suas infecções maduras⁴⁸². Além do mais, as observações de que os machos são mais susceptíveis de terem as glândulas salivares infectadas do que as fêmeas, parece ser uma evidência importante a indicar a existência de um gen ligado ao sexo, que confere resistência natural⁴⁸².

Têm-se observado um alto nível de heterogeneidade enzimática entre os estoques de *T. rangeli*, caracterizado por eletroforese de isozimas em acetato de celulose⁴⁸³. Um estudo comparativo mostrou quatro tipos de isozimas entre sete estoques do *T. rangeli*, enquanto seis tipos de isozimas foram descritos entre oito estoques de *T. cruzi*⁴⁸³. Também, a diferenciação entre os dois parasitos pode ser demonstrada pelas diferenças na sensibilidade ao complemento. Assim, soros frescos de cobaio, coelho, rato e homem lisaram uma grande proporção de formas epimastigotas de *T. cruzi*, mas não lisaram as formas de cultivo de *T. rangeli*⁴⁸⁴. Entretanto, outros experimentos mostraram que esses parasitos compartilham antígenos de reação cruzada que podem ser demonstrados por imunoeletroforese⁴⁶¹. De interesse, os antígenos de reação cruzada foram identificados em frações subcelulares de ambos os parasitos, por técnicas de imunodifusão e aglutinação direta, usando soros hiperimunes de coelho contra o homogeneizado total de ambos os parasitos e contra uma fração microssomal do *T. cruzi*⁴⁸⁵. O extrato de

T. rangeli mostrou seis bandas após reação contra anti-soro homólogo hiperimune e quatro bandas contra os anti-soro anti-*T. cruzi*. O antígeno flagelar do *T. cruzi* mostrou quatro bandas em comum com o anti-soro anti-*T. rangeli*, mas duas bandas foram específicas para o anti-soro homólogo. Uma fração solúvel, obtida do sobrenadante do homogeneizado do *T. cruzi*, após centrifugação a 105.000 x g por 1 hora, mostrou o maior número de bandas de precipitação após reagir com o anti-soro hiperimune anti-*T. rangeli*. Em acentuado contraste, quando a fração microssomal de *T. cruzi* foi difundida contra seu anti-soro específico, formaram-se três bandas de precipitação, mas apenas uma banda foi formada após difusão contra o anti-soro hiperimune anti-*T. rangeli*⁴⁸⁵. Esta observação foi confirmada pelos testes de aglutinação direta nos quais não se observou reatividade entre os microssomos do *T. cruzi* e o anti-soro anti-*T. rangeli*⁴⁸⁵.

Estudos de imunobiologia comparativa dos dois tripanossomas do homem americano têm sido negligenciados, a despeito de que este campo de pesquisa pareça promissor, quando ele pode apreciar questões importantes relacionadas às relações parasito/hospedeiro. Por exemplo, a demonstração de uma distribuição peculiar de determinantes antigênicos nos microssomos do *T. cruzi*, os quais não são compartilhados pelo *T. rangeli*, levanta muitas indagações a respeito da localização dos antígenos importantes do *T. cruzi*, envolvidos na sua patogenicidade. Este aspecto ganha peso quando se considera experimentos que mostraram infiltrados inflamatórios e lesão de célula cardíaca, assemelhando-se à miocardite crônica da doença de Chagas, após imunizações repetidas com antígenos microssomais do *T. cruzi*^{55, 118 120}. Em contraste, uma gama de antígenos de reação cruzada é vista nos compartimentos solúveis (*cell sap*) desses protozoários simpátricos. Em vista das tentativas de obtenção de imunoproteção pela inoculação de *T. rangeli* vivo terem falhado na indução de resistência aos animais imunes contra superinfecções pelo *T. cruzi*^{383, 340}, parece que os antígenos compartilhados não têm um papel discernível na patogenicidade, que pudesse ser relacionado àquelas diferenças encontradas nas relações parasito/hospedeiro. Por outro lado, fica atrativo sugerir que os antígenos microssomais do *T. cruzi*, não-compartilhados com o *T. rangeli*, desempenham um papel importante tanto na resistência como na patogenicidade que se têm descrito nas infecções pelo *T. cruzi*, no homem e em animais experimentais. Tomadas no seu conjunto, essas observações sugeririam que os antígenos do *T. cruzi* que conferem o estado de imunidade não-estéril são provavelmente associados de perto aos antígenos envolvidos na patogênese da doença de Chagas. Finalmente, uma nota deve ser introduzida aqui com respeito ao tratamento das infecções pelo *T. rangeli* com um composto nitroderivado. Um estudo experimental mostrou que nifurtimox é pelo menos tão supressor contra o *T. rangeli*, como o é contra o *T. cruzi* em camundongos⁴⁸⁶.

III. *TRYPANOSOMA LEWISI*

Entre os *Herpetosoma* de roedores murinos encontram-se *T. lewisi* e *T. musculi*, que em condições normais são restritos a ratos e camundongos, respectivamente. Sem desejar envolvimento na discussão relacionada à dificuldade encontrada na taxonomia de tripanossomos muito similares neste subgênero, decidiu-se analisar esses dois tripanossomos de acordo com sua estenoxenia típica. De fato, seria antes irrelevante entreter mais discussões com os mesmos argumentos usados por outros, enquanto não se dispõe de dados conclusivos que podem advir da taxonomia fisiológica e bioquímica. Permanece aqui a validade de descrever esses tripanossomos separadamente, a despeito de que certos dados mostrem a mesma densidade para o DNA nuclear e cinetoplástico do *T. lewisi* e *T. musculi*. Não obstante, os métodos de análise de variação isozímica, perfil polipeptídico e marcadores genotípicos, que têm sido usados como tentativas de caracterização de outros protozoários, seriam mais úteis para fazer uma definição final. Entrementes, as evidências que estão em disponibilidade sugerem que alguns, mas não todos, aspectos imunobiológicos do *T. lewisi* são similares àqueles registrados para *T. musculi*.

A – CICLO DE VIDA NO HOSPEDEIRO E NO VETOR

Trypanosoma lewisi, o tipo-espécie do subgênero *Herpetosoma* é restrito ao hospedeiro do gênero *Rattus*¹. O tripomastigota adulto tem o corpo fino e curvado com uma extremidade posterior rígida e um flagelo livre, caracteristicamente longo. Um cinetoplasto grande, em forma de bastão, fica próximo à extremidade posterior e o núcleo é localizado próximo ao meio, em direção à porção anterior do corpo. Esta forma do parasito pode alcançar 36,5 μm de comprimento e uma membrana ondulante com convoluções rasas completa seu perfil¹. *T. lewisi* pode ser encontrado em qualquer parte do mundo onde o gênero *Rattus* existe. Infecções naturais são achadas comumente em *R. rattus* e *R. norvegicus*. Entretanto, tem sido possível intectar outros roedores (camundongos, gerbils e cobaias) com inóculos grandes, no laboratório, com formas sangüícolas de *T. lewisi* em divisão. Tais infecções são freqüentemente de mais curta duração do que as infecções típicas vistas usualmente em ratos⁴⁸⁷. Os vetores ou hospedeiros intermediários do *T. lewisi* são pulgas de ratos, mas se tem mostrado que o parasito pode sobreviver no intestino de piolho de rato e em percevejos, que podem atuar como vetores¹. Entretanto, sob condições

naturais os vetores mais comuns são *Nosophyllus fasciatus* nos climas temperados e *Xenopsilla cheopis* nas áreas tropicais e subtropicais¹.

Uma descrição detalhada do ciclo de vida do *T. lewisi* pode ser obtida no excelente livro de Hoare¹. Em resumo, quando ratos de laboratório são inoculados com sangue infectado de outro rato, usualmente leva seis dias de incubação antes que os tripanossomos apareçam no sangue. Antes que os tripomastigotas do sangue evoluam para dividirem-se, seus cinetoplastos migram para uma posição próxima ao núcleo, assumindo a morfologia típica de uma forma epimastigota. Tripomastigotas jovens que se reproduzem ativamente são vistos freqüentemente até dez dias após a infecção, em cujo período a taxa de multiplicação diminui progressivamente e cai até zero (primeira crise). Logo após, somente tripanossomos adultos, não-divisíveis, permanecem no sangue, usualmente por mais três semanas. Subseqüentemente, há uma abrupta queda no número de tripanossomos (segunda crise), quando todos os protozoários desaparecem da circulação e o rato recupera-se da infecção¹. As formas sangüíneas do *T. lewisi* reproduzem-se por divisões múltiplas desiguais, sem completa separação do citoplasma, até que oito ou mais células filhas sejam formadas, permanecendo unidas por algum período de tempo antes que haja segmentação e que os parasitos sejam liberados como pequenas formas epimastigotas ou amastigotas. As formas do parasito resultantes da divisão sofrem alterações morfológicas cíclicas, dando origem a tripomastigotas adultas. O mesmo tipo de divisão múltipla tem sido descrito nos pequenos vasos sanguíneos⁴⁸⁸, especialmente nos capilares medulares nos rins^{489, 490}.

A transmissão do *T. lewisi* de rato para rato é feita por pulgas, em cujo hospedeiro intermediário o parasito passa por todo ciclo de diferenciação no canal alimentar¹. O tripanossomo adulto, ingerido com o sangue do rato, sofre pequenas alterações no intestino médio antes de sua penetração em células epiteliais, onde ele reproduz indivíduos periformes, que crescem e multiplicam-se repetidamente por divisões binárias. O ciclo intracelular de divisão múltipla dura quatro horas e resulta na liberação de células filhas, que escapam para o lúmen do estômago. Esses tripomastigotas passam através do cólon para o reto da pulga e transformam-se em epimastigotas. Alguns desses flagelados permanecem soltos, nadando no lúmen do reto, enquanto outros forram sua parede como paliçadas de flagelados¹. As formas similares a epimastigotas continuam multiplicando-se e dando origem a pequenos metatripanossomos. Os estágios finais de desenvolvimento no vetor são descarregados nas fezes da pulga, e o rato torna-se contaminado quando lambe suas gotas depositadas no pelo, ou quando devora a pulga¹. *T. lewisi* pode ser prontamente cultivado em meio difásico de ágar nutriente.

B – *RELAÇÕES PARASITO/HOSPEDEIRO*

A infecção de ratos com *T. lewisi* era considerada como exemplo clássico de uma relação parasito/hospedeiro bem balanceada¹, porque as parasitemias no hospedeiro natural eram relativamente bem controladas, onde as respostas imunes suprimem rapidamente a multiplicação do parasito⁴⁹¹⁻⁴⁹⁶. Em adição, a infecção pode ter um curso assintomático, do qual o hospedeiro recupera-se espontaneamente e torna-se imune à reinfeção⁴⁹². Se a refratariedade à reinfeção emerge como uma consequência da esterilidade imune é um assunto de muita discussão⁴⁹⁷⁻⁴⁹⁹, mas a demonstração do parasito nos capilares dos rins e a longa persistência dos anticorpos humorais parecem favorecer a imunidade concomitante^{488, 489, 500, 501}. Em qualquer caso, a facilidade com que as parasitemias são relativamente bem controladas no hospedeiro natural é uma boa indicação de uma longa adaptação evolucionária. Ainda que a infecção do parasito seja usualmente benigna, modificação da resposta imune do hospedeiro pode tornar a infecção fulminantemente fatal. Em adição, o baixo grau de patogenicidade que tem sido descrito nas infecções pelo *T. lewisi* parece ter uma base imunológica.

1. *Resposta imunoprotetora*

Vários estudos têm mostrado que o curso do desenvolvimento do *T. lewisi* em rato é regulado por um único tipo de imunidade adquirida que resulta no aparecimento de dois tipos de anticorpos no soro imune^{491, 496}. Um anticorpo “ablastina” é formado, parece inibir o crescimento e a multiplicação dos tripanossomos, mas não os mata. Acredita-se que o efeito biológico da ablastina seja observado precocemente e, subsequentemente, o hospedeiro animal passa por uma “crise”, durante a qual o número de parasitos diminui. A inibição da reprodução do parasito (atividade ablástica) que tem sido descrita precede a primeira crise^{491, 496}. Um estado de imunidade sólida então emerge e os tripanossomos adultos do sangue desaparecem durante uma segunda crise⁴⁹². Anticorpos tripanocidas convencionais têm sido associados com a destruição dos parasitos durante cada crise⁴⁹⁶. Entretanto, a natureza da imunidade ablástica tem permanecido como assunto controverso, pois a ablastina que poderia ser similar a outros anticorpos não pode ser absorvida dos anti-soros de ratos infectados com tripanossomos homólogos^{490, 493, 496}. Acrescente-se a isso a situação única de um anticorpo que pudesse controlar o crescimento e reprodução do *T. lewisi* e certos tripanossomos de roedores, enquanto outros membros desse gênero, que mantêm relações filogenéticas próximas e com ciclo de desenvolvimento similar, não parecem ser afetados pela ablastina. Este tem sido um argumento usado contra a ablastina⁴⁸⁹. Muitos trabalhos que ultimamente foram

publicados lançam luz em certos aspectos antes considerados obscuros^{500, 501}. Um passo importante na direção do esclarecimento sobre a não-absorbilidade da ablastina à superfície do *T. lewisi* foi dado com a demonstração de que proteínas do soro ligam-se avidamente na superfície dos tripanossomos da corrente sangüínea⁵⁰²⁻⁵⁰⁵. Além da IgG, albumina e α -macroglobulina foram demonstradas na superfície do parasito⁵⁰³. Acumulação de IgG antígeno-específica, como um componente da superfície da membrana durante o curso da infecção do rato, resultaria como uma função do tempo. Soro com atividade ablástica pode ser obtido de ratos infectados, entre a primeira e segunda crises⁵⁰⁵⁻⁵⁰⁸. A existência de IgG na superfície da membrana torna os parasitos incapazes de absorver mais IgG do soro com atividade ablástica⁵⁰⁶. Entretanto, tripanossomos que têm nenhuma ou pouca IgG na superfície (colhidos de hospedeiros imunossuprimidos) absorvem avidamente soro com atividade ablástica⁵⁰⁷. Além disso, a absorção de IgG do soro imune reduz significativamente sua atividade ablástica⁵⁰⁸. Esses resultados indicam que a falha na absorção significativa de ablastina, observada nos primeiros estudos, resultava do uso de tripanossomos cobertos com ablastina, colhidos de hospedeiros amplamente imunizados^{491-494, 506-508}.

Exoantígenos têm sido encontrados no plasma de ratos infectados com *T. lewisi*^{503, 504}. Certos estudos mostraram que frações dos anti-soros obtidos por cromatografia de afinidade em coluna de Proteína A-Sefarose formavam uma linha de precipitação, após reação em placa de imunodifusão, contra exoantígenos de *T. lewisi* em plasma coletado de ratos irradiados, infectados⁵¹⁰. Absorção de anti-soros de rato com anti-IgG de rato ou anti-IgM de rato removeu uma das duas linhas de precipitação que tinha sido formada contra um extrato do parasito. As frações IgG obtidas por cromatografia de afinidade aglutinavam os tripanossomos, mas os títulos de aglutinação diminuíram significativamente após tratamento dos anti-soros com o agente redutor 2-mercaptoetanol, sugerindo que tanto IgG como IgM estão envolvidas na aglutinação⁵¹⁰. A atividade ablástica das imunoglobulinas nos anti-soros absorvidos pela coluna foi encontrada na classe de anticorpos IgG. A IgG do hospedeiro liga-se à superfície da membrana do *T. lewisi* em um período da infecção em que uma elevação no título de atividade ablástica do soro do hospedeiro é observada. Tripanossomos sem IgG na membrana, colhidos de ratos imunossuprimidos, ligaram-se à IgG eluída das membranas de tripanossomos e não se ligaram à IgG purificada do soro de ratos normais. De interesse maior, somente a IgG específica, purificada das membranas, inibiu a reprodução do *T. lewisi in vitro*. Esses achados constituem-se em forte indicação de que IgG antígeno específica do hospedeiro liga-se à superfície do *T. lewisi* e previne seu crescimento e divisão^{507, 508}. Oito proteínas com peso molecular entre 15 e 70 Kd foram purificadas de extratos de *T. lewisi* em colunas de imunoabsorção de ablastina (IgG)

eluída da superfície da membrana no oitavo dia pós-infecção⁵⁰⁹. Imunização de ratos com esses antígenos de membrana permitiu avaliação direta dos anticorpos ablásticos e tripanocidas nos anti-soros. Níveis elevados de anticorpos ablásticos foram encontrados em quatro soros, mas não se detectou anticorpos tripanocidas (aglutininas)⁵⁰⁹. Os ratos imunizados foram então desafiados intraperitonealmente e as parasitemias e taxas de divisões foram registradas. Ambas, parasitemias e taxas de divisões, foram significativamente mais baixas em todos os ratos imunizados do que nos ratos-controle⁵⁰⁹. Assim, a imunoglobulina G da superfície do *T. lewisi* pode ser usada para isolar antígenos do parasito que produziram resposta ablástica, em ratos imunizados com esses antígenos⁵⁰⁹. Parece, portanto, que vários determinantes antigênicos na superfície da membrana são responsáveis pela resposta imune típica contra o *T. lewisi*, no que diz respeito a sua capacidade de produzir anticorpos ablásticos em ratos. Além disso, reatividade cruzada entre *T. lewisi* e *T. musculi* têm sido demonstrada em várias ocasiões^{449, 511}. Camundongos infectados com *T. lewisi* ficaram imunes às infecções desafiadas pelo *T. musculi*⁵¹¹. Entretanto, vários autores têm observado que múltiplas injeções de *T. lewisi* em camundongos não os protegeram contra um desafio letal com estoques virulentos de *T. cruzi*^{383, 400}.

Várias investigações demonstraram alterações metabólicas em *T. lewisi*, que apareceram concomitantemente com a produção de ablastina⁵¹²⁻⁵¹⁹. Assim, diminuição da oxidação de glicose e aumento do consumo de O₂ em células inibidas na divisão foram atribuídas a um efeito ablástico⁵¹². Transporte de glicose em *T. lewisi* está deprimido por soro ablástico. Incorporação de ³⁵S-metionina e ¹⁴C-adenina está diminuída em organismos inibidos por ablastina e foi considerada como indicações de inibição de síntese proteica e ácido nucléico⁵¹³. A atividade de ATPase em *T. lewisi*, que é sensível à ouabaina, foi deprimida por soro imune enriquecido com IgG⁵¹⁶. A concentração intracelular de nucleotídeo aumentada em organismos tratados com soros imunes parece implicar o 3,5-AMP cíclico como um fator da inibição ablástica⁵¹⁷. Além do mais, vários pesquisadores têm sugerido que a ablastina exerce seu efeito na membrana plasmática influenciando transporte, atividade enzimática ligada à membrana ou outros componentes estruturais⁵¹⁷⁻⁵¹⁹. A inibição do crescimento do parasito pareceu estar associada com um declínio na atividade de transporte específico de glicose, leucina e potássio⁵¹⁹. Também foi postulado que a alteração do transporte de glicose, provavelmente devido à perturbação da membrana adjacente ou mesmo envolvendo o carreador de glicose, pode ser o evento inicial que está associado com o início da inibição ablástica⁵¹⁹.

Estudos ao microscópio eletrônico mostraram anticorpos conjugados à ferritina (FCA) nas regiões de ligamentos desmossomais, na superfície da membrana flagelar e no saco flagelar, enquanto anticorpos-

ferritina esparsos estavam distribuídos na superfície da matriz da membrana⁵²⁰. Em contraste, os parasitos fixados com formalina ou tratados com azida sódica não inibiram FCA nas regiões desmossomais, nas superfícies do flagelo ou nos sacos flagelares⁵²⁰. Essas observações são consistentes com o funcionamento de um processo energia-dependente no *T. lewisi* vivo, o qual estaria relacionado ao movimento e localização dos antígenos de superfície. Outra evidência da interação energia-dependente foi o aparecimento do FCA em processos filopódicos nas superfícies do parasito vivo⁵²⁰. Nenhum desses fenômenos foi observado quando os tripanossomos foram encubados com FCA a 0-4° C. De maior interesse, secções de tripanossomos encubados a 37° C por 15 a 30 minutos mostraram internalização do FCA em vesículas forradas por membrana⁵²¹. Nenhuma outra indicação foi dada a respeito do destino dos anticorpos internalizados, isto é, se o FCA contido nas vesículas revestidas por membranas fusionariam com lisossomas, onde o material ingerido poderia ser completamente degradado até aminoácidos. Tal processo foi descrito em relação a anticorpos FCA internalizados por tripomastigotas do *T. cruzi*¹⁸⁹. Permanece para ser decidido se a endocitose dos anticorpos da superfície do *T. lewisi* ocorreria ao acaso ou antes aconteceria numa taxa constante. Nesse último caso, interiorização do anticorpo pode ter uma larga significação biológica. Por exemplo, se ele não é tóxico para a célula, isto poderia ser um meio de nutrição celular e um mecanismo potencial para a evasão do parasito da resposta imune do hospedeiro.

Já foi mostrado que ratas lactantes têm uma resistência incomum ao *T. lewisi*^{522, 523}. Uma parasitemia mais baixa, em que a segunda fase “adulta” não é detectada, resulta em infecções que duram menos da metade do tempo usual – 12 dias ao invés de 25 a 26 dias^{522, 523}. Também, mostrou-se que o soro de ratas lactantes que nunca haviam sido infectadas com *T. lewisi*, podia aglutinar parasitos isolados da fase adulta de ratas infectadas e não-grávidas⁵²². De interesse, os ratinhos amamentados conseguiram sobreviver após a infecção pelo *T. lewisi*, dependendo da fase de amamentação. Cem por cento de taxa de sobrevivência podia ser observada se os ratinhos fossem infectados na metade do período de amamentação (10 dias), mas a taxa era de 55 por cento se eles fossem infectados no fim do período de amamentação⁵²². Um fator do soro lactante, que causava aglutinação dos parasitos adultos, aumentava a proteção das mães lactantes e podia ser transferido através do leite para os recém-nascidos, também transferia proteção⁵²². Em seguida foi mostrado que as ratas lactantes tinham um fator semelhante ao fator reumatóide (imunoglobulina M). Foi então sugerido que esta IgM amplifica a resposta da IgG específica contra o parasito e é provavelmente responsável pelo aumento da resistência de ratas lactantes e seus recém-nascidos à infecção pelo *T. lewisi*⁵²². Essa descoberta pareceu bastante incomum, pois o fator reumatóide, provavelmente um anticorpo auto-imune, agiria de forma a

proteger. O fator do soro da rata lactante pode ser transferido passivamente com soro de ratas lactantes para animais já amamentados⁵²³.

Estudos pioneiros já haviam mostrado que o baço tem papel importante nas infecções com *T. lewisi*^{524, 525}. Ativação de macrófagos esplênicos foi vista como um evento inicial durante a infecção e a interação linfócito-macróforo foi um passo importante, prévio à ativação do macróforo. Macrófagos esplênicos ativados parecem desempenhar um papel na resposta fagocítica. Transformação linfoblástica *in vitro* pode acontecer na presença de tripanossomos maduros ou em divisão^{524, 525}. Verificou-se também adesão seletiva do parasito às células esplênicas, de forma que o número de parasitos no sobrenadante ficava reduzido⁵²⁵. A interação quantitativa do *T. lewisi* com macrófagos ativados não foi estudada e também não existe dado para indicar se os macrófagos podem ser assistidos por células esplênicas imunes na fagocitose e na neutralização do tripanossomo. Entretanto, a fagocitose do *T. lewisi in vivo* e a imunoproteção passiva por meio de células esplênicas imunes já foram descritas⁵²⁶. Estudo ao microscópio eletrônico do baço de ratos infectados com *T. lewisi* mostrou agregados de linfócitos e plasmócitos em volta de macrófagos e/ou células reticulares e que muitas células fagocíticas continham tripanossomos ingeridos em vesículas citoplasmáticas revestidas de membrana. Registrou-se alteração degenerativa nos parasitos intracelulares⁵²⁵.

Vários achados característicos, no curso da infecção de ratos com *T. lewisi*, parecem conspirar em favor da participação do sistema do complemento na lise imune durante a crise que elimina a parasitemia. Uma redução dramática da atividade hemolítica total do complemento foi observada em ratos infectados com *T. lewisi* e os níveis de C₃ e C₄ estavam diminuídos, paralelamente com a parasitemia⁵²⁷. A recuperação dos níveis normais seguia a eliminação dos tripanossomos do sangue periférico. Todavia, a infecção não alterava significativamente a atividade hemolítica de C₆⁵²⁷. Além disso, parasitemias e níveis de C₃ em ratos deficientes de C₄ não foram diferentes daqueles dos controles normo-complementêmicos. A depleção de C₃ e dos componentes subseqüentes do complemento pelo fator veneno de cobra não alterou as parasitemias durante os estágios reprodutivo ou adulto da infecção⁵²⁷. Além disso, a ativação do sistema do complemento pelo *T. lewisi* e soro imune não pode ser inibido pelo EGTA e EDTA. Em conclusão, o complemento não parece ter um papel detectável no controle e na dissipação da infecção, a despeito da ativação das vias clássica e alternativa, com consumo acentuado dos componentes ativados no início⁵²⁷. Foi também demonstrado que *T. lewisi* tem pelo menos dois materiais que ativam o complemento⁵²⁸. Um componente menor que é precipitável pelo ácido tricloroacético e inativado com fluoreto de fenilmetilsulfonil parece ser uma proteína com atividade enzimática. O segundo componente contém

hexoses e aminoácidos e sua habilidade para ativar o complemento se correlaciona com o teor de hexose⁵²⁸. Não obstante, as formas do *T. lewisi* em reprodução, obtidas de ratos irradiados, e as formas adultas de ratos imunes, não foram lisadas por soro fresco de mamífero⁵²⁹. Em correspondência ao que foi publicado para o *T. cruzi*²²⁷, o tratamento de formas sangüíneas do *T. lewisi* com tripsina ou quimiotripsina tornou o parasito susceptível à lise por soros de rato, camundongo, coelho e humano, enquanto os soros de cepas de animais ou de humanos, geneticamente deficientes em C₃, C₅ ou C₆ não lisaram parasitos tratados com protease. A presença de três componentes do parasito, que podem ser removidos da células por tratamento com protease, foi, portanto, correlacionada com a resistência do *T. lewisi* à lise mediada pelo complemento⁵²⁹.

2. Imunossupressão

A patogenicidade potencial ou assim chamada “virulência adormecida” do *T. lewisi*, que é freqüentemente abolida por uma resposta imune inicial⁴⁹¹⁻⁴⁹⁶, torna-se rapidamente evidente quando o sistema imune do hospedeiro é lesado de maneira importante⁴⁹⁹. A exacerbação da parasitemia pode ser obtida prontamente com uma variedade de procedimentos imunossupressores clínicos e experimentais. A administração de ciclofosfamida dois dias após inoculação do *T. lewisi* resultou em parasitemias e mortalidade mais elevadas nesse grupo do que no grupo-controle. Os animais tratados com ciclofosfamida tiveram níveis diminuídos de IgG, e a reprodução dos parasitos continuou por um tempo mais longo que o usual⁵³⁰. Foi descrito que a administração de salicilato de sódio por via oral suprimia a atividade ablastica em ratos e que os animais tratados tinham a reprodução do parasito prolongada, mortalidade e parasitemias aumentadas⁵³¹. Ratos tratados com salicilatos também apresentaram retardo na síntese de aglutininas que apareceram no soro em níveis significativamente diminuídos⁵³¹. Quanto à base purina-adenina ela foi considerada capaz de interferir com a síntese de DNA e inibir o crescimento celular *in vitro* e foi usada como um imunossupressor para estudar os efeitos em ratos infectados com *T. lewisi*. A administração de adenina resultou na diminuição da síntese de ablastina e prolongou a fase reprodutiva da infecção⁵³². O curso das infecções foi alterado significativamente pelo tratamento com corticosteróide^{518, 533}. Parasitemias aumentadas nos animais tratados resultavam em infecções fatais, enquanto os ratos-controle recuperavam-se das infecções⁵¹⁸. O tratamento desse último grupo com dexametasona não suprimiu a imunidade contra reinfeção. Ratos tratados com corticosteróides ficavam protegidos de infecções com *T. lewisi* através de células imunes e soros imunes⁵¹⁸. A transferência passiva de células imunes não protegeu os ratos imunossuprimidos, pois infecções severas eram a regra nesses animais⁵¹⁸. Ratos

irradiados mostraram prolongamento da fase reprodutiva e as parasitemias foram muito mais altas do que nos controles não-irradiados, e isto também correlaciona com níveis reduzidos de ablastina^{534, 535}. Contudo, uma segunda irradiação em animais que haviam se recuperado das infecções não interferiu com a produção de ablastina ou aglutinina⁵³⁵.

Foram executados experimentos para avaliar os efeitos da esplenectomia^{536, 537}, bloqueio do sistema fagocítico mononuclear⁵³⁶, timectomia neonatal^{538, 539} e tratamento com soro antilinfocítico (ALS)^{518, 540}. A esplenectomia prolongou a fase reprodutiva da infecção, mas os efeitos da esplenectomia podiam ser aliviados com autotransplante de tecidos esplênicos⁵³⁷. Entretanto, a remoção do baço de ratos que tinham superado a infecção não permitiu a reinfeção⁵³⁶. A transferência passiva de soro aumentou a proteção do camundongo esplenectomizado, enquanto não era obtida a proteção em ratos esplenectomizados que foram submetidos a bloqueio do sistema fagocítico com tinta da índia⁵³⁶. Além disso, o tratamento de ratos com ALS preparado com tímócitos resultou em infecções severas pelo *T. lewisi* e morte de metade dos ratos tratados; o soro colhido desses animais não inibiu a reprodução do parasito em seguida à transferência passiva para hospedeiros recém-infectados⁵⁴⁰. Quando o tratamento com ALS foi iniciado três dias antes da infecção e continuado durante a infecção, houve inibição da resposta imune e todos os animais morreram. Todavia, a iniciação do tratamento com ALS dois dias após a inoculação do parasito não alterou o curso das parasitemias em ratos⁵⁴⁰. Em contraste, outros autores não puderam mostrar qualquer efeito da timectomia neonatal nas infecções pelo *T. lewisi*^{538, 539}. Em resumo, pode ser dito que se as respostas imunes timo-dependente e independente contra o *T. lewisi* são prejudicadas pela gravidez⁵⁴¹, imunossuppressores, irradiação ou tratamento com soro antilinfocitário, as infecções podem ser fulminantes e fatais.

3. Patologia

Já foi mostrado que pode ocorrer morte materna e do concepto na rata grávida infectada com *T. lewisi*⁵⁴¹. Quando a infecção ocorre no início da primeira semana de gravidez o animal pode absorver o embrião sem dificuldade. Entretanto, se a infecção ocorre mais tarde as fêmeas apresentam grande dificuldade em reabsorver o concepto e metade delas morrem antes da parturição⁵⁴¹. Em ambas as situações as curvas de parasitemias semelhantes àquelas das fêmeas não-grávidas são registradas. As ratas infectadas durante a metade da gravidez usualmente morrem durante a parturição, sem parir seus conceptos, enquanto suas parasitemias são anormalmente elevadas. A placenta dessas fêmeas contém grande número de flagelados em divisão, formando grandes massas em que muitos núcleos e cinetoplastos são vistos⁵⁴¹. Quando a infecção ocorre durante a última semana da gravidez,

geralmente não há dificuldade, os animais dão à luz os filhotes de tamanho normal e suas parasitemias são usualmente baixas. Portanto, as infecções pelo *T. lewisi* são consideradas como causa de aborto e podem ameaçar a vida da rata grávida⁵⁴¹.

A patogenicidade das infecções pelo *T. lewisi* em hospedeiro natural tem sido descrita por vários autores. Tem sido mostrado que a atividade da creatina-fosfoquinase e da ornitina carbamil transferase estavam alteradas em consequência da infecção⁵¹⁶. Também, um estado hipoglicêmico foi observado em um período quando as parasitemias alcançaram um pico em ratos infectados com *T. lewisi*⁵¹². Alterações ultra-estruturais foram descritas nos hepatócitos no curso da infecção^{542, 543}. Por volta do sétimo dia, as células hepáticas mostravam cisternas dilatadas no retículo endoplásmico e as mitocôndrias tinham inchado e aumentado de número. Degeneração gordurosa dos hepatócitos foi vista após a primeira semana e lisossomas residuais nas células de Kupffer eram encontrados entre a segunda e a terceira semanas, podendo estar relacionados à fagocitose dos parasitos. Agregados de glicogênio que eram formados nas células hepáticas desapareceram após a recuperação, e o fígado assumiu sua histologia normal após a quinta semana pós-infecção^{542, 543}. Em adição, estudos histopatológicos dos rins de ratos infectados com *T. lewisi* mostraram alterações glomerulares que pareciam ser consistentes com glomerulonefrite⁵⁴⁴. Os mecanismos de indução de lesões hepáticas e renais nos animais infectados e suas relações com o hospedeiro imune merecem mais investigações.

Infecções humanas com protozoários que se assemelham à espécie *Herpetosoma* foram registradas em duas pessoas na Índia⁴⁸⁷, enquanto o primeiro caso de infecção humana com parasitos morfológicamente indistintos dos protozoários flagelados desse subgênero foi descrito numa criança da Malaia¹. Nesses casos as infecções resultaram em parasitemias e febre. Os parasitos persistiram no sangue humano por poucos dias e a febre desapareceu depois que os parasitos sumiram. A epidemiologia relacionada às infecções humanas permanece obscura^{1, 487}.

IV. *TRYPANOSOMA MUSCULI*

A – CICLO DE VIDA NO VETOR E NO HOSPEDEIRO.

O *Trypanosoma musculi* é morfologicamente indistinguível dos parasitos típicos do subgênero *lewisi* que infectam roedores, mas tem sido considerado separadamente com base na sua restrição de hospedeiro no camundongo doméstico (*Mus musculus*), e, secundariamente, por algumas diferenças no curso da infecção no seu hospedeiro natural. Sua distribuição geográfica parece ser confinada à costa Oeste da África e aos países quentes da região do Mediterrâneo e, daquelas regiões, ele foi introduzido em outras áreas do mundo, provavelmente através de intervenção humana¹. O desenvolvimento e os padrões da infecção do *T. musculi* no camundongo são similares àquele do *T. lewisi*, mas a multiplicação e os níveis de parasitemias observados no primeiro não são tão intensos como aqueles vistos nos últimos. Também, a fase de multiplicação de *T. musculi* em camundongos pode ter duração mais longa do que a de *T. lewisi* em ratos¹. Tem sido considerado que camundongos tornam-se infectados pela via de contaminação, ou ao devorarem pulgas infectadas ou quando lambem suas excreções. De fato, estágios de desenvolvimento do parasito foram registrados em pulgas que, experimentalmente infectadas e ingeridas (*Ceratophyllus hirundinis*), desenvolveram o parasito no intestino posterior e produziram epimastigotas e tripanossomos metacíclicos. Além disso, camundongos jovens tornaram-se infectados após alimentarem-se do conteúdo retal de pulgas infectadas⁵⁴⁵. *T. musculi* pode ser propagado em vários meios e as formas de cultivo do parasito mantêm sua infectividade para camundongo^{1, 546}.

B – RELAÇÕES PARASITO/HOSPEDEIRO

1. Respostas imunoprotetoras

O *T. musculi* produz uma infecção autolimitada em que as parasitemias usualmente desaparecem em três ou quatro semanas. Duas respostas imunológicas que se sucedem no tempo foram descritas, com aspectos que são presumivelmente distintos⁵⁴⁷. A primeira resposta alcança seu clímax após a primeira semana pós-infecção (primeira crise) e leva à interrupção da reprodução do parasito no sangue periférico e estabilização da parasitemia. Durante a primeira crise aparecem anti-

corpos timo-dependente e timo-independente que podem controlar o crescimento do parasito na corrente sangüínea^{547, 548}. Além disso, uma resposta imune efetiva ocorre após 14 dias pós-infecção (segunda crise) resultando na eliminação do parasito da circulação. Esta segunda resposta imune parece envolver um mecanismo celular timo-dependente e não parece depender mais de qualquer tipo de fator humoral⁵⁴⁹. Os primeiros fatores humorais que operam juntamente com elementos celulares das respostas imunes, que são eficientes na eliminação dos parasitos circulantes, não parecem produzir uma imunidade estéril completa^{550, 551}. O exame cuidadoso dos animais que haviam se recuperado da infecção patente por períodos de tempo que variavam de uma semana a um ano e meio, foi sugestivo de que os animais estavam sem o parasito, conforme resultados de subinoculações⁵⁵¹. Entretanto, os parasitos infectantes foram detectados nos rins de todos os camundongos que tinham apresentado parasitemia negativa por períodos de até nove meses pós-infecções. Os esfregaços dos rins também mostraram formas reprodutivas do parasito com predomínio de epimastigotas⁵⁵¹. O exame histopatológico de secções dos rins mostrou parasitos em divisão, que replicavam em formas multinucleadas e rosetas, nos capilares dos *vasa recta* da medula. Considerou-se que os parasitos pareciam estar em um sitio privilegiado para reprodução, desde que eles bloqueavam virtualmente os capilares e pareciam permanecer parcialmente protegidos das respostas imunes do hospedeiro⁵⁵¹.

A inibição imunológica da reprodução do *T. musculi* no sangue periférico tem intrigado muitos pesquisadores e isto tem sido um assunto de calorosas discussões a respeito, particularmente, do conceito de um anticorpo sérico que controla a reprodução sem lesar os parasitos^{499, 552}. De fato, tem sido considerado que após o período latente, o *T. musculi* multiplica-se rapidamente no sangue do camundongo, ainda que a reprodução mais ativa ocorra nos capilares dos rins⁵⁵⁰⁻⁵⁵². Após uma semana as formas do parasito em reprodução seriam eliminadas do sangue por um fator humoral ablástico, dando início a uma fase de *plateau*⁵⁵². A caracterização fisico-química da ablastina no soro de camundongos durante a primeira crise tem sugerido que a ablastina é uma imunoglobulina G⁴⁹⁹. Ademais, foi descrito que a ablastina não pode ser produzida em camundongos nu/nu timo-deficientes, que não são capazes de produzir imunoglobulina G⁵⁴⁸. O uso de camundongos irradiados tem permitido a produção de uma população de tripanossomos com mais de 50 por cento de formas em divisão. Esses parasitos em divisão, que não contêm IgG na superfície de suas membranas, foram capazes de absorver a atividade ablástica do soro, que não podia ser absorvida com parasitos adultos. Esta observação sugeriu que os antígenos capazes de produzir anticorpos ablásticos só estariam presentes nos tripanossomos em divisão⁵⁴⁸. Por outro lado, algumas observações

mostraram ausência significativa de inibição da divisão do parasito *in vitro* pelo anti-soro obtido de camundongos infectados durante a fase de multiplicação ativa do parasito no sangue periférico, ou por anti-soros coletados durante qualquer outro período de infecção⁵⁵³. Formas em divisão do *T. musculi*, compreendendo 30 a 50 por cento das formas do parasito, foram descritas em meio contendo 20 por cento de anti-soros homólogos⁵⁵⁴. Além disso, nenhum significado biológico foi creditado a respeito da redução do número de formas em divisão do parasito na presença de anti-soros específicos, como foi indicado pela síntese de DNA testada pela incorporação de ³H-timidina e auto-radiografia⁵⁵³. Os resultados desses experimentos contrastam com aqueles descritos para o *T. lewisi*, em que anticorpos ablásticos aboliram a síntese de DNA⁵¹⁸. Ademais, essas observações que mostraram síntese normal de DNA em *T. musculi* tratado com anti-soros, que supostamente continham atividade ablástica, estão de acordo com resultados de outros experimentos que mostraram que a transferência de soro *in vivo*, de camundongos infectados intactos ou desprovidos de células T, inibiu temporariamente a multiplicação do parasito, mas não eliminou as formas em divisão presentes no sangue⁵⁵². Em adição, esses mesmos experimentos estão de acordo com a descrição de multiplicação continuada dos parasitos na cavidade peritoneal de camundongos em todo curso da infecção, isto é, muito depois deles interromperem a divisão no sangue, e, também, com a presença dos tripansomos adultos em replicação nos *vasa recta* dos rins de camundongos^{551, 555}. Nenhuma dessas observações é consistente com a existência de anticorpo IgG ablástico, que preveniria a multiplicação do parasito⁵⁵³. Além do mais, *T. musculi* pode ser cultivado *in vitro* na presença de soros de camundongos intactos ou desprovidos de células T. A despeito de que a divisão do parasito não parecia estar inibida pela presença de anti-soros, o menor número de parasitos jovens que foi observado era considerado como devido ao efeito tripanocida, ao invés de ser devido à presença da ablastina nos soros⁵⁵³.

A transferência passiva de soro imune não pareceu influenciar a taxa com que os parasitos eram eliminados do sangue⁵⁵⁶. Ao contrário, a infecção foi considerada como dependente de células T⁵⁵⁷. A transferência de células imunes não-aderentes diminuiu as parasitemias em camundongos infectados receptores, enquanto os camundongos desprovidos dessas células não se recuperavam. Pelo contrário, eles mostravam parasitemias aumentadas durante muitas semanas até que morriam⁵⁵⁶. Em outros experimentos, camundongos CBA desprovidos de células T receberam enxerto de tecido tímico num período em que a infecção com *T. musculi* apresentou um pico de parasitemia. Os animais que receberam implantes de timo conseguiram sobreviver à infecção enquanto os controles não-implantados morreram⁵⁵⁸. As infecções foram particularmente modificadas em animais desprovidos de células T, nos quais

parasitemias altas foram observadas durante um período de 60 a 80 dias, e as parasitemias ainda permaneceram demonstráveis em um período adicional de 200 dias ou mais⁵⁵⁸. Em resumo, o rápido controle da infecção em camundongos normais contrasta marcadamente com o controle vagaroso observado em camundongos com implantes de timo e com o controle ineficiente das parasitemias observado em camundongos desprovidos de células T, que resulta na morte do animal. De certo, as diferenças entre imunoproteção encontradas nesses três grupos de camundongos, dificilmente poderiam ser creditadas a diferenças hipotéticas em anticorpos antitripanossomos presentes naqueles animais, pois o controle efetivo pode ser estabelecido por um implante de timo nos camundongos desprovidos de células T⁵⁵⁸. Um papel efetor primário para os linfócitos T tem sido sugerido na base da inibição *in vitro* da reprodução de *T. musculi* por células esplênicas de camundongos. Ainda que o mecanismo efetor não esteja determinado, se tem considerado que as células imunes devem secretar um fator solúvel inibidor da divisão, ou elas podem ter um efeito tripanocida direto que se relacionaria ao término da infecção *in vivo*⁵⁵⁹. O papel da imunofagocitose na resistência adquirida contra *T. musculi* deve ser investigado; a assistência de linfócitos T imunes na ativação de macrófagos residentes que matam os parasitos remanescentes no hospedeiro, poderia lançar alguma luz nos mecanismos de resistência que levam à cronicidade e/ou interrupção da infecção com erradicação dos parasitos.

Camundongos que se recuperam da infecção tornam-se resistentes à reinfeção⁵¹¹. Além disso, camundongos imunizados com formas sanguíneas vivas de *T. lewisi*, inibem a infecção desafiante com *T. musculi*. Entretanto, anti-soros de camundongos infectados com *T. musculi* não inibem a atividade reprodutiva de *T. lewisi*⁵¹¹. Como seria de esperar, em vista dos experimentos prévios com outros Tripanosomatidae, a imunização de camundongos com *T. musculi* não produz qualquer proteção contra desafio com *T. cruzi*; os animais imunizados sobrevivem ao desafio por períodos tão breves quanto os animais-controle⁴⁰⁰. Os antígenos importantes que estão envolvidos nos mecanismos imunológicos operantes nas infecções pelo *T. musculi* foram parcialmente identificados em tripomastigotas do sangue e em formas de cultura do parasito⁵⁴⁶. Um mínimo de 13 antígenos é compartilhado por essas formas do parasito, enquanto quatro antígenos parecem ser exclusivos dos tripanossomos da corrente sanguínea. Dois grupos de animais foram imunizados com os antígenos das formas do parasito e foram desafiados com 10⁴ tripomastigotas do sangue três dias após a última injeção imunizante. A infecção foi demonstrada em camundongos imunizados com o homogeneizado do parasito de cultura, ainda que em nível bem mais baixo que o visto nos camundongos-controle. Nenhum desses animais imunizados com o homogeneizado dos tripomastigotas sanguícolas tiveram parasi-

temia demonstrável e os camundongos foram completamente protegidos⁵⁴⁶.

2. Imunossupressão

Observou-se que o crescimento do *T. musculi* no camundongo pode ser agravado pela fome, deficiência da dieta, baixa temperatura, infecção concorrente, bloqueio do sistema fagocítico mononuclear, timectomia neonatal e irradiação letal^{552, 560, 561}. De interesse, uma superinfecção pode ser produzida experimentalmente em hospedeiras grávidas quando infectadas entre o quarto e o décimo-quinto dia da gravidez⁵⁶¹. Durante esse período de embriogênese a reprodução do parasito segue sem controle e mais de um milhão de parasitos já foram contados por mm³ de sangue periférico⁵⁶¹. Como uma consequência da infecção, o desenvolvimento dos embriões é retardado e ocorre aborto, usualmente antes que a camundonga grávida seja morta pela carga parasitária em ascensão. Parece que a falta de proteção é limitada à fase de desenvolvimento placentário, desde que as infecções na última semana da gravidez e no período de lactação sigam um curso similar àquele descrito nos animais-controlados. Os fatores envolvidos na imunossupressão são desconhecidos, mas eles não parecem influenciar os mecanismos de resistência previamente estabelecidos em fêmeas infectadas que se tornam grávidas. Aceleração da multiplicação do parasito ou relapsos de parasitemias não ocorrem no evento de superimposição de gravidez⁵⁶¹. Observou-se que a alteração do equilíbrio parasito/hospedeiro é relacionada à presença da placenta em crescimento. A remoção cirúrgica dos embriões com preservação da placenta não influenciou o desenvolvimento de parasitemia, enquanto o parto normal dos filhotes, aborto e remoção cirúrgica completa do útero grávido resultaram na interrupção imediata das parasitemias⁵⁶¹. O exame histológico da placenta mostrou massas de parasitos em divisão que formavam rosetas de crescimento rápido. Acrescenta-se que nenhum desses achados foi obtido pela administração de hormônios esteróides em camundongos fêmeas não-grávidas⁵⁶¹. A exacerbação da parasitemia na fase inicial da gravidez parece ser um fenômeno importante, relacionado à transmissão de *T. musculi*, pois um grande número de parasitos ficam à disposição da pulga vetora. Em outro estudo foi mostrado que a gravidez em animais que tinham se recuperado de infecções pelo *T. musculi* resultava em alterações dos mecanismos de resistência e permitia que os parasitos deixassem seus refúgios nos rins para tornarem-se acessíveis na circulação periférica⁵⁶².

3. Imunopatologia

O desenvolvimento de anemia em camundongos infectados com *T. musculi* tem sido demonstrado, e parece estar relacionado com a

participação de mecanismos imunológicos que levam à destruição de eritrócitos. Os valores do micro-hematócrito diminuem durante a infecção e retornam aos níveis normais juntamente com os valores dos reticulócitos, após a eliminação do parasito. Os testes de antiglobulina mostram os eritrócitos positivos principalmente para IgG1, e várias combinações incluem ligação de IgG2, IgM e C3, em adição à IgG1⁵⁶³. A IgG1 ligada ao eritrócito parece ter um papel importante na produção de anemia, a qual estava aparente, similarmente, em uma cepa de camundongo deficiente em C5, e, portanto, incapaz de produzir lise mediada pelo complemento⁵⁶³. Em adição à anemia, outras alterações nos rins de camundongos infectados com *T. musculi* podem ser relacionadas como indicações da patogenicidade associada com a infecção. Um aumento significativo nos índices glomerulares que foi observado nos camundongos infectados não parecia estar relacionado à presença dos parasitos nos capilares glomerulares, mas foi relacionado à celularidade aumentada⁴⁸⁷. Observou-se infiltração dos tufo glomerulares por eosinófilos e neutrófilos, e pela proliferação de células mesangiais. As alterações não foram vistas no pico da parasitemia, mas após a terceira semana da infecção todas aquelas alterações, que pareciam consistentes com glomerulonefrite, tornaram-se evidentes⁴⁸⁷. Ademais, deposição de material elétron-denso com fusão dos processos podais no lado epitelial da membrana basal foi um achado histopatológico típico de glomerulonefrite, similar àquele observado na Tripanossomíase Africana experimental em macacos^{487, 564}. Considerando-se que as infecções foram produzidas com formas de cultivo de *T. musculi* em meio acelular, a possibilidade de uma glomerulonefrite a vírus pode ser descartada⁴⁸⁷.

V. TRYPANOSOMA THEILERI

A – CICLO DE VIDA NO HOSPEDEIRO E NO VETOR

Trypanosoma theileri é um parasito ubituoso do gado doméstico, e é o tipo-espécie do subgênero *Megatrypanum*. *T. theileri* é um dos maiores tripanossomos de mamíferos e o comprimento das formas adultas variam de 10 a 130 μm . Os estágios adultos, que são as formas do parasito usualmente presente no sangue, têm uma extremidade posterior afilada e típica, e alcançam sua espessura máxima no meio, tornando-se progressivamente mais estreitos em direção à extremidade anterior. O núcleo ocupa a posição central, e seu cinetoplasto fortemente corado está localizado em uma posição intermediária entre o núcleo e a extremidade posterior. Os parasitos adultos também mostram um citoplasma finamente granular e um flagelo livre com um quarto do comprimento total ^{1, 565}. Formas em divisão de *T. theileri* são descritas em infecções severas usualmente agravadas por uma doença concomitante. Os flagelados do sangue dividem por fissão binária desigual. A divisão é precedida por alterações na morfogênese com transformação em estágios epimastigotas em que o cinetoplasto está situado próximo ao núcleo. Os flagelados ancestrais, distinguidos por seu comprimento maior e pela presença de uma membrana ondulante, dão origem a epimastigota-filha maior com um flagelo longo, e uma forma menor, com um flagelo curto. Essas formas jovens desenvolvem gradualmente para os estágios adultos, quando seu corpo torna-se afilado e o cinetoplasto vira para a extremidade posterior do corpo ¹. Multiplicação do *T. theileri* também ocorre nos órgãos internos dos animais infectados, onde, em adição à divisão do parasito nos estágios epimastigotas por fissão binária, ele pode assumir a forma de fissão múltipla no estágio “plasmodial” ⁵⁶⁶.

Uma grande maioria de publicação implica as espécies Tabanida como vetores de *T. theileri*. A presença de Tripanossomatídeos flagelados nas moscas de cavalo fêmeas hematófagas, com metatripanossomos típicos no intestino posterior, levou os primeiros investigadores a associá-las como possíveis vetores de *T. theileri* ¹. Quando o parasito do sangue de gado foi permitido propagar-se em meio de cultura, eles produziram estágios de desenvolvimento indistinguíveis dos flagelados da mosca de cavalo. O estágio predominante no intestino do vetor e hospedeiro intermediário compreende os epimastigotas típicos, que dividem-se por fissão binária, dando origem a indivíduos menores, que se transformam

em tripomastigotas alongados. No intestino posterior os últimos estágios transformam-se em metatripanossomos curtos e infectivos¹. A transmissão tem sido obtida experimentalmente pela via contaminativa, quando bovinos adquiriram a infecção após receberem por via oral os conteúdos dos intestinos fragmentados de *Tabanus striatus* que albergavam os flagelados⁵⁶⁷. Em adição ao *T. striatus*, tem sido demonstrado conclusivamente que os flagelados *T. glaucopsis* e *Haematopota pluvialis* são estágios de desenvolvimento do *T. theileri*¹. Mais de 25 espécies de Tabanidas dos gêneros *Ghrysoys*, *Haematopota Pangoia* e *Tabanus* têm mostrado esses flagelados nos seus intestinos, e têm sido considerados como vetores do *T. theileri*⁵⁶⁸⁻⁵⁷⁰.

Transmissão congênita do *T. theileri* tem sido observada^{1, 565, 571, 573}. Pelo menos em um caso a infecção estava associada com aborto¹. Entretanto, a infecção tem sido descrita em várias ocasiões em bezerras e, também, em fetos bovinos^{571, 572}. Em outro caso o parasito foi recuperado em cultura de tecido do rim de um feto bovino removido em um abatedouro⁵⁷³. A importância da transmissão congênita do *T. theileri* permanece para ser investigada. Mostrou-se que a disseminação da infecção pode ser feita pelo homem acidentalmente através da inoculação de sangue bovino fresco no curso de imunização contra outras doenças infecciosas¹. Ultimamente muita atenção tem sido voltada para a descrição de tripanossomos em carrapatos *Haemaphysalis flava*, *Rhipicephalus sanguineus*, *R. pulschellus* e *Boophilus decoratus*^{569, 570}. O achado do tripanossomo em glândula salivar daqueles carrapatos tem sugerido que o *T. theileri* pode ser transmitido pela via inoculativa. Entretanto, não se tem feito tentativas para transmiti-lo para o gado e, até aqui, os carrapatos não são aceitos como vetor do *T. theileri*^{1, 565}.

B – RELAÇÕES PARASITO/HOSPEDEIRO

O *T. theileri* é restrito a bovinos, em cujo hospedeiro animal ele produz uma infecção críptica ou latente. O curso normal da infecção não tem sintomas, e o animal torna-se um carreador do parasito^{1, 565}. De fato, exacerbação da infecção pelo tripanossomo nunca foi registrada em infecções puras pelo *T. theileri*. O curso da infecção não-complicada em gado infectado experimentalmente mostrou que o período de incubação varia de 4 a 20 dias, de acordo com os números de tripanossomos inoculados. O período patente que se segue pode mostrar parasitemia elevada, mas após 2 a 4 semanas pode ser impossível detectar o parasito pelo exame microscópico do sangue periférico. A partir de então, uma infecção subpatente ainda permanece mantendo o sangue infectante para outros animais até cerca de um ano¹. Entretanto o curso natural da infecção no gado pode ser alterado por uma doença concomitante, com o resultado de que a parasitemia pode alcançar um nível alto por longos períodos de tempo^{1, 565}. *T. theileri* tem sido descrito em tecidos bovinos de

várias procedências além do sangue. A contaminação de culturas de células de rins bovinos fetal, células de linfonodos, culturas de leucócitos e de baço com este parasito tem sido encontrada⁵⁷³⁻⁵⁷⁶. Várias formas do parasito têm sido descritas em tecidos de vacas infectadas⁵⁶⁶. Amastigotas, “formas plasmodiais” multinucleadas, promastigotas, epimastigotas e tripomastigotas foram descritas em secções de linfonodos de gado, enquanto epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas foram encontradas no cérebro⁵⁷⁷⁻⁵⁷⁹. Tripanossomos que se assemelham ao *T. theileri*, compreendendo seis outras espécies que pertencem ao subgênero *Megatrypanum*, têm sido registrados em vários membros da ordem Artiodactyla. A infecção natural produzida por esses tripanossomos são usualmente crípticas e nenhum efeito patogênico parece resultar na grande variedade de hospedeiros animais^{1, 565}.

1. Resposta imunoprotetora

Muito pouco é conhecido dos mecanismos imunes efetores no gado, mas esses mecanismos são responsáveis pelo controle das infecções do *T. theileri*. Tem se documentado que, uma vez infectado, o gado permanece normalmente com a infecção críptica por anos, enquanto não parece ser necessário reinfeção para explicar a incidência aumentada de infecção num rebanho, acompanhando a idade dos animais⁵⁸⁰. O papel que anticorpos humorais desempenham isoladamente no controle das infecções é desconhecido. Os estudos nesta área têm sido dirigidos para os mecanismos de fagocitose, provavelmente porque eles parecem ser mais importantes no controle de outras infecções por tripanossomos. Tem sido mostrado que neutrófilos, eosinófilos e macrófagos de bovinos são citotóxicos para epimastigotas do *T. theileri in vitro* na presença dos anticorpos específicos⁵⁸¹. Todos os tipos de células efetoras fagocitam o parasito pelo envolvimento do tripanossomo por pseudópodos longos. O dano causado ao parasito é iniciado na extremidade do tripanossomo que entra em contato com a célula, sugerindo que a destruição do *T. theileri* mediada pelo neutrófilo é produzida por mecanismos intracelulares e extracelulares. A destruição do parasito por eosinófilos requer fusão intergrânulos antes da descarga de seu conteúdo nos vacúolos parasitóforos. Os macrófagos necessitaram de mais de duas horas para produzir lesão severa ao parasito, enquanto os eosinófilos precisaram de menos de 30 minutos, e os neutrófilos causaram dano similar dentro de 5 minutos⁵⁸¹. Quantidades substanciais de enzimas lisossomais são liberadas por essas células efetoras após contato com as células-alvo cobertas com anticorpo. Desde que epimastigotas do *T. theileri* sejam muito grandes (10 a 130 μ de comprimento), a opsonização pode induzir a liberação dos enzimas líticos antes que a ingestão completa tenha ocorrido, de forma a produzir lesão extracelular grave. A rapidez deste dano está de acordo com a observação de que cinquenta por cento da³H-

uridina liberada de epimastigotas previamente marcadas ocorre durante os primeiros 15 minutos de encubação com neutrófilos bovinos⁵⁸². Ademais, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos obtidos do sangue periférico e glândula mamária de vacas foram vistos ter citotoxicidade para *T. theileri*. A citotoxicidade estava associada com a presença de anticorpos específicos, ou quando eles eram produzidos em gado infectado experimentalmente, ou quando eles estavam presentes no colostro de vacas adultas. Neste teste *in vitro*, o complemento não pareceu desempenhar um papel na destruição do *T. theileri*. Também, linfócitos de animais infectados com *T. theileri* não mediaram citotoxicidade, a despeito da presença de anticorpos específicos no sistema⁵⁸². Entretanto, uma associação entre a infecção por esse tripanossomo e linfocitose tem sido descrita⁵⁷⁵. Além disso, o *T. theileri* parece compartilhar antígenos com atividade mitogênica para linfócitos sensibilizados⁵⁸³. Linfócitos do sangue periférico de gado infectado com *T. theileri* respondem *in vitro* a um antígeno preparado de culturas do parasito⁵⁸⁴. Esta reação *in vitro* é uma expressão de uma resposta imune mediada por células contra o protozoário, que pode estar relacionada à linfocitose que se tem descrito no gado infectado⁵⁸³. A despeito do fato de que a destruição do *T. theileri* *in vitro* pelas células fagocíticas era dependente de anticorpos específicos, um papel dos linfócitos na ativação de macrófagos durante a fagocitose do *T. theileri* ainda não foi investigado. Os resultados das observações apresentadas acima sugerem que a destruição imune do *T. theileri* mediada por célula é um importante mecanismo efetor, responsável pelo controle desta infecção no gado.

2. Imunossupressão

Tem sido mostrado em várias ocasiões que *T. theileri* pode multiplicar-se intensamente no sangue do gado que sofre de uma doença concomitante, de forma que os flagelados no sangue podem alcançar um nível elevado^{1, 565}. Parece, portanto, que a infecção concomitante diminui a resistência do gado à infecção com *T. theileri*. A esse respeito, já se mostrou uma modificação adversa da síndrome *reinderpest* em bovinos, na época em que o soro imune era obtido pela injeção de sangue virêmico no gado e se colhia o soro dos sobreviventes⁵⁶⁵. Os animais imunizados costumavam ter uma elevação da temperatura associada com a infecção a vírus. Entretanto, uma segunda elevação da temperatura nesses animais foi considerada estar associada com altos níveis de parasitemia pelo *T. theileri*. Os animais superinfectados podiam falecer num estágio em que havia um pico desses flagelados no sangue. Foi proposto que a destruição dos linfócitos pelo vírus *reinderpest* induz um efeito imunossupressor que leva à recrudescência da infecção concomitante⁵⁶⁵. De fato, já foi demonstrado que certas infecções a vírus e bactérias suprimem a função

imune em bovinos⁵⁸⁵. Alterações severas já foram descritas em vacas adultas infectadas com *Eperythrozoon wenyonii* e *T. theileri*⁵⁸⁶. Diminuição do número de linfócitos B circulantes, redução das regiões de linfócitos B em linfonodos, e presença de um fragmento de imunoglobulina G1 no soro, foram descritos nessa vaca superinfectada. A imunidade humoral foi encontrada deficiente, com redução de IgG1, IgG2 e IgM no soro e uma diminuição da resposta de linfócitos T e B ao mitógeno *pokeweed*⁵⁸⁶. O baixo número de linfócitos B na circulação e no tecido linfóide correlaciona-se com a hipogamaglobulinemia registrada nessa vaca. Os hemoparasitos presentes na vaca foram considerados como não-patogênicos, mas as populações de linfócitos e suas funções não foram estudadas em bovinos infectados com *T. theileri*. Ainda que o papel do anticorpo na remoção de hemoparasitos da circulação não esteja determinado, a deficiência de anticorpo pareceu correlacionar-se com a parasitemia elevada⁵⁸⁶.

3. Patologia

T. theileri tem sido considerado freqüentemente como um protozoário não-patogênico, mas alguns autores acreditam que ele pode agir como um patógeno verdadeiro. Ainda que a infecção seja usualmente latente ou crípica e não produza manifestações clínicas no hospedeiro, este tripanossomo pode multiplicar-se intensamente em animais que alberguem uma doença intercorrente, e, em conseqüência, o animal pode morrer quando a parasitemia alcança um nível elevado^{1, 556}. Em adição à *reinderpest*, números aumentados de *T. theileri* ocorrem também em bovinos que sofrem de piroplasmose¹. Também, uma depressão na produção de leite tem sido atribuída à infecção com esse protozoário⁵⁸⁷, e uma causa de diarreia já descrita em associação com a infecção pelo *T. theileri* numa vaca⁵⁸⁸. Lesões cerebrais foram descritas no gado em que vários estágios de desenvolvimento do *T. theileri* estavam presentes^{577, 579}. Ademais, infecção pelo *T. theileri* pode se estabelecer no hospedeiro por longos períodos de tempo, no fim do qual os processos patológicos resultantes da cronicidade da infecção podem ser detectados. Um exemplo desta situação é a ocorrência de amiloidose no gado após uma infecção ao longo da vida com *T. theileri*⁵⁸⁹. Uma relação já foi descrita entre esta infecção e linfocitose⁵⁸¹, e, em algumas ocasiões, o diagnóstico de leucose bovina pode ser complicado pela presença de uma infecção intercorrente pelo *T. theileri*⁵⁹⁰.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HOARE, C. A. *The Trypanosomes of Mammals*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1972.
2. LÉGER, L. Les affinités de l'*Herpetomonas subulata* et la phylogénie des trypanosomes. *C. R. Soc. Biol.* 67, 615, 1904.
3. LAVIER, G. L'évolution de la morphologie dans le genre *Trypanosoma*. *Ann. Parasitol.*, 19, 168, 1943.
4. WALLACE, F. G. The Trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp. Parasitol.*, 18, 124, 1966.
5. BAKER, J. R. Speculations on the evolution of the family Trypanosomatidae. Doflein, 1901. *Exp. Parasitol.*, 13, 219, 1963.
6. RYCKMAN, R. E. Epizootiology of *Trypanosoma cruzi* in South-western North America. IV. Lizards, laboratory hosts for *Trypanosoma cruzi* and Triatominae. *J. Med. Ent.* 2, 93, 1965.
7. URDANETA MORALES, S. e MCLURE, I. Experimental infections in Venezuelan lizards by *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 38, 99, 1981.
8. CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1, 1, 1909.
9. CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 3, 3, 1911.
10. CHAGAS, C. Sobre um tripanossomo do tatu, *Tatusia novemcincta*, transmitido pela *Triatoma geniculata* Latr. (1811). Possibilidade de ser o tatu um depositário do *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior (nota prévia). *Brazil-Médico*, 30, 305, 1912.
11. CHAGAS, C. Tripanossomíase Americana: forma aguda da moléstia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 8, 37, 1916.
12. CHAGAS, C. e VILLELA, E. Forma cardíaca da Tripanossomíase Americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 14, 5, 1922.
13. CHAGAS, C. Descoberta do *Trypanosoma cruzi* e verificação da Tripanossomíase Americana. Retrospecto Histórico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 15, 67, 1922.
14. CHAGAS, C. Estado atual da Tripanossomíase Americana. *Rev. Biol. e Higiene*, 2, 58, 1934.
15. BARRETO, M. P. "Epidemiologia". In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Z. Brener, e Z.A. Andrade, Eds., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1979, p. 89.

16. ZELEDON, R., SOLANO, G., SAENZ, G. e SWARTZWELDER, J. C. Wild reservoirs of *Trypanosoma cruzi* with special mention of the opossum, *Didelphis marsupialis*, and its role in the epidemiology of Chagas' disease in an endemic area of Costa Rica. *J. Parasitol.*, 56, 38, 1970.
17. DEANE, L. M. Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, 16, 27, 1964.
18. GUERRA, F. American Trypanosomiasis. A historical and a human lesson. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73, 83, 1970.
19. CARNEIRO, O., LEMOS, Z. P. DE e REZENDE, J. M. Investigação sorológica para doença de Chagas pela reação de imunofluorescência em índios de Goiás e Mato Grosso, Brasil, *Rev. Goiana Med.*, 23, 119, 1977.
20. DEANE, L. M., DEYAMA, A. Y. e CÉSAR, A. P. Inquérito de toxoplasmose e de tripanossomíase realizado no território do Amapá pela III Bandeira Científica do Centro Acadêmico Oswaldo Cruz da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. *Rev. Med. São Paulo*, 47, 1, 1963.
21. DEANE, L. M. Inquérito de toxoplasmose e de tripanossomíase realizado em Cachoeira do Arari, ilha de Marajó, Pará, pela V. Bandeira Científica do Centro Acadêmico Oswaldo Cruz da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, *Rev. Paul. Med.*, 66, 296, 1965.
22. BRENER, Z. O parasito: relações hospedeiro-parasito. In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Z. Brener e Z. A. Andrade, Eds., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1979, p. 1.
23. VIANA, G. O. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Moléstia de Carlos Chagas". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 3, 276, 1911.
24. ALMEIDA, H. O., TEIXEIRA, V. P. A. e OLIVEIRA, C. F. O. Flebite com parasitismo em supra-renais de chagásicos crônicos. *Arq. Bras. Cardiol.*, 5, 341, 1981.
25. SHERLOCK, I. Vetores. In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Z. Brener e Z.A. Andrade, Eds., Guanabara Koogan, 1979, p. 42.
26. ZELEDON, R. *El Triatoma dimidiata y su relación con la enfermedad de Chagas*. Ed. Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica, 1981.
27. ZELEDON, R. Los vetores de la enfermedad de Chagas en America, *Ann. Simp. Intern. Doença de Chagas*, Buenos Aires, 327, 1972.
28. FORATINI, O. P., FERREIRA, O. A., SILVA, E. O. R., RABELLO, E. X. e SANTOS, J. F. L. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana II. Distribuição e dispersão local de triatomíneos em ecotopos naturais e artificiais, *Rev. Saúde Públ. São Paulo*, 5, 163, 1971.

29. MARSDEN, P. D. The transmission of *Trypanosoma cruzi* infection to man and its control. In: *Human Ecology and Infectious Diseases*. N.A. Croll, e J.M. Cross, Eds., Academic Press, Nova Iorque, 1983, p. 253.
30. SCHOFIELD, C. J. The behavior of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a review. *Bull. Entomol. Res.*, 69, 363, 1979.
31. GREENBERG, B. *Flies and Disease*. Vol. II., Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 1973, p. 74.
32. DIAS, J. C. P. Mecanismos de transmissão. In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Z. Brener e Z.A. Andrade, Eds., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1979, p. 152.
33. BRUMPT, E. *Schizotrypanum cruzi* a différentes phases de son cycle évolutif. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 5, 261, 1912.
34. CHAGAS, E. Infecção experimental do homem com o *Trypanosoma cruzi*. *C. R. Soc. Biol.*, 115, 1330, 1933.
35. DIAS, J.C.P. Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudo clínico-epidemiológico a partir da fase aguda entre 1940 e 1982. Tese, Faculdade de Medicina Universidade de Minas Gerais, 1982. Cap. 1.
36. MACEDO, V.O. Influência da exposição à reinfeção na evolução da Doença de Chagas. Tese, Faculdade de Medicina Universidade Federal Rio de Janeiro, 1973, 125p.
37. MINTER, D.M., MINTER, G. E., MARSDEN, P. D. e MACEDO, V. Domestic risk factor-an attempt to assess the risk of infection with *Trypanosoma cruzi* in houses in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 67, 290, 1973.
38. RABINOVITCH, J.E., LEAL, J.A. e FELICIANGELI, D. P. Domestic biting frequency and blood ingestion of the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus* Stahl (Hemiptera: Reduviidae) in Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 73, 272, 1979.
39. TEIXEIRA, A.R.L. Trends immunological research and prospects for immunoprophylaxis. *Bull. World Health Organization*, 57, 697, 1979.
40. BRENER, Z. Transmission of Chagas' disease. In: *New Approaches in American Trypanosomiasis Research*. PAHO Sci. Publ., 318, 404, 1975.
41. AMATO NETO, V.A. Transmissão por transfusão de sangue. *Int. Congr. Chagas' disease*, Abstr. H20-23, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1979.
42. TEIXEIRA, A. R. L. e PEREIRA, L.M. Discrepâncias entre resultados de três reações sorológicas empregados para o diagnóstico da Doença de Chagas. *Rev. Bras. Biol.*, 41, 789, 1981.
43. SULLIVAN, T.D. Viability of *Trypanosoma cruzi* in citrated blood stored at room temperature. *J. Parasitol.*, 30, 200, 1944.
44. NUSSENZWEIG, V., BIANCALANA, A., AMATO NETO, V., SONNTAG, R. FREITAS, J. L. P. e KLOETZEL, J. Ação da violeta de

- genciana sobre o *T. cruzi in vitro*: sua importância na esterilização do sangue destinado a transfusão. *Rev. Paul. Med.*, 42, 57, 1953.
45. CHAGAS, C. Moléstia de Chagas ou tireoidite parasitária. Nova doença humana transmitida pelo barbeiro. *Segunda Conferência na Academia Nacional de Medicina*, Tipogr. Leuzinger, Rio de Janeiro, 1911, 28 p.
 46. HOWARD, J. E. e RUBIO, M. Enfermedad de Chagas congenita. I. Estudio clinico y epidemiológico de 30 casos. *Bol. Chil. Parasitol.*, 23, 107, 1968.
 47. BITTENCOURT, A. L. The congenital transmission of Chagas' disease as a cause of abortion. *Gaz. Med. Bahia*, 69, 118, 1969.
 48. BITTENCOURT, A.L. e BARBOSA, H. S. A importância do estudo do feto macerado para o diagnóstico da forma congênita da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 14, 260, 1972.
 49. ARAÚJO, M.O.G. Importância epidemiológica da transmissão congênita da doença de Chagas. In: *Situação e Perspectivas do Controle das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Editora Universidade de Brasília, 1981, p. 279.
 50. SALENE, A., YAMICELLI, G.L. e INIGO, L.A. Enfermedad de Chagas-mazza congenita em Tucumán. *Arch. Argent. Pediatr.*, 69, 162, 1971.
 51. BONET, A.H. Epidemiologia de la enfermedad de Chagas en la Republica Argentina. *Ann. Simp. Intern. Enferm. Chagas*, Buenos Aires, 163, 1972.
 52. BITTENCOURT, A.L., BARBOSA H.S., ROCHA, T., SODRÉ, J. e SODRÉ, A. Incidência da transmissão congênita da doença de Chagas em partos prematuros na maternidade Tsylla Balbino, Salvador, Bahia, *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 14, 131, 1972.
 53. CAMPOS, E.S. Tripanossomíase americana congênita experimental do cão. *Med. Prat.*, 2, 57, 1932.
 54. MAZZA, S. Frecuencia y importancia de la infección natural de perros y gatos por *S. cruzi*. *9 Reunion Soc. Argent. Patol. Reg.*, 1, 412, 1936.
 55. TEIXEIRA, A.R.L., TEIXEIRA, M.L. e SANTOS-BUCH, C.A. The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *Am. J. Path.*, 80, 163, 1975.
 56. NATTAN-LARRIER, L. Herédité des infections experimentales a *Schizotrypanum cruzi*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 14, 232, 1921.
 57. APT. W., NÁQUIRA, C. e STROZZI, L. Transmisión congenita del *Trypanosoma cruzi*. III. En ratones con infección aguda y crónica. *Bol. chil. Parasitol.*, 23, 15, 1968.

58. MECKERT, P.C., CHAMBO, G.J. e LAGUENS, R.P. Enfermedad congenita secundaria a la infección crónica del ratón con *Trypanosoma cruzi*. *Medicina*, Buenos Aires, 40, 40, 1980.
59. MAZZA, S., MONTANA, A., BENITEZ, C. e JANZI, E. Z. Transmisión del *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. *MEPRA*, 28, 41, 1936.
60. MILES, M.A. *Trypanosoma cruzi*: milk transmission of infection and immunity from mother to young. *Parasitology*, 65, 1, 1972.
61. MEDINA-LOPES, M.D. e MACEDO, V. *Trypanosoma cruzi* no colostro humano. *Rev. Soc. Bras. Med Trop.*, 16, 170, 1983.
62. STORNI, P. e BOLSI, F.L. Embarazo y parasitismo por *Trypanosoma cruzi*. *Medicina*, Buenos Aires, 39, 193, 1979.
63. WOODY, N. C. e WOODY, H. B. *American Trypanosomiasis*. I. clinical and epidemiologic background of Chaga's disease in the United States. *J. Pediatr.*, 58, 568, 1961.
64. GREER, D. A. Found: two cases of Chagas' disease. *Texas Health Bull.*, 9, 11, 1955.
65. SCHIFFLER, R.J., MANSUR, G.P., NAVIN, T.R. e LIMPAKARN-JANARAT, K. Indigenous Chagas' disease (American trypanosomiasis) in California. *JAMA* (in press), 1984.
66. SHAW, J., LAINSON, R. e FRAIHA, J. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones da doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev. Saúde Públ. São Paulo*, 3, 153, 1969.
67. LAINSON, R., SHAW, J., FRAIHA, H., MILES, M. A. e DRAPER, C. C. Chagas' disease in the Amazon Basin. I. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Pará, North Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 73, 193, 1979.
68. DEANE, L. M. Tripanossomídeos de mamíferos da Região Amazônica. I. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 3, 15, 1961.
69. DEANE, L.M. Tripanossomídeos de mamíferos da Região Amazônica. IV. Hemoscopia e xenodiagnóstico de animais silvestres da Estrada Belém-Brasília. *Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo*, 9, 143, 1967.
70. PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Report of a study group on Chagas' disease. *Pan-Am. Health Org. Sci. Publ.*, 195, 1970.

71. FARRAR JR., W. E., KAGAN, I. G., EVERTON, F.D. e SELLERS, T.F. Serological evidence of human infection with *Trypanosoma cruzi* in Georgia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78, 166, 1963.
72. CHICHERO, J.A., BONET, A.H. e SANTAMARIA, N. Estudio de la prevalencia de la enfermedad de Chagas en varones de 20 años de edad en la Prov. de Santiago del Estero. *Sem. Med. Argent.*, 133, 1792, 1967.
73. PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. *Health conditions in the Americas*. 1969-1972. Pan-Am. Health Org. Sci. Publ. 287, 34, 1974.
74. SILVA, G. R. Doença de Chagas em famílias de duas áreas restritas da cidade de Salvador. Tese, Cátedra de Hig. e Med. Preventiva, Fac. Med. Univ. São Paulo, 1966.
75. LITVOC, J. Doença de Chagas e processo migratório no Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Fac. Med. Univ. São Paulo, 1977.
76. MEDRADO FARIA, M., YASUDA, M. A. S., ARAÚJO, M. J. O., LANCAROTTE, I., CATAPANO, E. A. e RUIZ NETO, P. P. Formas clínicas da doença de Chagas na grande São Paulo. *Arq. Bras. Cardiol.*, 28, 99, 1982.
77. CARVALHO, S., GOMES A., IVO, O., FENACCI, A., GALO, O., e AGUIAR A. A. Estudos sobre a moléstia de Chagas numa coletividade operária do município de São Caetano do Sul, São Paulo. *Folha Clín. Biol.*, 22, 9, 1954.
78. VIANA DE PAULA, A. S. Levantamento de mortalidade e aposentadoria por doença de Chagas nas regiões de saúde de Minas Gerais. *In: Modernos conceitos sobre Doença de Chagas*. Eds., Univ. Fed. Minas Gerais/Acad. Mineira de Medicina, Belo Horizonte, 1981, p. 201.
79. MAGUIRE, J. H., MOTT, K. E., LECHMAN, J. S., HOFF, R., MUNIZ, T. GUIMARÃES, A., SHERLOCK, I. e MARROW, R. H. Relationship of electrocardiographic abnormalities and seropositivity to *Trypanosoma cruzi* within a rural community in Northeast Brazil. *Am. Heart Journal*, 105, 287, 1983.
80. PRATA, A. R. Natural history of chagasic cardiomyopathy. *In: American Trypanosomiasis Research*. Pan-Am. Health Organ. Publ. nº 318, 1975, p. 191.
81. MOTT, K. E., LECHMAN, J. S., HOFF, R., MARROW, R. H., MUNIZ, T. M., SHERLOCK, I., DRAPPER, C. C., PUGLIESE, C. e GUIMARÃES, A. C. The epidemiology and household distribution of seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural community in Northeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25, 552, 1976.
82. TEIXEIRA, M. G. L. C. Doença de Chagas. Estudo da forma aguda inaparente. Tese, Fac. Med. Univ. Federal Rio de Janeiro, 1977. 51 p.

83. ROSSI, A. Clínica: Fase aguda. In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Z. Brener e Z. A. Andrade Eds., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1979, p. 249.
84. MACEDO V. Forma indeterminada da doença de Chagas. *J. Bras. Med.*, 38, 34, 1980.
85. LOPES, E. R., CHAPADEIRO, F., ALMEIDA, H. de O. e ROCHA, A. Contribuição ao estudo da anatomia patológica dos corações de chagásicos falecidos subitamente. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*, 9, 269, 1975.
86. ANDRADE, Z. A. e ANDRADE, S. G. Chagas' disease. (American Trypanosomiasis). In: *Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases*. R.A. Marcial-Rojas, Ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1971.
87. KÖBERLE, F. e NADOR, E. Etiologia e patogenia do megasôfago no Brasil. *Rev. Paul. Med.*, 47, 643, 1955.
88. KÖBERLE, F. Patogenia da moléstia de Chagas. Estudo dos órgãos musculares ociosos. *Rev. Goiana Med.*, 3, 155, 1957.
89. ANDRADE, Z. A. e ANDRADE, S. G. O coração nos megas do aparelho digestivo. *O Hospital*, 71, 129, 1967.
90. TAFURI, W. L. e BRENER, Z. Lesões dos plexos de Meissner e de Auerback do intestino do camundongo albino na fase crônica da *Trypanosomiasis cruzi* experimental. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 9, 149, 1967.
91. TAFURI, W. L. Patogênese das lesões do sistema nervoso autônomo do intestino na doença de Chagas experimental. *Rev. Goiana Med.*, 14, 11, 1968.
92. LAGUENS, R. P., COSSIO, P. M., DIEZ, C., SEGAL, A., VASQUEZ, C., KREUTZER, E., KHOURY, E. e ARANA, R. Immunopathologic and morphologic studies of skeletal muscle in Chagas' disease. *Am. J. Path.*, 80, 153, 1975.
93. TAFURI, W. L., LIMA FERREIRA, F. E., BOGLIOLO, L. e RASO, P. Lesões do sistema nervoso autônomo e do tecido muscular esquelético na fase crônica da *Trypanosomose cruzi* experimental. Estudos ao microscópio ótico e eletrônico. *Rev. Goiana Med.*, 26, 61, 1979.
94. TORRES, C.B.M. Patogênica de la miocarditis crônica en la enfermedad de Chagas. *5 Reunion de la Sociedad Argentina de Patologia Regional del Norte*, Jujuy, Argentina 2, 902, 1930.
95. SANTOS-BUCH, C. A. e TEIXEIRA, A. R. L. The immunology of experimental Chagas' disease. III. Rejection of allogeneic heart ceels in vitro. *J. Exp. Med.*, 140, 38, 1974.
96. BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 59, 19, 1965.
97. BICE, D. C. e ZELEDON, R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J. Parasitol.*, 56, 663, 1970.

98. ANDRADE, S. G. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strains in some types. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 18, 140, 1976.
99. MILES, M. A., SOUZA, A., POVOA, M., SHAW, J. J., LAINSON, R. e TOYE, P. J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*, 272, 819, 1978.
100. ROMANHA, A. J., PEREIRA A. A. S., CHIARI, E. e KILGOUR V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*. Changes after prolonged subcultures. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B, 139, 1979.
101. BARRET, T. V., HOFF, K. E., MOTT, K. E., MILES, M. A., GODFREY, D. G., TEIXEIRA, R., ALMEIDA DE SOUZA, J. A. e SHERLOCK, I. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74, 84, 1980.
102. GOLDBERG, S. S. e PEREIRA, A. A. S. Enzyme variation among clones of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.*, 69, 91, 1983.
103. TAYLOR, A. E. R., EDWARDS, Y. H., SMITH, V., MILES, M. A. e GIBSON, W. C. The polypeptide profiles of strains of the *Trypanosoma* subgenera *Schizotrypanum* and *Trypanozoon*. Peptideme characterization. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77, 354, 1983.
104. MATTEI, D. M., GOLDENBERG, S., MOREL, C., AZEVEDO, H. P. e ROITMAN, I. Biochemical strain characterization of *Trypanosoma cruzi* by restriction endonucleases cleavage of kinetoplast-DNA. *FEBS Letters*, 74, 264, 1977.
105. MOREL, C., CHIARI, E., CAMARGO, E. P., MATTEI, D. M. e SIMPSON L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77, 6610, 1980.
106. DVORAK, J. A., HARTMAN, D. L. e MILES, M. A. *Trypanosoma cruzi* correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. *J. Protozool.*, 27, 472, 1980.
107. ENGEL, J. C., DVORAK, J. A., SEGURA, E. L. e CRANE, M. St. J. *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid medium. *J. Protozool.*, 29, 555, 1982.
108. GARCIA, E. S. e DVORAK, J. A. Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31, 259, 1982.
109. BONGERTZ, V. e DVORAK, J. A. *Trypanosoma cruzi*: Antigenic analysis of cloned stocks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32, 716, 1983.
110. POSTAN, M., DVORAK, J. A. e MCDANIEL, J. P. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infections of C3H/HEN⁻ mice with two clones isolated from a common source. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33, 497, 1983.

111. OKAULA E. O., STUMPF, J. L. e DUSANIC, D. G. Crossed-immunoelectrophoretic analyses of *Trypanosoma cruzi* epimastigote, metacyclic, and bloodstream forms. *J. Parasitol.*, 68, 538, 1982.
112. AFCHAIN, D. e CAPRON, A. Etude préliminaire des antigènes solubles de *Trypanosoma cruzi*. Applications à la trypanosomiase expérimentale de la souris. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 269, 272, 1969.
113. AFCHAIN, D., FRUIT, J., YAZARBAL, L. e CAPRON, A. Purification of a specific antigen of *Trypanosoma cruzi* from culture forms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27, 478, 1978.
114. FRUIT, J., AFCHAIN, D., PETITPREZ, A. e CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi*: Location of a specific antigen on the surface of bloodstream trypomastigote and culture epimastigote forms. *Exp. Parasitol.*, 45, 183, 1978.
115. OROZCO, O., AFCHAIN, D., RODRIGUEZ, C. OVLAQUE, G., LOYENS, M. e CAPRON, A. Production d'un anticorps monoclonal anti-antigène 5 de *Trypanosoma cruzi*. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 295, 783, 1982.
116. TEIXEIRA, A. R. L. e SANTOS-BUCH, C. A. The immunology of experimental Chagas' disease. I. Preparation of *Trypanosoma cruzi* antigens and humoral antibody response to these antigens. *J. Immunol.*, 113, 859, 1974.
117. SEGURA, E. L., CURA, E. N., PAULONE, I., VASQUEZ, C. e CERISOLA, J. A. Antigenic make up of subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.*, 21, 571, 1974.
118. TEIXEIRA, A. R. L. e SANTOS-BUCH, C. A. The immunology of experimental Chagas' disease. II. Delayed-hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* antigens. *Immunology*, 28, 401, 1975.
119. SEGURA, E. L. VAZQUEZ, C., BRONZINA, A., CAMPOS, J. M., CERISOLA, J. A. e GONZALEZ-CAPPA, S. M. Antigens of the subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi* II. Flagellar and membrane fraction. *J. Protozool.*, 24, 540, 1977.
120. GONZALEZ-CAPPA, S. M., BRONZINA, A., KATZIN, A. M., GOLFERA, H., DE MARTINI, G. W. e SEGURA, E. L. Antigens of subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. II. Flagellar and membrane response and histopathology of immunized mice. *J. Protozool.*, 27, 467, 1980.
121. FIFE, E. H. e KENT, J. F. Protein and carbohydrate complement fixing antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 9, 512, 1960.
122. SENECA, H. e PEER P. Immunobiological properties of Chagastoxin (lipopolysaccharide). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 60, 610, 1966.
123. GONÇALVES, J. M. e YAMAHA, T. Immunochemical polysaccharide from *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 72, 39, 1969.

124. KIERSZENBAUM, F. e BUDZKO, D. B. Immunological properties of a trypanosomal lipopolysaccharide and its effects on the infection with *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Immunol. Commun.*, 2, 265, 1973.
125. SOUZA, W. e MEYER, H. An electron microscopic and cytochemical study of the cell coat of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures. *Z. Parasitenkd.*, 46, 179, 1975.
126. GOTTLIEB, M. A carbohydrate-containing antigen from *Trypanosoma cruzi* and its detection in the circulation of infected mice. *J. Immunol.*, 119, 465, 1977.
127. GOTTLIEB, M. *Trypanosoma cruzi*. Identification of a cell surface polysaccharide. *Exp. Parasitol.*, 45, 200, 1978.
128. GOLDBERG, S., CORDEIRO, M. N., PEREIRA, A. A. S. e MARESGUIA M. L. Release of lipopolysaccharide (LPS) from cell surface of *Trypanosoma cruzi* by EDTA. *Int. J. Parasitol.*, 13, 11, 1983.
129. SIQUEIRA, A. F., FERRIOLI, F. e CARVALHEIRO, J. R. Um antígeno solúvel presente no soro de ratos infectados com *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 8, 148, 1966.
130. DZBENSKI, T. H. Exoantigens of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Tropenmed. Parasitol.*, 25, 485, 1974.
131. ARAÚJO, F. G. Immunology of Chagas' disease. I. Circulating antigens in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 18, 433, 1976.
132. ARAÚJO, F. G., NASCIMENTO, E. e MORATO, M. J. F. Immunization and enhancement properties of the circulating antigens of *T. cruzi*. *Trans. R. Soc. Med. Trop. Hyg.*, 72, 534, 1978.
133. LEDERKREMER, R. M., ALVES, M. J. M., FONSECA, G. C. e COLI, W. A lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* (epimastigota). Isolation purification and carbohydrate composition. *Biochim. Biophys. Acta*, 444, 85, 1976.
134. SILVEIRA, J. P., ABRAHAMSOHN, I. A. e COLI, W. Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta*, 550, 222, 1979.
135. KETTERIDGE, D. S. Lipopolysaccharide from *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72, 101, 1978.
136. GOLDMAN, R. C. e LEIVE, L. Heterogeneity of antigenic side chain length in lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 011 and *Salmonella typhimurium* LT2. *Eur. J. Biochem.*, 107, 145, 1980.
137. SNARY, D. e HUDSON, L. *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins: identification of one major glycoprotein. *FEBS letters*, 100, 166, 1979.
138. SNARY, D. *Trypanosoma cruzi*. Antigenic invariance of the cell surface glycoprotein. *Exp. Parasitol.*, 49, 68, 1980.

139. NOGUEIRA, N. CHAPLAN, S., TYDINGS, J. D., UNKELESS, J. e COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: Surface antigens of blood and culture forms. *J. Exp. Med.*, 153, 629, 1981.
140. NOGUEIRA, N., UNKELESS, J. e COHN, Z. Specific glycoprotein antigens on the surface of insect and mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1259, 1982.
141. KLOETZEL, J., CAMARGO, M. E. e GIOVANINI, V. L. Antigenic differences among epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.*, 22, 259, 1975.
142. GAM, A. A. e NEVA, F. A. Comparison of cell-culture with epimastigote antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26, 47, 1977.
143. SANTIAGO, A. R., AFCHAIN, D. e CAPRON, A. Specific antigens of *Trypanosoma cruzi* amastigotes and trypomastigotes. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 61, 369, 1981.
144. ARAÚJO, F. e REMINGTON, J. S. Characterization of stages and strains of *Trypanosoma cruzi* by analysis of cell membrane components. *J. Immunol.*, 127, 855, 1981.
145. YASHIDA, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Infec. Immunity*, 40, 836, 1983.
146. ZINGALES, B., ANDREWS, N. W., KUWAJIMA, V. Y. e COLLI, W. Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 6, 111, 1982.
147. SNARY, D., FERGUSON, M. A. J., SCOTT, M. T. e ALLEN, A. K. Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 3, 1, 1981.
148. SHER, A. e SNARY, D. Specific inhibition of the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* by a monoclonal antibody. *Nature*, 300, 639, 1982.
149. KIRCHHOFF, L. V., ENGEL, J. C., DVORAK, J. A. e SHER, A. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* differ in their expression of a surface antigen identified by a monoclonal antibody. (in press).
150. ARAÚJO, F. G., SHARMA, S. D., COX, V. T. P. e REMINGTON, J. Monoclonal antibodies to stages of *Trypanosoma cruzi*: Characterization and use for antigen detection. *Infec. Immunity*, 37, 344, 1982.
151. ALVES, M. J. M., AIKAWA, M. e NUSSENZWEIG, R. S. Monoclonal antibodies to *Trypanosoma cruzi* inhibit motility and nucleic acid synthesis of culture forms. *Infec. Immunity*, 39, 377, 1983.
152. LANE, D. e KOPROVSKY, H. Molecular recognition and the future of monoclonal antibodies. *Nature*, 296, 209, 1982.
153. ALVES, M. J. M. e COLLI, W. Agglutination of *Trypanosoma cruzi* by concanavalin A. *J. Protozool.*, 21, 575, 1974.
154. MARCIPAR, A. J., LEUTWOJT, E., SEGARD, E., AFCHAIN, A.

- FRUIT, J. e CAPRON, A. Peanut agglutinin affinity chromatography of *T. cruzi* glycoproteins. *Parasit. Immunol.*, 4, 109, 1982.
155. SCHOTTELIUS, J. The identification by lectins of two strain groups of *Trypanosoma cruzi*. *Z. Parasitenkd.*, 68, 147, 1982.
156. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Proposals for the nomenclature of salivarian trypanosomes and for the maintenance of reference collections. *Bull. World Health Organiz.*, 56, 467, 1978.
157. PIZZI, T., RUBIO, M. e KNIERIM, F. Immunologia de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chil. Parasitol.*, 9, 35, 1954.
158. TRISCHMAN, T., TANOWITZ, H., WITTNER, M. e BLOOM, B. *Trypanosoma cruzi*: Role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.*, 45, 160, 1978.
159. WRIGHTSMAN, R. KRASSNER, S. e WATSON, J. Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. *Infec. Immunity*, 36, 637, 1982.
160. TRISCHMAN, T. M. e BLOOM B. R. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infec. Immunity*, 35, 546-51, 1982.
161. RIVERA-VANDERPAS, M. T., RODRIGUEZ, A. M., AFCHAIN, D. BAZIN, H. e CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi*: variation in susceptibility of inbred strains of rats. *Acta Tropica*, 40, 5, 1983.
162. FERREIRA, E., NEVA, F., GUSMÃO, R., WARD, F., REZENDE, J., RASSI, A., AMOS, D. B., JOHNSON, A. H. HLA and Chagas' disease. Abstracts, *Congresso Internacional sobre Doença de Chagas*, Rio de Janeiro, 1979. p. 181.
163. DIAS, E. Immunité naturelle des animaux à sang froid vis-à-vis de l'infection par le *Trypanosoma cruzi*. *Compt. R. Soc. Biol.* 112, 1474, 1933.
164. RUBIO, M. Actividad lítica de sueros normales sobre formas de cultivo y sanguíneas de *Trypanosoma cruzi*. *Bol. Chil. Parasitol.*, 11, 62, 1956.
165. DIAS, E. Não-receptividade do pombo doméstico à infecção por *Schizotrypanum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 40, 181, 1944.
166. NERY-GUIMARÃES, F. e LAGE, H. A. A refratariedade das aves ao *Trypanosoma (S.) cruzi*. Refratariedade das galinhas desde o nascimento, persistência da refratariedade após bursectomia, infecções em ovos embrionados. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 70, 97, 1972.
167. TEIXEIRA, A. R. L. Immunoprophylaxis against Chagas' disease. In: *Immunity to Blood Parasites of Animals and Man*. L. H. Miller, J. A. Pino, e J. J. Mckelvey, Eds., Plenum Publishing Corporation, Nova Iorque, 1977, p. 243.

168. NEVA, F. A., MALONE, M. F. e MYERS, B. R. Factors influencing the intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 10, 140, 1961.
169. KIERSZENBAUM, F., IVANYI, J. e BUDZKO, D. B. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*, 30, 1, 1976.
170. KIERSZENBAUM F., GOTTLIEB, C. A. e BUDZKO, D. B. Antibody-independent, natural resistance of birds to *T. cruzi* infection. *J. Parasitol.*, 67, 656, 1981.
171. SONNENFELD, G. e KIERSZENBAUM, F. Increased serum levels of an interferon-like activity during the acute period of experimental infection with different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30, 1189, 1981.
172. KIERSZENBAUM, F. e SONNENFELD, G. Characterization of the antiviral activity produced during *Trypanosoma cruzi* infection and protective effects of exogenous interferon against experimental Chagas' disease. *J. Parasitol.*, 68, 194, 1982.
173. JAMES, S., KIPNIS, T., SHER, A. e HOFF, R. Enhanced resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice treated with and interferon inducer. *Infec. Immunity*, 35, 588, 1982.
174. HATCHER, F. M. e KUHN, R. E. Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells. *Science*, 216, 296, 1982.
175. SANDERSON, C. J., LOPES, A. F. e BRUN MORENO, M. M. Eosinophils and not lymphoid K cells kill *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Nature*, 268, 5618, 1977.
176. HATCHER, F. M., KUHN, R. E., CERRONE, M. C. e BURTON, R. C. Increased natural killer cell activity in experimental American trypanosomiasis. *J. Immunol.*, 127, 1126, 1981.
177. PIZZI, T., RUBIO, M. e KNIERIM, F. Immunologia de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chil. Parasitol.*, 9, 35, 1954.
178. MILDER, R. V., KLOETZEL, J. e DEANE, M. P. Observation on the interaction of peritoneal macrophages with *Trypanosoma cruzi*. I. initial phase of the relationship with blood stream and culture forms *in vitro*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 15, 386, 1973.
179. CARVALHO, R. M. G., MEIRELLES, M. N. L., SOUZA, W. e LEON, W. Isolation of the intracellular stage of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with mouse macrophages *in vitro*. *Infec. Immunity*, 33, 546, 1981.
180. KRESS, Y., BLOOM, B. R., WITTNER, M., ROWEN, A. e TANOWITZ, H. Resistance of *Trypanosoma cruzi* to killing by macrophages. *Nature*, 257, 394, 1975.
181. TANOWITZ, H., WITTNER, M., KRESS, Y. e BLOOM, B. Studies of *in vitro* infection by *Trypanosoma cruzi*. I. Ultrastructural studies on

- the invasion of macrophages and L-cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24, 25, 1975.
182. IGAROSHI, T., OKADA, M., AZUMA, I. e YAMAMURA, A. Adjuvant activity of synthetic N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine and related compounds on cell-mediated cytotoxicity in syngeneic mice. *Cell. Immunol.*, 34, 270, 1977.
183. FERRARESI, R. W. e KIERSZENBAUM, F. Enhancement of host resistance against *Trypanosoma cruzi* infection by the immunoregulatory agent muramyl dipeptide. *Infec. Immunity*, 25, 273, 1979.
184. RUBIOLO, R. E. Immunogenicity of *Trypanosoma cruzi* in different animal species. *Acta Physiol. Lat. Amer.*, 31, 199, 1981.
185. TEIXEIRA, A. R. L. Competência imunológica do paciente chagásico. Imunodepressão na forma aguda inaparente. Auto-imunidade no hospedeiro imunizado. Tese, Fac. Med. Univ. Federal Minas Gerais, Belo Horizonte, 1981. 168 p.
186. SCHMUNIS, G. A., SZARFMAN, A., COARASA, L., GUILLERON, C. e PERALTA, J. M. Anti-*Trypanosoma cruzi* agglutinins in acute human Chagas'disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29, 170, 1980.
187. SÁ FERREIRA, J. A., GALVÃO-CASTRO, B., MACEDO, W. e CASTRO, C. Immunoglobulins and other serological parameters in Chagas'disease: evidence for increased IgA levels in the chronic digestive form, *Clin. Exp. Immunol.*, 52, 266, 1983.
188. HANSON, W. L. Immune response and mechanisms of resistance in *Trypanosoma cruzi*. PAHO Scientific Publ., 347, 22, 1977.
189. ABELHA, J., AZEVEDO, M. O. e TEIXEIRA, A. R. L. *Trypanosoma cruzi*: Antigen-receptor mediated endocytosis of antibody. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 76, 213, 1981.
190. AUST-KETTIS, A. e SUNDGVIST, K. G. Dynamics of the interaction between *Entamoeba histolytica* and components of the immune response. *Scand J. Immunol.*, 7, 35, 1978.
191. AUST-KETTIS, A. e SUNDGVIST, K. G. Dynamics of the interaction between *Entamoeba histolytica* and components of the immune response. II. On distinction of surface-bound and internalized anti-amoeba antibodies. *Scand. J. Immunol.*, 12, 443, 1980.
192. AUST-KETTIS, A., THORSTENSSON, R. e SUNDGVIST, K. G. Dynamics of the interaction between *Entamoeba histolytica*. III. Fate of antibodies after binding to the cell surface. *Scand. J. Immunol.*, 13, 473, 1981.
193. TAYLOR, R. B., DUFFUS, W. P. H., RAFF, M. C. e DE PETRIS, S. Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. *Nature New Biol.*, 233, 225, 1971.
194. GRIFFIN, F. M., GRIFFIN, J. A. e SILVERSTEIN, S. C. Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages

- with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow derived lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 144, 788, 1976.
195. FINBLOOM, D. S. Assessment of Fc (IgG) receptor function in adherent murine peritoneal macrophages using soluble model immune complexes. *Cell. Immunol.*, 74, 294, 1982.
 196. SEGAL, D. M., DOWER, S. K. e TITUS, J. A. The FcR-mediated endocytosis of model immune complexes by cells from the P338D₁ mouse macrophage line. I. Internalization of small nonaggregating oligomers of IgG. *J. Immunol.*, 130, 130, 1983.
 197. CHERIAN, P. V. e DUSANIC, D. G. *Trypanosoma lewisi*: Ultrastructural observations of surface antigen movement induced by antibody. *Exp. Parasitol.*, 44, 14, 1978.
 198. MARSDEN, P. D., SEAH, S. K. K., MOTT, K. E., PRATA, A., e PLATT, H. Immunoglobulins in Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73, 157, 1970.
 199. TAKEHARA, H. A., PERINI, A., DA SILVA, M. H. e MOTA, I. *Trypanosoma cruzi*: Role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exp. Parasitol.*, 52, 137, 1981.
 200. CORSINI, A. C., BRAZ, R., CIAMPI, D. B. e ZUCATO, M. R. L. Resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in relation to the timing of IgG humoral response. *Z. Parasitenkd.*, 68, 14, 1982.
 201. KRETTLI, A. U. e BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.*, 116, 755, 1976.
 202. KIERSZENBAUM, F. e HOWARD, J. G. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: The importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J. Immunol.*, 116, 1208, 1976.
 203. TRISCHMAN, T., TANOWITZ, H. B., WITTNER, M. e BLOOM, B. *Trypanosoma cruzi*: Role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.*, 45, 160, 1978.
 204. KIERSZENBAUM, F. Protection of congenitally athymic mice against *T. cruzi* infection by parasite antibody transfer. *J. Parasitol.*, 66, 673, 1980.
 205. RODRIGUEZ, A. M., SANTORO, F., AFCHAIN, D., BAZIN, H. e CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient rats. *Infect. Immunity*, 31, 524, 1981.
 206. SCOTT, M. T. The nature of immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice recovered from acute infection. *Parasit. Immunol.*, 3, 209, 1981.
 207. BURGESS, D. E., KUHN, R. E. e CARLSON, K. S. Induction of parasite-specific helper T lymphocytes during *T. cruzi* infections in mice. *J. Immunol.*, 127, 2092, 1981.
 208. MUNIZ, J. e SANTOS, M. C. F. Heterophile antibodies in American Trypanosomiasis. The presence of heterogenetic component (s) in

- the antigenic structure of the *Schizotrypanum cruzi* shown by "conditioned hemolysis" reaction. *O Hospital*, 38, 163, 1950.
209. AMATO NETO, V. e SILVA, L. P. H. Anticorpos heterófilos na doença de Chagas. Resultados obtidos em casos agudos e crônicos. *O Hospital*, 45, 39, 1954.
 210. LELCHUCK, R., DALMASSO, A. P., INGLESINI, C. L. ALVAREZ, M. e CERISOLA, J. A. Immunoglobulins in serum of patients with American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. Exp. Immunol.*, 6, 547, 1970.
 211. CUNNINGHAM, D. S., KUHN, R. E., TARLETON, R. L. e DUNN, R. S. *Trypanosoma cruzi*: effect on B-cell-responsiveness and-responding clones. *Exp. Parasitol.*, 51, 257, 1981.
 212. LENZI, H. L., LENZI, J. G. A. e ANDRADE, Z. A. Experimental production of EVI antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31, 48, 1982.
 213. CORSINI, A. C. e COSTA, A. G. Immunosuppression in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. I. Evidences of policlonal B cell activation in experimental infections mimicked by an extract prepared from circulating trypomastigotes. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 23, 114, 1981.
 214. KHOURY, E. L., DIEZ, C., COSSIO, P. M. e ARANA, R. M. Heterophile nature of EVI antibody in *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Immun. Immunopath.*, 27, 283, 1983.
 215. ORTIZ-ORTIZ, L., PARKS, D. E., RODRIGUEZ, M. e WEIGLE, W. Policlonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.*, 124, 121, 1980.
 216. TARLETON, R. L. e KUHN, R. E. Changes in cell populations and immunoglobulin-producing cells in the spleens of mice infected with *T. cruzi*. Correlations with parasite-specific antibody response. *Cell. Immunol.*, 80, 392, 1983.
 217. TANOWITZ, H. B., MINATO, N., LALONDE, R. e WITTNER, M. *T. cruzi* correlation of resistance and susceptibility in infected inbred mice with the *in vivo* primary antibody response in sheep red blood cells. *Exp. Parasitol.*, 52, 233, 1981.
 218. KLOETZEL, J. e DEANE, M. P. Presence of immunoglobulins on the surface of bloodstream *Trypanosoma cruzi*. Capping during differentiation in culture. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 19, 397, 1977.
 219. SCHMUÑIS, G. A., SZARFMAN, A., LANGEMBACH, T. e SOUZA, W. Induction of capping in blood-stage trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* by human anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies. *Infec. Immunity*, 20, 567, 1978.
 220. SCHMUÑIS, G. A., SZARFMAN, A., SOUZA, W. e LANGEMBACH, T. *Trypanosoma cruzi*, antibody-induced mobility of surface antigens. *Exp. Parasitol.*, 50, 90, 1980.

221. NOGUEIRA, N., BIANCO, C. e COHN, Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.*, 142, 224, 1975.
222. BUDZKO, D. B., PIZZIMENTI, M. C. e KIERSZEMBAUM, F., Effects of complement depletion in experimental Chagas disease. *Infec. Immunity*, 11, 1975.
223. KIERSZENBAUM, F. Cross-reactivity of lytic antibodies against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.*, 62, 134, 1976.
224. KRETTLI, A. U., WEISZ-CARRINGTON, P. e NUSSENZWEIG, R. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice. Strain differences in susceptibility to complement mediated lysis. *Clin. Exp. Immunol.*, 37, 416, 1979.
225. DALMASSO, A. P. e JARVINEN, J. A. Experimental Chagas' disease in complement-deficient mice and guinea pigs. *Infec. Immunity*, 28, 434, 1980.
226. CUNNINGHAM D. S., CRAIG, W. H. e KUHN, R. E. Reduction of complement levels in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.*, 64, 1044, 1978.
227. KIPNIS, T. L., DAVID, J. R., ALPER, C. A., SHER, A. e DIAS DA SILVA, W. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78, 602, 1981.
228. CUNNINGHAM, D. S., BREWER, T. E., KUHN, R. E. e CRAIG, W. H. Partial characterization of a *Trypanosoma cruzi* - released complementing factor. *J. Parasitol.*, 67, 475, 1981.
229. REYNOLDS, B. L. e PRUUL, H. Protective role of smooth lipopolysaccharide in the serum bactericidal reaction. *Infec. Immunity*, 4, 764, 1971.
230. JOINER, K. A., HAMMER, C. H., BROWN, E. J., COLE, R. J. e FRANK, M. M. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. I. Terminal complement components are deposited and released from *Salmonella minnesota* S218 without causing bacterial death. *J. Exp. Med.*, 155, 797, 1982.
231. VON BRAND, T., TOBIE, E. J., KISSLING, R. E. e ADAMS, G. Physiological and pathological observations on four strains of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.*, 85, 5, 1949.
232. KRETTLI, A. U. e BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to antiliving trypomastigote antibodies. *J. Immunol.*, 128, 2009, 1982.
- 232a. LIMA MARTINS, M. V. C., SANCHEZ, G. A., KRETTLI, A. U. e BRENER, Z. Antibody-dependent cell toxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. *Parasit. Immunol.*, 7, 367-376, 1985.

233. ABRAHAMSOHN, I. A. e DIAS DA SILVA, W. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 75, 317, 1977.
234. SANDERSON, C. J., LOPEZ, A. F. e BUNN MORENO, M. M. Eosinophils and not lymphoid K cells kill *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Nature*, 268, 340, 1977.
235. LOPEZ, A. F., BUNN MORENO, M. M. e SANDERSON, C. J. The lysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes by eosinophils and neutrophils. *Inter. J. Parasitol.*, 76, 299, 1978.
236. OLABUENAGA, S. E., CARDONE, R. L., SEGURA, E. L., RIERA, N. E. e DE BRACCO, M. M. E. Antibody-dependent cytolysis of *Trypanosoma cruzi* by human polymorphonuclear leucocytes. *Cell. Immunol.*, 45, 85, 1979.
237. MADEIRA, E. D., ANDRADE, A. F. B., BUNN MORENO, M. M. e BARCINSKY, M. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi*. Characterization of the effector cell from normal human blood. *Infec. Immunity*, 25, 34, 1979.
238. KIERSZENBAUM, F. Antibody-dependent killing of blood stream forms of *Trypanosoma cruzi* by human peripheral blood leucocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28, 965, 1979.
239. OKALE, K., KIPNIS, T. L., CALICH, V. L. G. e DIAS DA SILVA, W. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. I. Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity to trypomastigote bloodstream forms. *Clin. Immunol. Immunopath.*, 16, 344, 1980.
240. KIPNIS, T. L., JAMES, S. J., SHER, A. e DAVID, J. R. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. II. Antibody-dependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30, 47, 1981.
241. SANDERSON, C. J. e SOUZA, W. A morphological study of the interactions between *Trypanosoma cruzi* and rat neutrophils, eosinophils and macrophages *in vitro*. *J. Cell. Sci.*, 37, 275, 1979.
242. TEIXEIRA, A. R. L., ROTERS, F. e MOTT, K. E. Acute Chagas' disease. *Gaz. Med. Bahia*, 3, 176, 1970.
243. CARDONI, R. L., DOCAMPO, R. e CASELLAS, A. M. Metabolic requirements for the damage of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes by human polymorphonuclear leucocytes. *J. Parasitol.*, 68, 547, 1982.
244. CARDONI, R. L., OLABUENAGA, S. E., RIERA, N. E. e DE BRACCO, M. M. E. Mecanismos inmunológicos efectores en la infección con *Trypanosoma cruzi*. Actividad citotóxica dependiente de anticuerpo de los leucocitos polimorfonucleares humanos. *Medicina*, Buenos Aires, 40, suppl., 1, 77, 1980.
245. LOGAN, L. L. e HANSON, W. L. *Trypanosoma cruzi* morphogenesis in diffusion chambers in the mouse peritoneal cavity and attempted stimulation of host immunity. *Exp. Parasitol.*, 36, 439, 1974.

246. GOBLE, F. C. e BOYD, J. L. Reticuloendothelial blockage in experimental Chagas' disease. *J. Parasitol.* 48, 223, 1962. -
247. KUMAR, R., KLINE, I. K. e ABELMAN, W. H. Immunosuppression in experimental subacute chagasic myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 19, 932, 1970.
248. ROBERSON, E. L., CHAPMAN JR., W. L. e HANSON, W. L. The effects of total body irradiation on *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas' disease) in mice and rats. *Z. Parasitenkd.*, 41, 83, 1973.
249. KOHL, S., PICKERING, L. K., FRANKEL, L. S. e YAEGER, R. G. Reactivation of Chagas' disease during therapy of acute lymphocytic leukemia. *Cancer*, 50, 827-8, 1982.
250. SCHMUNIS, G. A., GONZALEZ-CAPPA, S. M., TRAVERSA, O. C. e YANOVSKY, J. F. The effect of immunodepression due to neonatal thymectomy in infection with *Trypanosoma cruzi* in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 65, 89, 1971.
251. KIERSZENBAUM, F. e PIENKOWSKI, M. M. Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infec. Immunity*, 24, 117, 1979.
252. RODRIGUEZ, A. M., AFCHAIN, D., SANTORO, F., BAZIN, H. e CAPRON, A. Parasitological and immunological aspects of *Trypanosoma cruzi* infection in nude rats. *Z. Parasitenkd.*, 69, 141, 1983.
253. RIBEIRO DOS SANTOS, R. Contribuição ao estudo da imunidade na fase aguda da doença de Chagas experimental. *Rev. Pat. Trop.*, 2, 433, 1973.
254. ROBERSON, E. L. e HANSON, W. L. Transfer of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68, 338, 1974.
255. KUHN, R. E. e DURUM, S. K. The onset of immune protection in acute experimental Chagas disease in C3H (He) mice. *Intern. J. Parasitol.*, 5, 241, 1975.
256. BURGUESS, D. E. e HANSON, W. L. Adoptive transfer of protection against *Trypanosoma cruzi* with lymphocytes and macrophages. *Infec. Immunity*, 25, 838, 1979.
257. NOGUEIRA, N., ELLIS, J., CHAPLAN, S. e COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: In vivo and in vitro correlation between T-cell-activation and susceptibility in inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.*, 51, 325, 1981.
258. REED, S. G. Adoptive transfer of resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection with T-lymphocyte-enriched spleen cells. *Infec. Immunity*, 28, 404, 1980.
259. KAGAN, I. G. e NORMAN, L. Immunologic studies on *trypanosoma cruzi*. III. Duration of acquired immunity in mice initially infected with a North American strain of *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.*, 108, 213, 1961.
260. McHARDY, N. Passive protection of mice against infection with *Trypanosoma cruzi* with plasma: the use of blood and vector bug-derived trypomastigote challenge. *Parasitology*, 80, 471, 1980.

261. TRYSCHMAN, T. M. e BLOOM, B. R. *Trypanosoma cruzi*: ability of T-cell enriched and depleted lymphocyte populations to passively protect mice. *Exp. Parasitol.*, 49, 225, 1980.
262. SCOTT, M. T. The nature of immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice recovered from acute infection. *Parasit. Immunol.*, 3, 209, 1981.
263. SCOTT, M. T. e SNARY, D. American Trypanosomiasis (Chagas' Disease). In: *Immunology of Parasitic Infections*. S. Cohen e K. S. Warren, Eds., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982.
264. BURGESS, D. E. e HANSON, W. L. *Trypanosoma cruzi*: The T-cell dependence of the primary immune response and the effects of depletion of T cells and Ig-bearing cells on immunological memory. *Cell. Immunol.* 52, 176, 1980.
265. CORSINI, A. C. e STELINI, JR., A. Immune T cells control *Trypanosoma cruzi* infections. *Experientia*, 37, 904, 1981.
266. SEAH, S. Delayed-hypersensitivity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*, 225, 1256, Londres, 1970.
267. YANOVSKY, J. F. e ALBADO, E. Humoral and cellular responses to *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, 109, 1159, 1972.
268. MONTUFAR, O. M. B., MUSATTI, C. C., MENDES, E. e MENDES, N. Cellular immunity in chronic Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.*, 5, 401, 1977.
269. TSCHUDI, E. I., ANZIONO, D. E. e DALMASSO, A. P. Lymphocyte transformation in Chagas' disease. *Infec. Immunity*, 6, 905, 1972.
270. MOSCA, W. e PLAJA, J. Delayed hypersensitivity to heart antigens in Chagas' disease measured by *in vitro* lymphocyte stimulation. *J. Clin. Microbiol.*, 14, 1, 1981.
271. CUNNINGHAM, D. S. e KUHN, R. E. Lymphoblast transformation as a measure of immune competence during experimental Chagas' disease. *J. Parasitol.*, 66, 390, 1980.
272. MALECKAR, J. R. e KIERSZENBAUM, F. Variations in cell-mediated immunity to *Trypanosoma cruzi* during experimental Chagas' disease. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 77, 247, 1983.
273. CLINTON, B. A., ORTIZ-ORTIZ, L., GARCIA, W., MARTINEZ, T. e CAPIU, R. *Trypanosoma cruzi*: early immune response in infected mice. *Exp. Parasitol.*, 37, 417, 1974.
274. REED, S. G., LARSON, C. L. e SPEER, C. A. Suppression of cell-mediated immunity in experimental Chagas' disease. *Z. Parasitenkd.*, 52, 11, 1977.
275. TEIXEIRA, A. R. L., TEIXEIRA, G., MACEDO, V. e PRATA, A. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. *J. Clin. Invest.*, 62, 1132, 1978.
276. ROWLAND, E. C. e KUHN, R. E. Suppression of anamnestic cellular responses during experimental American Trypanosomiasis. *J. Parasitol.*, 64, 741, 1978.

277. RAMOS, C. E., LAMOYI, E., FEOLI, M., RODRIGUEZ, M., PEREZ, M. e ORTIZ-ORTIZ, L. *Trypanosoma cruzi*: immunosuppressed response to different antigens in infected mice. *Exp. Parasitol.*, 45, 190, 1978.
278. RAMOS, C. I., SCHÄTDLER-SIWON, I. e ORTIZ-ORTIZ, L. Suppressor cells present in the spleen of *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J. Immunol.*, 122, 1243, 1979.
279. HAYES, M. M. e KIERSZENBAUM, F. Experimental Chagas' disease: Kinetics of lymphocyte responses and immunological control of the transition from acute to chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Infec. Immunity*, 31, 1117, 1981.
280. CUNNINGHAM, D. S. e KUHN, R. Lymphoblast transformation as a measure of immune competence during experimental Chagas' disease. *J. Parasitol.*, 66, 390, 1980.
281. KRASSNER, S. M., GRANGER, B., MORROW, C. e GRANGER, G. *In vitro* release of lymphotoxin by spleen cells from C3H/HEJ and C57BL/6 mice infected with *T. cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31, 1080, 1982.
282. RIBEIRO DOS SANTOS, R. e HUDSON, L. *Trypanosoma cruzi*: binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. *Parasit. Immunol.*, 2, 1, 1980.
283. RIBEIRO DOS SANTOS, R. e HUDSON, L. *Trypanosoma cruzi*: Immunological consequences of parasite modification of host cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 40, 36, 1980.
284. TEIXEIRA, A. R. L. Imunopatologia da doença de Chagas. *Anais do Simpósio sobre Moléstia de Chagas*. Publicação ACIESP nº 16, São Paulo, Brasil, 1979, p. 56.
285. COSSIO, P. M., DAMILANO, G., VEGA, M. T., LAGUENS, R. P., MECKERT, P. C., DIEZ, C. e ARANA, R. M. *In vitro* interaction between lymphocytes of chagasic individuals and heart tissue. *Medicina*, Buenos Aires, 36, 287, 1976.
286. KUHN, R. E. e MURNANE, J. E. *Trypanosoma cruzi*: Immune destruction of parasitized mouse fibroblasts *in vitro*. *Exp. Parasitol.*, 41, 66, 1977.
287. TEIXEIRA, A. R. L., TEIXEIRA, G., MACEDO, V. e PRATA A. *Trypanosoma cruzi*-sensitized T-lymphocyte-mediated ^{51}Cr release from human heart cells in Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27, 1097, 1978.
288. LAGUENS, R. P., MECKERT, P. C., BASOMBRIO, M. A., CHAMBO, G. J., COSSIO, P. M., ARANA, R. M. e GELPI, R. Infección crónica del ratón con *Trypanosoma cruzi*. Modelo experimental de enfermedad de Chagas. *Medicina*, Buenos Aires, 40, 33, 1980.

289. DVORAK, J. A. e PYKE, T. P. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with vertebrate cells *in vitro*. I. individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Exp. Parasitol.*, 34, 268, 1973.
290. MAYER, M. e ROCHA LIMA, H. Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in warm butern und arthropoden. *Arch. Schiffs-Tropenhyg.*, 18, 101, 1914.
291. TALIAFERRO, W. H. e PIZZI, T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.*, 96, 199, 1955.
292. CAVALCANTE NETO, F. F. Infecção experimental de coelhos com *Trypanosoma cruzi*: aspectos de parasitologia, imunologia e patologia. Tese, Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil, 1984. 119 p.
293. MELO, R. C. e BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.*, 64, 475, 1978.
294. ANDRADE, S. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano, Tese. Universidade da Bahia, Brasil, 1973. 123 p.
295. HANSON, W. L. e ROBERSON, E. Density of parasites in various organs and the relation to numbers of trypomastigotes in the blood during acute infections of *Trypanosoma cruzi* in mice. *J. Protozool.*, 21, 512, 1974.
296. KIPNIS, T. L., MINOPRIO, P. M., LUQUETTI, A. O., RASSI, A. e DIAS DA SILVA, W. Estudo imunobiológico de estoques de *Trypanosoma cruzi* isolados de pacientes na fase aguda da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 16, 172, 1983.
297. TEIXEIRA, M. L. e DVORAK, J. A. *Trypanosoma cruzi*: Histochemical characterization of parasitized skeletal muscle fibers. *J. Protozool.*, 32, 339, 1985.
298. ALCÂNTARA, A. e BRENER, A. e BRENER, Z. The *in vitro* interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. *Acta Tropica*, 35, 209, 1978.
299. DVORAK, J. A. e ROWE, C. L. The attraction of *Trypanosoma cruzi* to vertebrate cells *in vitro*. *J. Protozool.*, 23, 534, 1976.
300. CRANE, M. St. J. e DVORAK, J. A. Influence of monosaccharides on the infection of vertebrate-cells by *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 5, 333, 1982.
301. SCOTT, M. T. e MOYES, L. ⁷⁵Se-methionine labelled *Trypanosoma cruzi* blood trypomastigotes: opsonization by chronic infection serum facilitates killing in spleen and liver. *Clin. Exp. Immunol.*, 48, 754, 1982.
302. REED, S. G., DOUGLASS, T. G. e SPEER, C. A. Surface interactions between macrophages and *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31, 723, 1982.

303. VILLALTA, F., ODA, L. M., ANGLUSTER, J., ALVIANO, C. S. e LEON, W. Phagocytosis of the three developmental forms of *Trypanosoma cruzi*: effect of specific sera. *Acta Tropica*, 38, 375, 1980.
304. BURGER, E., LAY, W. H., HYPOLITO, L. V. R. e FERNANDES, J. F. *Trypanosoma cruzi*: the fate of bloodstream trypomastigote, amastigote, metacyclic trypomastigote and epimastigote forms in the peritoneal macrophages of immune and non-immune mice *in vivo*. *Acta Tropica*, 39, 111, 1982.
305. HOFF, R. 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. Exp. Med.*, 142, 299, 1975.
306. BERTELLI, M. S., ALCÂNTARA, A. e BRENER, Z. BCG-induced resistance in *Trypanosoma cruzi* experimental infections. *Tropenmed. Parasit.*, 32, 93, 1981.
307. KIPNIS, T. L., CALICH, V. L. G. e DIAS DA SILVA, W. Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. *Parasitology*, 78, 89, 1979.
308. MILDER, R. V., KLOETZEL, J. e DEANE, M. P. Observations on the interaction of peritoneal macrophages with *Trypanosoma cruzi*. II. Intracellular fate of bloodstream forms. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 19, 313, 1977.
309. KRESS, Y., TANOWITZ, H. BLOOM, B. e WITTNER, M. *Trypanosoma cruzi*: Infection of normal and activated mouse macrophages. *Exp. Parasitol.*, 41, 385, 1977.
310. NOGUEIRA, N., GORDON, S. e COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: The immunological induction of macrophage plasminogen activator requires thymus-derived lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 146, 173, 1977.
311. NOGUEIRA, N., GORDON, S. e COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: modification of macrophage function during infection. *J. Exp. Med.*, 146, 157, 1977.
312. NOGUEIRA, N. e COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: *in vitro* induction of macrophage microbicidal activity. *J. Exp. Med.*, 148, 288, 1978.
313. NATHAN, C., NOGUEIRA, N., JUANGHANICH, C., ELLIS J. e COHN, Z. Activation of macrophages *in vivo* and *in vitro*. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.*, 149, 1056, 1979.
314. TANAKA, Y., TANOWITZ, H. e BLOOM, B. R. Growth of *Trypanosoma cruzi* in a cloned macrophage cell line in a variant defective in oxygen metabolism. *Infec. Immunity*, 41, 1322, 1983.
315. ALVES, M. J. M. e RABINOVITCH, M. Destruction of intracellular *Trypanosoma cruzi* after treatment of infected macrophages with cationic electron carriers. *Infec. Immunity*, 39, 435, 1983.

316. NOGUEIRA, N. e COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: Mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.* 143, 1402, 1976.
317. ALCÂNTARA, A. e BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: Role of macrophage membrane components in the phagocytosis of bloodstream forms. *Exp. Parasitol.*, 50, 1, 1980.
318. LIMA, M. F. e KIERSZENBAUM, F. Biochemical requirements for intracellular invasion by *Trypanosoma cruzi*: protein synthesis. *J. Protozool.*, 29, 566, 1982.
319. HENRIQUEZ, D., PIRAS R. e PIRAS, M. M. The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2, 359, 1981.
320. PIRAS, R., PIRAS, M. M. e HENRIQUEZ, D. The effect of macromolecular biosynthesis on the *in vitro* infectivity and morphology of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 83, 1982.
321. ZINGALES, B., ANDREWS, N. W., KUWAJIMA, V. Y. e COLLI, W. Cell surface antigens of *T. cruzi*: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 6, 111, 1982.
322. TEIXEIRA, A. R. L. Intradermoreação: um novo método de avaliação da doença de Chagas. *Relatório nº 3*, Central de Medicamentos, CEME, Brasil, 1980, 54 p.
323. REED, S. G., LARSON, C. L. e SPEER, C. A. Contact sensitivity responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infec. Immunity*, 20, 393, 1978.
324. CUNNINGHAM, D. S. e KUHN, R. E. *Trypanosoma cruzi* induced suppression of the primary immune response in murine cell cultures to T-cell dependent and independent antigens. *J. Parasitol.*, 66, 16, 1980.
325. CUNNINGHAM, D. S., KUHN, R. E. e HATCHER, F. M. *Trypanosoma cruzi*: Response by cells from infected mice to alloantigens. *Exp. Parasitol.*, 51, 141, 1981.
326. KIERSZENBAUM, F. Immunologic deficiency during experimental Chagas' disease: Role of adherent, monospecific esterase-positive splenic cells. *J. Immunol.*, 129, 2202, 1982.
327. BEHHEHANI, K., PAN, S. C. e UNANUE, E. R. Marked increase in I^a - Bearing macrophages during *Trypanosoma cruzi* infection *Clin. Immunol. Immunopath.*, 19, 190, 1981.
328. CUNNINGHAM, D. S. e KUHN, R. E. *Trypanosoma cruzi*-induced suppressor substance. I. Cellular involvement and partial characterization. *J. Immunol.*, 124, 2122, 1980.

329. CUNNINGHAM, D. S. e KUHN, R. E. *Trypanosoma cruzi*-induced suppressor substance. II. Regulatory activity. *Immunogenetics*, 10, 557, 1980.
330. CUNNINGHAM, D. S. e KUHN, R. E. *Trypanosoma cruzi*-induced suppressor substance. III. Activation of suppressor cells. *J. Parasitol.*, 66, 881, 1980.
331. TARLETON R. L., SCHAFFER, R. e KUHN, R. E. Effects of extracts of *Trypanosoma cruzi* on immune response: Induction of a non-specific suppressor factor. *Infec. Immunity.*, 41, 978, 1983.
332. CUNNINGHAM, D. S., BENAVIDES, G. e KUHN, R. E. Differences in the regulation of humoral responses between mice infected with *Trypanosoma cruzi* and mice administered *T. cruzi*-induced suppressor substance. *J. Immunol.*, 125, 2317, 1980.
333. MALECKAR, J. R. e KIERSZENBAUM, F. Inhibition of mitogen-induced proliferation of mouse T and B lymphocytes by bloodstream forms of *T. cruzi*. *J. Immunol.*, 130, 908, 1983.
334. CORSINI, A. C., COSTA, M. G., OLIVEIRA, O. L. P., CAMARGO, J. J. B. e RANGEL, H. A. A fraction (FAD) from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes depresses the immune response in mice. *Immunology*, 40, 505, 1980.
335. CORSINI, A. C., OLIVEIRA, O. L. P. e COSTA, M. G. Humoral suppression in *Trypanosoma cruzi* infection in relation to the timing of antigen presentation. *Z. Parasitenkd.*, 64, 85, 1980.
336. REED, S. G., ROTERS, S. B. e GOIDL, E. Spleen cell-mediated suppression of IgG production to a non-parasite antigen during chronic *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.*, 131, 1978, 1983.
337. SCOTT, M. T. Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* in mice: specific suppressor cells in chronic infection. *Immunology*, 44, 1981.
338. KIERSZENBAUM, F. e HAYES, M. M. Evaluation of lymphocyte responsiveness to polyclonal activators during acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29, 708, 1980.
339. ALMEIDA, H. O., CUNHA, J. G., CHAPADEIRO, E. e LOPES, E. R. Parasitismo do esôfago e coração de chagásico crônico portador de doença de Hodgkin em uso de imunodepressores. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 6, 367, 1972.
340. CERISOLA, J. A., ROHWEDDER, R., SEGURA, E. L., DEL PRADO, C. E., ALVAREZ, M. e DE MARTINI, G. J. W. *El xenodiagnóstico*. Ministerio del Bienestar Social, Buenos Aires, Argentina 1974.
341. PIFANO, F. C. El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase crónica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. *Arch. Venez. Pat. Trop.*, 2, 89, 1954.

342. HOFF, R., MOTT, K. E., SILVA, J. E., MENEZES, V., HOFF, J. N., BARRET, T. V. e SHERLOCK, I. Prevalence of parasitemia and seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural population of Northeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28, 461, 1979.
343. CASTRO, C. N. Influência da parasitemia no quadro clínico da Doença de Chagas. Tese, Universidade de Brasília, 1978. 95 p.
344. CAMARGO, M. E. e TAKEDA, G. K. F. Diagnóstico de laboratório. In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Z. Andrade e Z. Brener, Eds., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1979, p. 175.
345. TEIXEIRA, A. R. L., FIGUEIREDO, F., REZENDE FILHO, J. e MACEDO, V. Chagas' disease: a clinical, parasitological, immunological and pathological study in rabbits. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27, 1097, 1978.
346. TEIXEIRA, A. R. L., JUNQUEIRA, L. F., SOLORZANO, E. e ZAPPALÁ, M. Doença de chagas experimental em coelhos isogênicos III/J. I. Fisiopatologia das arritmias e da morte súbita do chagásico. *Rev. Ass. Med. Bras.*, 29, 77, 1983.
347. ABRAHAMSOHN, I. A., BLOTTA, M. H. S. L. e CUROTTO, M. A. Specific cutaneous hypersensitivity responses in mice infected or immunized with *Trypanosoma cruzi*. *Parasit. Immunol.*, 5, 237, 1983.
348. ASKENASE, P. W., METZLER, C. M. e GERSHON, R. K. Localization of leucocytes in sites of delayed-type hypersensitivity and in lymph nodes: dependence on vasoactive amines. *Immunology*, 47, 239, 1982.
349. ASKENASE, P. W. e LOVEREN, H. V. Delayed-type hypersensitivity: activation of mast cells by antigen – specific T-cell factors initiates the cascade of cellular interactions. *Immunol. Today*, 4, 259, 1983.
350. SEAH, S. K. K., MARSDEN, P. D., VOLLER, A. e PETTIT, L. E. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in Rhesus monkeys: the acute phase. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68, 63, 1974.
351. ZELEDON, R. e PONCE, C. A. Skin test for the diagnosis of Chagas' disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68, 114, 1974.
352. TAFURI, W. L., MARIA, T. A. e LOPES, E. R. Lesões do plexo mioentérico do esôfago, do jejuno e do cólon de chagásicos crônicos. Estudo ao microscópio eletrônico. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 13, 76, 1971.
353. LIMA PEREIRA, F. E. Estudo quantitativo dos mastócitos na musculatura do esôfago de chagásicos crônicos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 14, 30, 1972.
354. ALMEIDA, H. O., PEREIRA LIMA, F. E. e TAFURI, W. L. Estudo quantitativo dos mastócitos na cardiopatia chagásica crônica. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 17, 5, 1975.
355. MARSDEN, P. D. e HAGSTROM, J. W. C. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in beagle puppies. The effect of variations in the

- dose and source of infecting trypanosomes and the route of inoculation on the course of the infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 62, 816, 1968.
356. BRENER, Z. Recent developments in the field of Chagas' disease. *Bull. World. Health Organiz.*, 60, 471, 1982.
357. FEDERICI, E. E., ABELMANN, W. H. e NEVA, F. A. Chronic and progressive myocarditis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 13, 272, 1964.
358. WOOD, J. N., HUDSON, L., JESSELL, T. M. e IAMAMOTO, M. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature*, 296, 34, 1980.
359. LEVY, R. B. e SHEARER, G. M. Can cytotoxic T. Cells recognize self determinants on molecules lacking polymorphic MHC self determinants? *Immunol. Today*, 3, 204, 1982.
360. MUNIZ, J. e FREITAS, G. Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 41, 303, 1944.
361. HATCHER, F. M. e KUHN, R. E. Spontaneous lytic activity against allogeneic tumor cells and depression of specific cytotoxic responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, 126, 2436, 1981.
362. CUNNINGHAM, D. S., HAZEN, T. C. e KUHN, R. E. Increased resistance to *Aeromonas hydrophila* in mice experimentally infected with *T. cruzi*. *J. Parasitol.*, 67, 468, 1981.
363. KOZMA, C., JAFFE, R. e JAFFE, W. F. Estudo experimental sobre a -patogenia das miocardites. *Arq. Bras. Cardiol.*, 13, 155, 1960.
364. COSSIO, P. M., LAGUENS, R. P., DIEZ, C., SZARFMAN, A., SEGAL, A. e ARANA, R. M. Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation*, 50, 1252, 1974.
365. KHOURY, E. L., RITACCO, V., COSSIO, P. M., LAGUENS, R. P., SZARFMAN, A., DIEZ, C. e ARANA, R. M. Circulating antibodies to peripheral nerve in American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. Exp. Immunol.*, 36, 8, 1979.
366. SZARFMAN, A., TERRANOVA, V. P., BERNARD, S. I., FOIDART, J. M., LIMA, M. F., SCHEINMAN, J. I. e MARTIN, G. R. Antibodies to laminin in Chagas' disease. *J. Exp. Med.*, 155, 1161, 1982.
367. COSSERMELLI, W., FRIEDMAN, H., PASTOR, H., NOBE, M. R., MANZIONE, A., CAMARGO, M. E. e SHIROMA, M. Polymyositis in Chagas' Disease. *Annals Rheum. Dis.*, 37, 277, 1978.
368. WILKIN, P. G., WOODHAMS, P. L. e RIBEIRO DOS SANTOS, R. Rat cereberelar cells in tissue culture. I. An immunological marker for brain vascular endothelial cell (antibodies from the sera of patients with Chagas' disease). *Dev. Neurosci.*, 4, 296, 1981.

369. SZARFMAN, A., COSSIO, P. M., DIEZ C. ARANA, R. M. e SADUN, E. Antibodies against endocardium, vascular structures, and interstitium of striated muscle that cross react with *T. cruzi* and *T. rhodesiense*. *J. Parasitol.*, 60, 1024, 1974.
370. CHESS, Q., ACOSTA, A. M., SETHI, J. K. e SANTOS-BUCH, C. A. Reversible acquisition of a host cell surface membrane antigen by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immunity.*, 40, 293, 1983.
371. COSSIO, P. M., LAGUENS, R. P., KREUTZER, R., DIEZ, C. e ARANA, R. M. Chagas cardiopathy: Immunopathologic and morphologic studies in myocardial biopsies. *Am. J. Path.*, 86, 533, 1977.
- 371a. TOLEDO BARROS, M. A. M., AMATO NETO, V., MENDES, E. e MOTA, I. *In vitro* cellular immunity in Chagas' disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 38, 376, 1979.
372. LAGUENS, R. P., MECKERT, P. C., CHAMBO, G. e GELPI, R. J. Chronic Chagas disease in the mouse. II. Transfer of the heart disease by means of immunocompetent cells. *Medicina*, Buenos Aires, 41, 40, 1981.
373. TEIXEIRA, M. L., REZENDE FILHO, J., FIGUEIREDO, F. e TEIXEIRA, A. R. L. Chagas' disease: selective affinity and cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi*-immune lymphocytes to parasymphathetic ganglion cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 75, 33, 1980.
374. CABRAL, H. R. A. Rheumatoid factors and Chagas' disease. *Science*, 219, 1238, 1982.
375. CENGET, D. D. e ROJAS, R. La biopsia de músculo deltoides en la enfermedad de Chagas. *Rev. Fac. Med. Tucuman*, 2, 27, 1959.
376. PRATA, A. e PORTO, G. Biópsia de músculo na doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 8, 193, 1966.
377. BOYER, M. H., HOFF, R., KIPNIS, T. L., MURPHY, E. D. e ROTH, J. B. *Trypanosoma cruzi*: susceptibility in mice carrying mutant gene *lpr* (lymphoproliferation). *Parasit. Immunol.*, 5, 135, 1983.
- 377a. NICKELL, S. P., HOFF, R. e BOYER, M. H. Susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in auto-immune strains of mice. *Parasit. Immunol.*, 7, 377-386, 1985.
378. HAUSCHKA, T. S., GOODWIN, M. B., PALMQUIST, J. e BROWN, E. Immunological relationship between seven strains of *T. cruzi* and its application in the diagnosis of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30, 1, 1950.
379. PIZZI, T. e PRAGER, R. Inmunidad a la sobreinfección inducida mediante cultivos de *Trypanosoma cruzi* de virulencia atenuada. *Bol. Chil. Parasitol.*, 7, 20, 1952.

380. NUSSENZWEIG, V., KLOETZEL, J. e DEANE, L. M. Acquired immunity in mice infected with strains of immunological types A and B of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.*, 14, 233, 1963.
381. MENEZES, H. Protective effect of an avirulent (cultivated) strain of *Trypanosoma cruzi* against experimental infection in mice. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 10, 1, 1968.
382. MENEZES, H. Active immunization of dogs with a non-virulent strain of *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 11, 258, 1969.
383. HUNGERER, K. D. e ENDERS, B. Vaccination against Chagas' disease. Mimeographed paper, 1972.
384. MENEZES, H. The un-infectivity of the PF cultivated strain of *T. cruzi* to mice. An evolution through a one year period by blood cultures and histopathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 12, 1, 1975.
385. BRENER, Z. Alguns aspectos da imunidade adquirida em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 9, 223, 1967.
386. BASOMBRIO, M. A. e BESUSCHIO, S. *Trypanosoma cruzi* culture used as vaccine to prevent chronic Chagas' disease in mice. *Infec. Immunity.*, 36, 351, 1982.
387. BASOMBRIO, M. A., BESUSCHIO, S. e COSSIO, P. M. Side effects of immunization with live attenuated *Trypanosoma cruzi* in mice and rabbits. *Infec. Immunity.*, 36, 342, 1982.
388. KLOETZEL, J. K. e LAFAILLE, J. J. Strain specific protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.*, 69, 267, 1983.
389. COLLIER, W. A. Über immunität bei der Chagas krankheit der weissen maus. *Z. Hyg. Infektionskr.*, 112, 88, 1931.
390. FERNANDES, J. F., CASTELANI, O. e OKUMURA, M. Histopathology of the heart and muscles in mice immunized against *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 8, 151, 1966.
391. SALATA, E., WIENDL, F. M. e CORREA, F. M. A. Efeitos de raios gama sobre *Trypanosoma cruzi*. II. Anticorpos em camundongos inoculados com formas de cultura. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 18, 211, 1976.
392. HANSON, W. L., CHAPMAN JR., W. L. e WAITS, V. B. Immunization of mice with irradiated *Trypanosoma cruzi* grown in cell culture: relation of numbers of parasites, immunizing injections, and route of immunization to resistance. *Intern. J. Parasitol.*, 6, 341, 1976.
393. TOMLINSON, M. J., CHAPMAN JR., W. L., HANSON, W. L. e GOVEN, A. J. The effect of irradiated *Trypanosoma cruzi* on the pathogenesis of Chagas' disease in dogs. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 22, 219, 1980.
394. TARLETON, R. L., KUHN, R. E. e CUNNINGHAM, D. S. Mitomycin C-treated *Trypanosoma cruzi* in vaccination of mice:

- induction of immunosuppression but not protection. *Infect. Immunity.*, 31, 693, 1981.
395. ENDERS, B., WEINMAM, E., NAGLE, C. A., HEIN, B. e ZWISLER, O. Experimental Chagas' disease in primates *Macaca fascicularis* and *Cebus apella* with special reference to preclinical trials and the evaluation of a living non-replicating *T. cruzi* vaccine. *Behring Inst. Mitt.*, 71, 132, 1982.
396. OKANLA, E. D., STUMPF, J. L. e DUSANIC, D. G. Resistance of mice immunized with irradiated and lyophilized stages of *Trypanosoma cruzi* to infections with metacycles. *Intern. J. Parasitol.*, 12, 251, 1982.
397. TEIXEIRA, A. R. L., Perspectivas de vacinação contra doença de Chagas. In *Progresso na Imunologia das Parasitoses*. C. E. Tosta, Ed., Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, 1977, p. 106.
398. BRUMPT, E. Immunité partielle dans les infections a *Trypanosoma cruzi*, transmission de ce trypanosome par *Cimex rotundus*. Rôle regulateur des hôtes intermédiaires. Passage à travers la peau. *Bull. Soc. Path., Exot.*, 6, 172, 1913.
399. GOBLE, F. C. Observations on cross-immunity in experimental Chagas' disease in dogs. *Ann. Congr. Intern. Doença de Chagas*, Rio de Janeiro, 1959, 2, 613, 1961.
400. NORMAN, L. e KAGAN, I. G. Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi*. II. Acquired immunity in mice infected with avirulent american strains of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.*, 107, 168, 1960.
401. MARR, J. S. e PIKE, E. H. The protection of mice by "Corpus Christi" strain of *Trypanosoma cruzi* when challenged with Brazil strain. *J. Parasitol.*, 53, 657, 1967.
402. SEAH, S. e MARSDEN, P. D. The protection of mice against a virulent strain of *Trypanosoma cruzi* by previous inoculation with an avirulent strain. *Am. Trop. Med. Parasitol.*, 63, 211, 1969.
403. ANDRADE, S. G., CARVALHO, M. L., FIGUEIRA, R. M. e ANDRADE, Z. A. Recuperação e caracterização de tripanossomos inoculados em animais imunes (reinoculação com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 12, 395, 1970.
404. LAURIA, L. P. Avaliação de uma vacina contra o *Trypanosoma cruzi* em cães. Tese, Universidade de Brasília, 1978.
405. KIPNIS, T. L., MINÓPRIO, P. M., LUQUETTI, A. O., RASSI, A. e DIAS DA SILVA, W. Estudo imunobiológico de estoques de *Trypanosoma cruzi* isolados de pacientes na fase aguda da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 16, 175, 1983.
406. MUNIZ, J. e FREITAS, G. Estudos sobre a imunidade humoral na doença de Chagas. *Brasil Med.*, 60, 337, 1946.

407. REGO, S. F. M. Estudo das lesões provocadas pelo *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, no baço e no fígado de camundongo branco (*mus musculus*) com diversos graus de resistência. *J. Bras. Med.*, 1, 599, 1959.
408. KAGAN, I. G. e NORMAN, L. Immunologic studies of *Trypanosoma cruzi*. III. Duration of acquired immunity in mice initially infected with a North American strain of *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.*, 108, 213, 1961.
409. JOHNSON, K. D., NEAL, R. A. e GALL, D. Protective effect of killed trypanosome vaccines with incorporated adjuvants. *Nature*, 200, 83, 1963.
410. GOBLE, F. C., BOYD, J. L., GRIM, W. M. e KONRATH, M. Vaccination against experimental Chagas' disease with homogenates of culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.*, 50 (suppl) 19, 1964.
411. MENEZES, H. The use of adjuvants in the vaccination of mice with lyophilized *Trypanosoma cruzi*. *O Hospital*, 68, 1341, 1965.
412. GONZALEZ-CAPPA, S. M., SCHMUÑIS, G. A., CANTARELLA, A. I. e SCHMUÑIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*: Protection of mice with epimastigote antigens from immunologically different parasite strains. *Exp. Parasitol.*, 35, 179, 1974.
413. KIERSZENBAUM, F. e BUDZKO, D. B. Immunization against experimental Chagas' disease by using culture forms of *Trypanosoma cruzi* killed with a solute of sodium perchlorate. *Infect. Immunity.*, 12, 461, 1975.
414. MCHARDY, N. e ELPHICK, J. P. Immunization of mice against infection with *Trypanosoma cruzi*. Cross-immunization between five strains of the parasite using freeze-thawed vaccines containing epimastigotes of up to five strains. *Intern. J. Parasitol.*, 8, 25, 1978.
415. GRYNBERG, N. F. Estudos sobre o poder imunogênico de ribossomos e de ácido ribonucléico de *Crithidia fasciculata* e de *Trypanosoma cruzi*. Tese, Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1976. 87 p.
416. SCOTT, M. T. e SNARY, D. Protective immunization of mice using cell surface glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. *Nature*, 282, 73, 1979.
417. LEON, L. L., LEON, W., CHAVES, L., COSTA, S. C. G., QUEIROZ CRUZ, M., BRASCHER, H. M. e OLIVEIRA LIMA, A., Immunization of mice with *Trypanosoma cruzi* polyribosomes. *Infect. Immunity*, 27, 38, 1980.
418. DE LUCCA, F. L., BERTOLINI, M. C. e ZINI, M. N. *In vitro* transfer of reactivity to *Trypanosoma cruzi* antigens from rat cells to human cells with immune RNA. *J. Infect. Dis.*, 145, 148, 1982.
419. HUNGERER, K. D., ENDERS, B. e ZWISLER, O. On the immunology of infection with *Trypanosoma cruzi*. II. The preparation of an apathogenic living vaccine. *Behring Inst. Mitt.*, 60, 84, 1976.

420. BRENER, Z. e CAMARGO, E. P. Perspectives of vaccination in Chagas' disease. In *Perspectives of Immunization in parasitic Disease*. Pontificia Academia Scientificarum, Vaticano, 1981.
421. MINTER, D. M. Feeding patterns of some triatomine vectors. In: *American Trypanosomiasis Research*, Pan-American Health Organization Scientific Publication, 318, 33.
422. SOUZA, M. C. M., REIS, A. P., DA SILVA, W. D. e BRENER, Z. Mechanism of acquired immunity induced by *Leptomonas pessoai* against *Trypanosoma cruzi* in mice. *J. Protozool.*, 21, 579, 1974.
423. PEREIRA, N. M., SOUZA, W., MACHADO, R. D. e CASTRO, F. T. Isolation and properties of flagella of Trypanosomatids. *J. Protozool.*, 24, 511, 1977.
424. LOPES, E. R., TAFURI, W. L., CHAPADEIRO, E., PIRES, L. L., MACEDO, V., PRATA, A. e TANUS, R. Doença de Chagas em cães. Estudo anátomo-patológico de animais infectados. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 22, 135, 1980.
425. BRENER, Z. Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western Hemisphere. *Pharmac. Ther.*, 7, 71, 1979.
426. CANÇADO, J. R., SALGADO, A. A., BATISTA, S. M. e CHIARI, C. Segundo ensaio terapêutico com o nifurtimox na doença de Chagas. *Rev. Goiana Med.*, 22, 203, 1976.
427. CERISOLA, J. A., ALVAREZ, M. e DE RISSIO, A. M. Imunodiagnóstico da doença de Chagas. Evolução sorológica de pacientes com doenças de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 12, 403, 1970.
428. COURA, J. R. Aspectos clínicos da padronização dos efeitos terapêuticos da Doença de Chagas. *Ann. Congr. Intern. Doença Chagas*, Rio de Janeiro, 1979, p. 8.
429. SCHENONE, H., CONCHA, L., ARAUDA, R., ROJAS, A., ALFARO, E., KNIERIM, F. e ROJO, M. Valor do xenodiagnóstico na avaliação do tratamento da infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Goiana Med.*, 16, 179, 1970.
430. FERREIRA, H. O. Ensaio terapêutico com o benzonidazol na doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 18, 357, 1976.
431. CANÇADO, J. R. Specific treatment of human Chagas' disease. *Ann. Congr. Intern. Doença Chagas*, Rio de Janeiro, 1979, p. 2.
432. LELCHUCK, R., CARDONI, R. L. e FUKS, A. S. Cell-mediated immunity in Chagas' disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 30, 34, 1977.
433. LELCHUCK, R., CARDONI, R. L. e LEVIS, S. Nifurtimox-induced alterations in the cell-mediated immune response to PPD in guinea-pigs. *Clin. Exp. Immunol.*, 30, 469, 1977.
434. TEIXEIRA, A. R. L., JABUR, E., CORDOBA, J. C., SOUTO MAIOR, I. C. e SOLÓRZANO, E. Alterações da resposta imune

- mediada por células durante o tratamento com benzonidazol. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 16, 11, 1983.
435. DOCAMPO, R., MORENO, S. J. N., STOPPANI, A., LEON, W. C., VILLATA, F. e MUNIZ, R. F. A. Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Pharmacol.*, 30, 1947, 1981.
436. DOCAMPO, R., MASON, R. P., MOTTLEY, C. e MUNIZ, R. F. A. Generation of free radicals induced by nifurtimox in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, 256, 930, 1981.
437. DUBIN, M., MORENO, S. N. J., MARTINO, E. E., DOCAMPO, R. e STOPPANI, A. Increased biliary secretion and loss of hepatic glutathione in rat liver after nifurtimox treatment. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 483, 1983.
438. STEIN, R. J., YOST, D. e PETROLIUNAS, F. Carcinogenic activity of nitrofurans. A histologic evaluation. *Fed. Proceed.*, 25, 291, 1966.
439. MORRIS, J. E., PRICE, J. M., LALICH, J. J. e STEIN, R. J. The carcinogenic activity of some 5-nitrofurans derivatives in the rat. *Cancer Research*, 29, 2145, 1969.
440. COHEN, S. M., ERTÜRK, E., CRONETTI, A. J. e BRYGAN, G. T. Carcinogenicity of 5-nitrofurans, 5-nitroimidazoles, 4-nitrobenzenes and related compounds. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 51, 403, 1973.
441. MACCALLA, D. R. e VOUTSINO, D. On the mutagenicity of nitrofurans. *Mutation Research*, 26, 3, 1974.
442. BOYD, M. R., STIKO, A. W. e SASAME, H. A. Metabolic activity of nitrofurantoin. Possible implication for carcinogenesis. *Biochem. Pharmacol.*, 28, 601, 1979.
443. HEADLEY, D. B., KLOPP, R. G., MICHIE, P. M., ERTÜRK, E. e BRYAN, G. T. Temporal comparison of immune status and target organ histology in mice fed carcinogenic 5-nitrofurans and their nor-nitro analogs. *Cancer Research*, 41, 1397, 1981.
444. TEIXEIRA, A. R. L., JABUR, E., CORDOBA, J. C., SOUTO MAIOR, I. C. e SOLÓRZANO, E. Cancerigênese em coelhos chágasicos tratados com benzonidazol. (Abstract) XIX Congr. Soc. Bras. Med. Trop., Rio de Janeiro, 1983, p. 8.
445. DVORAK, J. A. e LOWE, C. L. The effects of Lampit (Bayer 2502) on the interaction of *Trypanosoma cruzi* with vertebrate cells *in vitro*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26, 58, 1977.
446. BACCHI, C. J., LIPSCHICK, G., VERGARA, C. e NATHAN, H. C. Polyamines in Trypanosomatids. *J. Bacteriol.*, 131, 657, 1977.
447. KRASSNER, S. M. e MORROW, C. Polyamine levels in *Leishmania donovani* during transformation from amastigote to promastigote stages. 5th. Intern. Congr. Protozool., Nova Iorque, 1979, p. 209.

448. BACCHI, C. J., NATHAN, H. C. e HUTNER, S. H. Polyamine metabolism: A potential therapeutic target in trypanosomes. *Science*, 210, 332, 1980.
449. CLARKSON, A. B., BACCHI, C. J., MELLOW, G., NATHAN, H. C., MCCANN, P. P. e SJOERSDMA, A. Efficacy of combinations of difluoromethylornithine and bleomycin in a mouse model of central nervous system African Trypanosomiasis. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 80, 5729, 1983.
450. WALTER, R. D. e EBERT, F. Effect of polyamines on protein kinase activities from *Trypanosoma cruzi*. *Tropenmed. Parasit.*, 30, 9, 1979.
451. MCCANN, P. P., BACCHI, C. J., HANSON, W. L., NATHAN, H. C., HUTNER, S. H. e SJOERSDMA, A. Methods for the study of the treatment of protozoan diseases by inhibitors of ornithine decarboxylase. *Methods Enzymol.*, 94, 209, 1983.
452. MONTAMAT, E. E., BURGOS, C., GEREZ DE BURGOS, N. M., ROVAI, L. E., BLANCO, A. e SEGURA, E. L. Inhibitory action of gossipol on enzymes and growth of *Trypanosoma cruzi*. *Science*, 218, 288, 1982.
453. BLANCO, A., AOKI, A., MONTAMAT, E. E. e ROVAI, E. Effect of gossipol upon motility and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.*, 30, 648, 1983.
454. GEREZ DE BURGOS, N. M., BURGOS, C., MONTAMAT, E. E., ROVAI, L. E. e BLANCO, A. Inhibition by gossipol of oxireductases from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Pharmacol.*, 30, 1, 1983.
455. LEE, C. e MALLING, H. V. Selective inhibition of sperm specific lactate dehydrogenase X by an antifertility agent: gossipol. *Fed. Proceed.*, 40, 718, 1981.
456. BLANCO, A., BURGOS, C., GEREZ DE BURGOS, N. M. e MONTAMAT, E. E. Properties of the testicular lactate dehydrogenase isoenzyme. *J. Biol. Chem.*, 153, 165, 1976.
457. NATIONAL COORDINATING GROUP ON MALE FERTILITY. A new male contraceptive drug - cotton phenol (gossipol). *Chin. Med. J. (Engl. Ed.)*, 4, 417, 1978.
458. GHOSE, T. e BLAIR, A. H. Antibody-linked cytotoxic agents in the treatment of cancer: current status and future prospects. *J. Natl. Cancer Inst.*, 61, 657, 1978.
459. YOULE, R. J. e NEVILLE JR., D. M. Receptor mediated transport of the hybrid protein ricin-diphtheria toxin fragment A with subsequent ADP-ribosylation of intracellular elongation factor II. *J. Biol. Chem.*, 254, 11089, 1979.
460. VITETTA, E. S., CUSHLEY, W. e UHR, J. W. Synergy of ricin A chain-containing immunotoxins and ricin B chain-containing immunotoxins *in vitro* killing of neoplastic human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 80, 6332, 1983.

461. D'ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) Rangeli* Tejera, 1920. In *Biology of the Kinetoplastida*. W. H. R. Lumsden e D. A. Evans, Eds., Academic Press, Londres, 1976, p. 327.
462. MILES, M. A., ARIAS, J. R., VALENTE, S. A. S., NAIFF, R. D., SOUZA, A. A., POVOA, M. M., LIMA, J. A. N. e CEDILLOS, R. A. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli*, in the amazon basin of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32, 1251, 1983.
463. D'ALESSANDRO, A. e MANDEL, S. Natural infections and behaviour of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in the vector *Rhodnius prolixus* in Colombia. *J. Parasitol.*, 55, 846, 1969.
464. D'ALESSANDRO, A. e DELPRADO, C. E. Search for *Trypanosoma rangeli* in endemic areas of *Trypanosoma cruzi* in Argentina and Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26, 623, 1977.
465. BARRET, T. V. e SILVA DE OLIVEIRA, T. A trypanosome, indistinguishable from *Trypanosoma rangeli*, in the haemolymph of *Rhodnius domesticus* from Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71, 5, 1977.
466. AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VI. Developmental pattern in the haemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 78, 413, 1983.
467. COUTINHO, J. O. e NUSSENZWEIG, V. Infecção experimental de Triatomíneos pelo *Trypanosoma rangeli*, Tejera. 1920. *Fol. Clin. Biol.*, São Paulo, 18, 181, 1952.
468. HERBIG-SANDREUTER, A. Experimentelle untersuchungen uber den cycclus von *Trypanosoma rangeli*, Tejera 1920 in warmbluter und in *Rhodnius prolixus*. *Acta Tropica*, 12, 261, 1955.
469. GREWAL, M. S. Studies on *Trypanosoma rangeli*, a South American human trypanosome. *Res. Bull. Panjab Univ.*, 20, 449, 1970.
470. AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli*, Tejera 1920. IV. A re-consideration of its systematic position. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 77, 405, 1982.
471. TOBIE, E. J. Experimental transmission and biological comparison of strains of *Trypanosoma rangeli*. *Exp. Parasitol.*, 11, 1, 1961.
472. TOBIE, E. J. Biological factors influencing transmission of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. *J. Parasitol.*, 51, 837, 1965.
473. TOBIE, E. J. Observations on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. *J. Invert. Path.*, 15, 118, 1970.
474. GREWAL, M. S. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli*, Tejera 1920 in the invertebrate host. *Exp. Parasitol.*, 6, 123, 1957.
475. HERBIG-SANDREUTER, A. Further studies on *Trypanosoma rangeli*, Tejera 1920. *Acta Tropica*, 14, 193, 1957.
476. ZELEDON, R. e BLANCO, E. Relaciones huesped-parásito en *Trypanosomiasis rangeli*. I. Infeción intestinal y hemolinfático • ompa-

- rativa de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*. *Rev. Biol. Trop. Costa Rica*, 13, 143, 1965.
477. CUBA-CUBA, C. A. Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli*. III. Observações sobre a infecção experimental de *Panstrongylus herreri*, Wygodzinsky, 1948. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 171, 211, 1975.
478. ZELEDON, R., SCHOSINSKY, K. e GUARDIA, V. Infección experimental de *Cimex hemipterus* y *C. lectularis* con *Trypanosoma rangeli* y *Schizotrypanum cruzi*. I. *Congr. Centroamer. Microbiol.*, Costa Rica, 1965.
479. ANTHONY, R. L., JOHNSON, C. M. e SOUZA, O. E. Use of micro-ELISA for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28, 969, 1979.
480. ANTHONY, R. L., CODY, T. S. e CONSTANTINE, N. T. Antigenic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* by means of monoclonal-hybridoma antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30, 1192, 1981.
481. ZELEDON, R. e MONGE, E. Natural immunity of the bug *Triatoma infestans* to the protozoan *Trypanosoma rangeli*. *J. Invert. Path.*, 8, 420, 1966.
482. TOBIE, E. J. Fate of some culture flagellates in the hemocell of *Rhodnius prolixus*. *J. Parasitol.*, 54, 1040, 1968.
483. KREUTZER, R. D. e SOUZA, E. O. Biochemical characterization of *Trypanosoma spp.* by isozyme electrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30, 308, 1981.
484. SCHOTTELIUS, J. Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* by their different complement sensitivity. *Tropenmed. Parasit.*, 33, 147, 1982.
485. BRONZINA, A. A., D'ALESSANDRO, A. e SEGURA, E. L. Diferencias y similitudes antigenicas entre *T. rangeli* y *T. cruzi*. *Medicina*, Buenos Aires, 40, 45, 1980.
486. MARINKELLE, C. J. The effect of Lampit on *Trypanosoma rangeli* in experimentally infected mice. *Tropenmed. Parasit.*, 33, 151, 1982.
487. MOLINEUX, D. H. Biology of trypanosomes of the subgenus *Herpetosoma*. In: *Biology of the Kinetoplastida*. W. H. R. Lumsden e D. A. Evans, Eds., Academic Press, Nova Iorque, 1979, vol. 1, p. 285.
488. DEANE, M. P. On the life cycle of trypanosomes of the *lewisi* group and their relationship to other mammalian trypanosomes. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 11, 34, 1969.
489. ORMEROD, W. E. The initial stages of infection with *Trypanosoma lewisi*: control of parasitemia by the host. In: *Immunity to Protozoa*. P. C. C. Garcham, A. C. Pierce e I. Roitt, Eds., Blackwell, Oxford, 1963, p. 213.

490. TARGET, G. A. T. e VIENS, P. Immunity to *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) infections in rodents. In *Biology of the Kinetoplastida*. W. H. R. Lumsden e D. A. Evans, Eds., Academic Press, Nova Iorque, 1979. vol. 2, p. 461.
491. TALIAFERRO, W. H. A reaction product in infections with *Trypanosoma lewisi* which inhibits the reproduction of the trypanosomas. *J. Exp. Med.*, 39, 171, 1924.
492. TALIAFERRO, W. H. Infection and resistance in trypanosome infections: studies on the reproduction-inhibiting product in infections with *Trypanosoma lewisi*. *Proceed. Inst. Med.*, 5, 319, 1925.
493. TALIAFERRO, W. H. Trypanocidal and reproduction-inhibiting antibodies to *Trypanosoma lewisi* in rats and rabbits. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 16, 32, 1932.
494. COVENTRY, F. A. The trypanocidal action of specific antiserums on *Trypanosoma lewisi* in vivo. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 12, 366, 1930.
495. D'ALESSANDRO, A. Nonpathogenic trypanosomes of rodents. In *Immunity to parasitic animals*. G. J. Jackson, R. Herman e I. Singer, Eds., Appleton-century-crofts, Nova Iorque, 1970, p. 691.
496. D'ALESSANDRO, A. Ablastin: The phenomenon. *Exp. Parasitol.*, 38, 303, 1975.
497. CORRADETI, A. Acquired sterile immunity in experimental protozool infection. In: *Immunity to Protozoa*. P. C. C. Garcham, A. C. Pierce e I. Roitt. Eds., Blackwell, Oxford, 1963, p. 39.
498. DUCA, C. J. Studies on age resistance against trypanosome infection. II. The resistance of rats of different age groups to *Trypanosoma lewisi* and the blood response of rats infected with this parasite. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29, 25, 1939.
499. DUSANIC, D. G. Immunosuppression and ablastin. *Exp. Parasitol.*, 38, 322, 1975.
500. LEE, C. M. e LINCICOME, D. R. *Trypanosoma lewisi* duration of the immune state in rats. *Z. Parasitenkd.*, 38, 344, 1972.
501. FERRANTE, J. F. e JENKINS, C. R. Surface immunoglobulins a possible mechanism for the persistence of *Trypanosoma lewisi* in the circulation of rats. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 55, 275, 1977.
502. ENTNER, N. Further studies of antigenic changes in *Trypanosoma lewisi*. *J. Protozool.*, 15, 638, 1968.
503. D'ALESSANDRO, A. *Trypanosoma lewisi*: production of exoantigens during infection in the rat. *Exp. Parasitol.* 32, 149, 1972.
504. BAWDEN, M. P. *Trypanosoma lewisi*: characteristics of an antigen which induces ablastic antibody. *Exp. Parasitol.*, 36, 397, 1974.
505. DWYER, D. M. Immunologic and fine structure evidence of avidly bound host serum proteins in the surface coat of a bloodstream trypanosome. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 73, 1222, 1976.

506. GIANNINI, M. S. H. e D'ALESANDRO, A. *Trypanosoma lewisi*: accumulation of antigen-specific host IgG as a component of the surface coat during the course of infection in the rat. *Exp. Parasitol.*, 47, 342, 1979.
507. D'ALESANDRO, A. e CLARKSON JR., A. B. *Trypanosoma lewisi* avidity and adsorbability of ablastin, the rat antibody inhibiting parasite reproduction. *Exp. Parasitol.*, 50, 384, 1980.
508. GIANNINI, M. S. H. e D'ALESANDRO, A. Trypanostatic activity of rat IgG purified from the surface coat of *Trypanosoma lewisi*. *J. Parasitol.*, 68, 765, 1982.
509. GIANNINI, M. S. H. e D'ALESANDRO, A. Isolation of protective, antigens from *Trypanosoma lewisi* by using trypanostatic (ablastic) immunoglobulin G from the surface coat. *Infect. Immunity.*, 43, 617, 1984.
510. HSU, S-R. e DUSANIC, D. G. *Trypanosoma lewisi*: antibody classes which mediate precipitation, agglutination, and the inhibition of reproduction. *Exp. Parasitol.*, 53, 45, 1982.
511. MUHLFORDT, H. Reaktion der maus auf serumbehandlung und *Trypanosoma lewisi* infektion. *Z. Tropenmed. Parasitol.*, 22, 203, 1971.
512. MOULDER, J. W. Changes in glucose metabolism of *Trypanosoma lewisi* during the course of an infection in the rat. *J. Infect. Dis.*, 83, 42, 1948.
513. TALIAFERRO, W. H. e PIZZI, T. The inhibition of nucleic acid and protein synthesis in *Trypanosoma lewisi* by the antibody ablastin. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 46, 733, 1960.
514. D'ALESANDRO, A. e SHERMAN, I. W. Changes in latic dehydrogenase levels of *Trypanosoma lewisi* associated with appearance of ablastic immunity. *Exp. Parasitol.*, 15, 430, 1964.
515. LINCICOME, D. R. e SHEPPERSEN, J. R. Experimental evidence for molecular exchanges between a dependent trypanosome cell and its host. *Exp. Parasitol.*, 17, 148, 1965.
516. SANCHEZ, G. e DUSANIC, D. G. *Trypanosoma lewisi*: creatine phosphokinase, ornithine carbamyl transferase, ATPase, Pi, and glucose levels in the rat host. *Exp. Parasitol.*, 23, 371, 1968.
517. PATTON, C. L. Ouabain and antibody inhibition of active transport and reproduction in the blood protozoan *Trypanosoma lewisi*. *Fed. Proceed.*, 29, 812, 1970.
518. PATTON, C. L. Inhibition of reproduction in *Trypanosoma lewisi* by ouabain. *Nature New Biol.*, 237, 253, 1972.
519. SCHRAW, W. P. e VAUGHN, G. L. *Trypanosoma lewisi*: alterations in membrane function in the rat. *Exp. Parasitol.*, 48, 15, 1979.
520. CHERIAN, P. V. e DUSANIC, D. G. *Trypanosoma lewisi*: immunoelectron microscopic studies on the surface antigens of bloodstream forms. *Exp. Parasitol.*, 43, 128, 1977.

521. CHERIAN, P. V. e DUSANIC, D. G. *Trypanosoma lewisi*: ultrastructural observations of surface antigen movement induced by antibody. *Exp. Parasitol.*, 44, 14, 1978.
522. CLARKSON JR., A. B. e MELLOW, G. H. Rheumatoid factor-like immunoglobulin-M protects previously uninfected rat pups and dams from *Trypanosoma lewisi*. *Science*, 214, 186, 1981.
523. MELLOW, G. e CLARKSON JR., A. B. *Trypanosoma lewisi*: enhanced resistance in naive lactating rats and their suckling pups. *Exp. Parasitol.*, 53, 217, 1982.
524. GREENBLAT, C. L. e TYROLER, E. *Trypanosoma lewisi*: in vitro behaviour of rat spleen cells. *Exp. Parasitol.*, 30, 363, 1971.
525. GREENBLAT, C. L. *Trypanosoma lewisi*: electron microscopy of the infected spleen. *Exp. Parasitol.*, 34, 197, 1973.
526. PATTON, C. L. *Trypanosoma lewisi*: influence of sera and peritoneal exudate cells. *Exp. Parasitol.*, 31, 370, 1972.
527. JARVINEM, J. A. e DALMASSO, A. P. Complement in experimental *Trypanosoma lewisi* infections of rats. *Infec. Immunity.*, 14, 894, 1976.
528. NIELSEN, K., SHEPPARD, J., TIZARD, I. e HOLMES, W. *Trypanosoma lewisi*: characterization of complement-activating components. *Exp. Parasitol.*, 43, 153, 1977.
529. STURTEVANT, J. E. e BALBER, A. E. Externally disposed membrane polypeptides of intact and protease-treated *Trypanosoma lewisi* correlated with sensitivity to alternate complement pathway-mediated lysis. *Infec. Immunity.*, 42, 869, 1983.
530. EL-ON, J. e GREENBLAT, C. L. The effects of the immunosuppression agent cyclophosphamide on IgG levels and parasite number of experimental trypanosomiasis. *Israel J. Med. Sci.*, 7, 1294, 1971.
531. BECKER, E. R. Effect of solicylates and related compounds on ablastic response in rats infected with *Trypanosoma lewisi*. II. Dihydrobenzoic acids: antagonisms. *J. Parasitol.*, 47, 1007, 1961.
532. TALIAFERRO, W. H. e D'ALESSANDRO, A. *Trypanosoma lewisi* infection in the rat: effect of adenine. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 46, 733, 1971.
533. PATTON, C. L. e CLARKE, D. T. *Trypanosoma lewisi* infections in normal rats treated with dexamethasone. *J. Protozool.*, 15, 31, 1968.
534. TALIAFERRO, W. H., TALIAFERRO, L. G. e JAROSLOW, B. N. *Radiation and Immune mechanism*. Academic Press, Nova Iorque, 1964.
535. TEMPLIS, C. H. e LYSENKO, M. G. Effect of X-irradiation on *Trypanosoma lewisi* infection in the rat. *Exp. Parasitol.*, 16, 1974, 1965.
536. TALIAFERRO, W. H. The effects of splenectomy and blockage on the passive transfer of antibodies against *Trypanosoma lewisi*. *J. Infect. Dis.*, 62, 98, 1938.

537. HALLEM, M. A. e MINTON, S. A. The effects of adrenalectomy and splenectomy in *Trypanosoma lewisi* infections in white rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 69, 294, 1966.
538. HANSON, W. L. e CHAPMAN JR., W. L. Comparison of the effects of neonatal thymectomy on *Plasmodium berghei*, *Trypanosoma lewisi* and *Trypanosoma cruzi* infections in the albino rat. *Z. Parasitenkd.*, 44, 227, 1974.
539. PERLA, D. e MARMORSTON-GOTTESMAN, J. Further studies on *Trypanosoma lewisi* infections in albino rats. I. The effects of thymectomy and bilateral gonadectomy on *Trypanosoma lewisi* infection in albino rats. *J. Exp. Med.*, 52, 601, 1930.
540. SPIRA, D. T. e GREENBLAT, C. L. The effects of antithymocyte serum on *Trypanosoma lewisi* infections. *J. Protozool.*, 17, (suppl.), 29, 1970.
541. SHAW, G. L. e DUSANIC, D. G. *Trypanosoma lewisi*: termination of pregnancy in the infected rat. *Exp. Parasitol.*, 33, 46, 1973.
542. SIMAREN, J. O. Ultrastructure of *Trypanosoma lewisi* localization and alteration in rat liver. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 48, 735, 1973.
543. LEE, C. M. e BARNABAS, E. *Trypanosoma lewisi*: ultrastructural changes in rat liver. *Z. Parasitenkd.*, 44, 93, 1974.
544. SIMAREN, J. O. Ultrastructural demonstration and glomerular cytopathology associated with *Trypanosoma lewisi*. *Proceed. Intern. Congr. Parasitol.*, Munique, agosto 1974, p. 1580.
545. BRUMPT, E. Evolution de *Trypanosoma lewisi*, *duttoni*, *nabiasi*, *blanchardi*, chez les puces et les punaises. Transmission par déjections. Comparaison avec *T. cruzi*. *Bull. Soc. Path. Exot.* 6, 167, 1913.
546. KHAZINDAR, S. H. e DUSANIC, D. G. Serological and vaccination studies with bloodstream and culture forms of *Trypanosoma muscui*. *Intern. J. Parasitol.*, 12, 257, 1982.
547. VIENS, P., TARGETT, G. A. T. e LUMSDEN, W. H. R. The immunological response of CBA mice to *Trypanosoma muscui*: mechanisms of protective immunity. *Intern. J. Parasitol.*, 5, 235, 1975.
548. BROOKS, B. O. e REED, N. D. Absorption of ablatic activity from mouse serum by using a *Trypanosoma muscui* population rich in dividing forms. *Infec. Immunity*, 27, 94, 1980.
549. TARGETT, G. A. T. e VIENS, P. The immunological response of CBA mice to *Trypanosoma muscui*: elimination of the parasite from the blood. *Intern. J. Parasitol.*, 5, 231, 1975.
550. WILSON, V. C. L. C. The morphology of the reproductive stages of *Trypanosoma (Herpetosoma) muscui* in C3H mice. *J. Protozool.*, 18, suppl., 43, 1971.
551. VIENS, P., TARGETT, G. A. T., WILSON, V. C. L. C. e EDWARDS, C. I. The persistence of *Trypanosoma (Herpetosoma) muscui* in the

- kidneys of immune CBA mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 66, 669, 1972.
552. TARGETT, G. A. T. e VIENS, P. Ablastin: control of *Trypanosoma musculi* infections in mice. *Exp. Parasitol.*, 38, 309, 1975.
553. TRUDEL, L., DESBIENS, C., VIENS, P. e TARGETT, G. A. T. Ablastin and the control of *Trypanosoma musculi* infections in mice. *Parasit. Immunol.*, 4, 149, 1982.
554. DUSANIC, D. G. Homologous and heterologous ablastin effects on *Trypanosoma duttoni* (*T. musculi*) grown at 37°C. *J. Protozool.*, 21, 422, 1974.
555. LAJEUNESSE, M. C., RICHARDS, R., VIENS, P. e TARGETT, G. A. T. Persistence of dividing forms of *Trypanosoma musculi* in the peritoneal cavity of infected CBA mice. *IRCS Medical Science*, 3, 244, 1975.
556. VIENS, P., TARGETT, G. A. T., LEUCHARS, E. e DAVIES, A. J. S. The immunological response of CBA mice to *Trypanosoma musculi* infections in mice. I. Initial control of the infection and the effect of T-cell deprivation. *Clin. Exp. Immunol.*, 16, 279, 1974.
557. POULIOT, P., VIENS, P. e TARGETT, G. A. T. Lymphocytes and the transfer of immunity to *Trypanosoma musculi* in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 27, 507, 1977.
558. TARGETT, G. A. T., LEUCHARS, E., DAVIES, A. J. S. e VIENS, P. Thymus graft reconstitution of T-cell-deprived mice infected with *Trypanosoma musculi*. *Parasit. Immunol.* 3, 353, 1981.
559. CLAYTON, C. A culture system for in vitro studies of immunity to *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *musculi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74, 125, 1980.
560. LEE, C. M., HUMPHREY, P. A. e ABOKO-COLE, G. F. Interaction of nutrition and infection. Effect of zinc deficiency on resistance to *Trypanosoma musculi*. *Intern. J. Biochem.*, 15, 841, 1983.
561. KRAMPITZ, H. E. Ablastin: Antigen tolerance and lack of ablastin control of *Trypanosoma musculi* during host's pregnancy. *Exp. Parasitol.*, 38, 317, 1975.
562. VIENS, P., ROGER, M. e DUBOIS, R. Influence of pregnancy on mouse immunity to *Trypanosoma musculi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77, 274, 1983.
563. JARVINEN, J. A. e DALMASSO, A. *Trypanosoma musculi*: immunologic features of the anemia in infected mice. *Exp. Parasitol.*, 43, 203, 1977.
564. NAGLE, R. B., WARD, P. A., LINDSLEY, H. B., SADUN, E. H., JOHNSON, A. J., BERKAW, R. E. e HILDEBRANDT, P. K. Experimental infections with african trypanosomes. VI. Clomerulonephritis involving the alternate pathway of complement activation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23, 15, 1974.

565. WELLS, E. A. Subgenus *Megatrypanum*. In: *Biology of the kinetoplastida*. W. H. R. Lumsden e D. A. Evans, Eds., Academic Press, Nova Iorque, 1976, vol. 1, p. 257.
566. CARPANO, M. Localizations du *Trypanosoma theileri* dans les organes internes des bovines. Son cycle évolutif. *Ann. Parasitol. Humaine et Comparée*, 10, 305, 1932.
567. KRANEVELD, F. C. Einzelne Uebertragungsversuche von *Trypanosoma theileri* Laveran 1902 mit *Tabaniden* Nederl-Indische Blad. *Diergeneesk.* 43, 132, 1931.
568. NÖLLER, W. Die nächsten Verwandten de Blutflagellaten und ihre Beziehungen zu den blutbewohender Formen. In: *Handbuck der Pathogen Protozoen.*, S. von Prowazed e W. Nöller, Eds., Leipzig, 1969.
569. WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp. Parasitol.*, 18, 124, 1966.
570. BURGDORFER, W., SCHMIDT, M. L. e HOOGSTROAL, H., Detection of *Trypanosoma theileri* in Ethiopian cattle ticks. *Acta Tropica*, 30, 340, 1973.
571. LAMY, L. e BOULEY, G. Observation en France, chez un veau, d'un cas d'infection massive a *Trypanosoma theileri*, Laveran, 1902. *Bulletin de l'Academic Veterinaire de France*, 40, 323, 1967.
572. WOO, P. T. K. e LIMEBEER, R. L. Evidence of intrauterine transmission of a trypanosome in cattle. *Acta Tropica*, 28, 61, 1971.
573. LUNDHOLM, B. D., STORZ, J. e MCKERCHER, D. C. *Trypanosoma theileri* as a contaminant of tissue origin in cultures of foetal bovine kidney cells-*in vitro*. *Virology*, 8, 394, 1959.
574. MALMQUIST, W. A. Trypanosomes in leucocyte cultures. *Veterinary Record.*, 77, 350, 1965.
575. CROSS, R. F., REDMAN, D. R. e BOHL, E. H. Trypanosome associated with bovine lymphocytosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 153, 571, 1968.
576. MOULTON, E. e KRAUSS, H. H. Ultrastructure of *Trypanosoma theileri* in bovine spleen culture. *Cornell Veterinarian*, 62, 124, 1972.
577. CARMICHAEL, J. Turning sickness of cattle and *Trypanosoma theileri*. *Parasitology*, 31, 498, 1939.
578. GALLO, P. Le tripanosomiasi animali nel Nicaragua. *Veterinary Bulletin*, 11, 357, 1941.
579. KALINER, G. The extravascular presence of *Trypanosoma theileri* in the cerebellum of a zebu associated with meningoencephalitis. *Berliner und Munchner Tieraztliche Wachenschaft*, 85, 241, 1972.
580. WELLS, E. A., LUMSDEN, W. H. R. e MCNEILLAGE, G. J. C. Isolation of trypanosomes of the section *Stercoraria* from cattle in Nigeria and the United Kingdom. *British Veterinary Journal*, 24, 382, 1968.

581. TOWNSEND, J., DUFFUS, W. P. H. e GLAUERT, A. M. An ultrastructural study of the interaction *in vitro* between *Trypanosoma theileri* and bovine leucocytes. *J. Cell. Sci.*, 56, 389, 1982.
582. TOWNSEND, J. e DUFFUS, W. P. H. *Trypanosoma theileri*: antibody-dependent killing by purified populations of bovine leucocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 48, 289, 1982.
583. CROSS, R. F., SMITH, C. K. e REDMAN, D. R. Observation on *Trypanosoma theileri* infection in cattle. *Can. J. Comp. Med.*, 35, 12, 1971.
584. HARE, W. C. D. e SOULSBY, E. J. L. Stimulation of DNA synthesis in bovine leucocytes cultures by *Trypanosoma theileri* antigen. *J. Parasitol.*, 55, 973, 1969.
585. PERRYMAN, L. E. Primary and secondary immune deficiencies of domestic animals. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 23, 1979.
586. BAKER, D. C., GAUNT, S. D., NIELSEN, K. H. e ADAMS, L. G. Hemoparasitism, humoral immunodeficiency, and an IgG1 fragment in a cow. *JAVMA*, 181, 480, 1982.
587. RISTIC, M. e TRAGER, W. Cultivation at 37°C of a trypanosome (*Trypanosoma theileri*) from cows with depressed milk production. *J. Protozool.*, 5, 146, 1958.
588. LEVINE, N. D., WATRACH, A. M., KANTOR, S. e HARDENBROOK, H. J. A case of bovine trypanosomiasis due to *Trypanosoma theileri* in Illinois. *J. Parasitol.* 42, 553, 1956.
589. HERBERT, W. J. e PARRAT, D. Virulence of trypanosomes in the vertebrate host. In: *Biology of the Kinetoplastida*. W. H. R. Lumsden e D. A. Evans, Eds., Academic Press, Nova Iorque, 1979, vol. 2, p. 481.
590. STRANDSTRÖM, H., VEYALAINEN, P., BERGER, R. e TUOMI, J. Isolation of *Trypanosoma theileri* from the blood of two cows, one leukotic, one exhibiting lymphocytosis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 13, 332, 1972.

Um longo período de adaptação evolucionária teria conferido a certos protozoários a capacidade de perpetuarem-se em seus hospedeiros mamíferos oferecendo à civilização humana exemplos notáveis de coexistência pacífica? Certamente este deve ser o caso de certos tripanossomatídeos descritos neste livro.

O autor descreve as complexas relações dos tripanossomos *Stercoraria* nos seus hospedeiros. Em contraste com os protozoários do grupo *Salivaria*, representados pelos tripanossomos africanos patogênicos, os primeiros são considerados relativamente não-patogênicos, pois as infecções resultantes não produzem doença reconhecível e são usualmente inócuos para o hospedeiro. Isto pode ser considerado verdadeiro também para o *Trypanosoma cruzi*, que causa doença de Chagas no homem e em alguns animais domésticos, pois este tripanossomo é perfeitamente adaptável e consegue sobreviver em mamíferos que servem como seus hospedeiros e reservatórios.

ANTÔNIO TEIXEIRA, nasceu na Serra dos Maracas, Estado da Bahia. Diplomou-se em Medicina pela Universidade Federal da Bahia, onde exerceu a Docência. Tem Doutorado em Patologia pela Universidade Federal de Minas Gerais. Fez Pós-Doutorado no L'Institut de Cancerologie et d'Immunogenetique, em Villejuif, França, na Universidade Cornell de Nova Iorque, e no Instituto Nacional de Saude dos Estados Unidos da America. Atualmente e Professor Adjunto na Faculdade de Ciências da Saude/UnB. Sua atividade de pesquisa científica, esta concentrada nos estudos de imunologia, imunopatologia e imunoprofilaxia da Doença de Chagas.