

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE CLONES DAS CEPAS Y, CL E MR DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM CAMUNDONGOS C₃H ISOGÊNICOS

S. MARQUES DE ARAÚJO & E. CHIARI

Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG, Caixa Postal 2486, 31270 Belo Horizonte, MG, Brasil

Characterization of *Trypanosoma cruzi* clones – Ten clones of *Trypanosoma cruzi* isolated from Y, CL and MR strains were studied. The infectivity of culture forms, parasitemia pattern, polymorphism and mortality were studied in C₃H inbred mice. Significant intra-group differences among Y and CL clones were found. MR clones showed higher homogeneity. These data indicate that *T. cruzi* strains can show different degrees of heterogeneity. It is suggested that conditions used to maintain *T. cruzi* strains may result in a selective advantage for some subpopulations (clones) after many years of laboratory maintenance.

Key words: clone – heterogeneity – *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico da doença de Chagas, tem sido isolado de uma série de hospedeiros vertebrados e invertebrados que têm como hábitat diferentes regiões com características geográficas, climáticas, ecológicas, edáficas e sócio-econômicas distintas. Essa diversidade de fatores pode, de alguma forma interferir na atuação do *T. cruzi* sobre cada hospedeiro. Já que as populações de *T. cruzi* quando isoladas são compostas por números imensuráveis de organismos, a diversidade de ambientes e manipulação em laboratórios podem levar o parasito a adquirir mecanismos e aptidões variados, constituindo populações com diferentes graus de competência a sobreviver em ambientes e situações diversas. Fatos como a variedade de manifestações clínicas da doença de Chagas, variação da infectividade das culturas, variação da taxa de metaciclogênese e perfil de isoenzimas, mudança de tropismo com manutenção (Koberle, 1968; Bice & Zeledón, 1970; Chiari, 1974; Andrade & Andrade, 1979; Romanha et al., 1979; SWG, 1979; Teixeira, 1979; Brener, 1980; Carneiro, 1982; Lana, 1986) e ainda a falta de reprodutibilidade e/ou mudança no curso de infecções experimentais levaram vários autores (Dvorak et al., 1980; Morel et al., 1980; Dvorak et al., 1982; Garcia & Dvorak, 1982; Engel et al., 1982; Doyle et al., 1984) a estudar o comportamento das subpopulações que constituem as cepas de *T. cruzi*, mostrando heterogeneidade frente a vários parâmetros.

Propusemo-nos neste estudo investigar algumas características biológicas de clones de *T. cruzi* confrontando-as entre si e com as suas cepas parentais, já conhecidas da literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de T. cruzi: foram utilizadas três cepas parentais e dez clones obtidos pela técnica de Goldberg & Chiari (1980), abaixo relacionados:

YP₁, YP₂ e YP₃ da cepa Y parental (Pereira da Silva e Nussenzweig, 1953);

CLP₁, CLP₃ e CLP₄ da cepa CL parental (Brener & Chiari, 1963);

MR₂, MR₄, MR₅ e MR₇ da cepa MR parental (Brener & Chiari, 1963).

Animais utilizados: camundongos C₃H isogênicos, machos, peso aproximado de 15 g, com cerca de 30 dias de idade, normais ou imunossuprimidos por radiação gama na dose de 650 rads (Gammacell 220, Nuclebrás).

Infecção dos animais: para a primeira infecção de cada cepa ou clone utilizou-se inóculo de 1×10^7 tripomastigotas metacíclicos do 7º dia de cultivo em meio M16 (Chiari et al., 1980), via intraperitoneal. A partir do 4º dia eram feitas contagens diárias dos tripomastigotas pela técnica de Brener (1962). A partir desta primeira inoculação as amostras foram divididas em: a) clones que determinaram parasitemia patente e passaram a ser mantidos por passagens sanguíneas sucessivas, com intervalos e inóculos determinados segundo característica de cada amostra; b) clones que não determinaram para-

sitemia patente ou apresentaram parasitemias irrisórias. Nestes casos a manutenção dos clones era feita com inoculação de material de hemocultura, via intraperitoneal, em animais irradiados. Estas passagens alternadas (hemocultura-camundongo irradiado-hemocultura) foram realizadas até ser obtida parasitemia suficiente para manutenção destes clones por passagens sanguíneas sucessivas em animais normais.

Manutenção das amostras: a cepa Y-parental foi mantida com repiques a cada 7 dias. Os clones YP₁, YP₂ e YP₃ sofreram repiques entre 10 e 14 dias. A cepa MR parental, CL parental e os clones MR₂, MR₄, MR₅, MR₇ e CLP₁ foram repicados com intervalos de 12 a 14 dias. Os clones CLP₃ e CLP₄, com baixas parasitemias, foram repicados a cada 17 e 37 dias, respectivamente.

Para caracterização das amostras foram avaliadas a infectividade das formas de cultura, as curvas de parasitemia, a morfologia das formas sanguíneas e a mortalidade.

A infectividade das formas de cultura foi comprovada pela ocorrência de parasitemia patente nos animais inoculados com cada amostra.

Para avaliação das curvas de parasitemia, foram feitas inoculações padronizadas com inóculo de 5.000 tripomastigotas sanguíneas/camundongo, via intraperitoneal, em lotes de seis animais que eram examinados a partir do 4º dia da inoculação.

A morfologia das formas sanguíneas foi avaliada em exames a fresco, com objetiva de imersão e contraste de fase, diariamente, pela contagem de 300 formas, sem seleção, ao longo da infecção, sendo os resultados expressos em percentagens de formas finas, largas e muito largas (Brener & Chiari, 1963).

A mortalidade ao longo das curvas de parasitemia foi expressa como percentagem acumulada. Os animais que sobreviveram ao período patente ficaram em observação até 120 dias após inoculação.

RESULTADOS

Infectividade das formas de cultura: para todas as amostras estudadas a inoculação de material de cultura em camundongos provocou o

aparecimento de parasitemia patente. No entanto, somente as cepas Y parental, MR parental, CL parental e os clones MR₂, MR₄, MR₅ e MR₇ apresentaram parasitemias compatíveis com a manutenção por passagens sanguíneas sucessivas imediatamente após a primeira inoculação. Os clones YP₁ e YP₃ sofreram uma passagem alternada, YP₂ e CLP₃ sofreram três, CLP₁, duas e o clone CLP₄, seis.

Curso das infecções experimentais: a Tabela apresenta os resultados referentes a períodos pré-patente e patente, à mortalidade e às formas sanguíneas predominantes ao longo das infecções com as cepas e clones estudados. Nas figs. 1, 2, 3, 4, 5 e 6 estas informações são ampliadas, demonstrando de forma clara a heterogeneidade das subpopulações que constituem as cepas do *T. cruzi*.

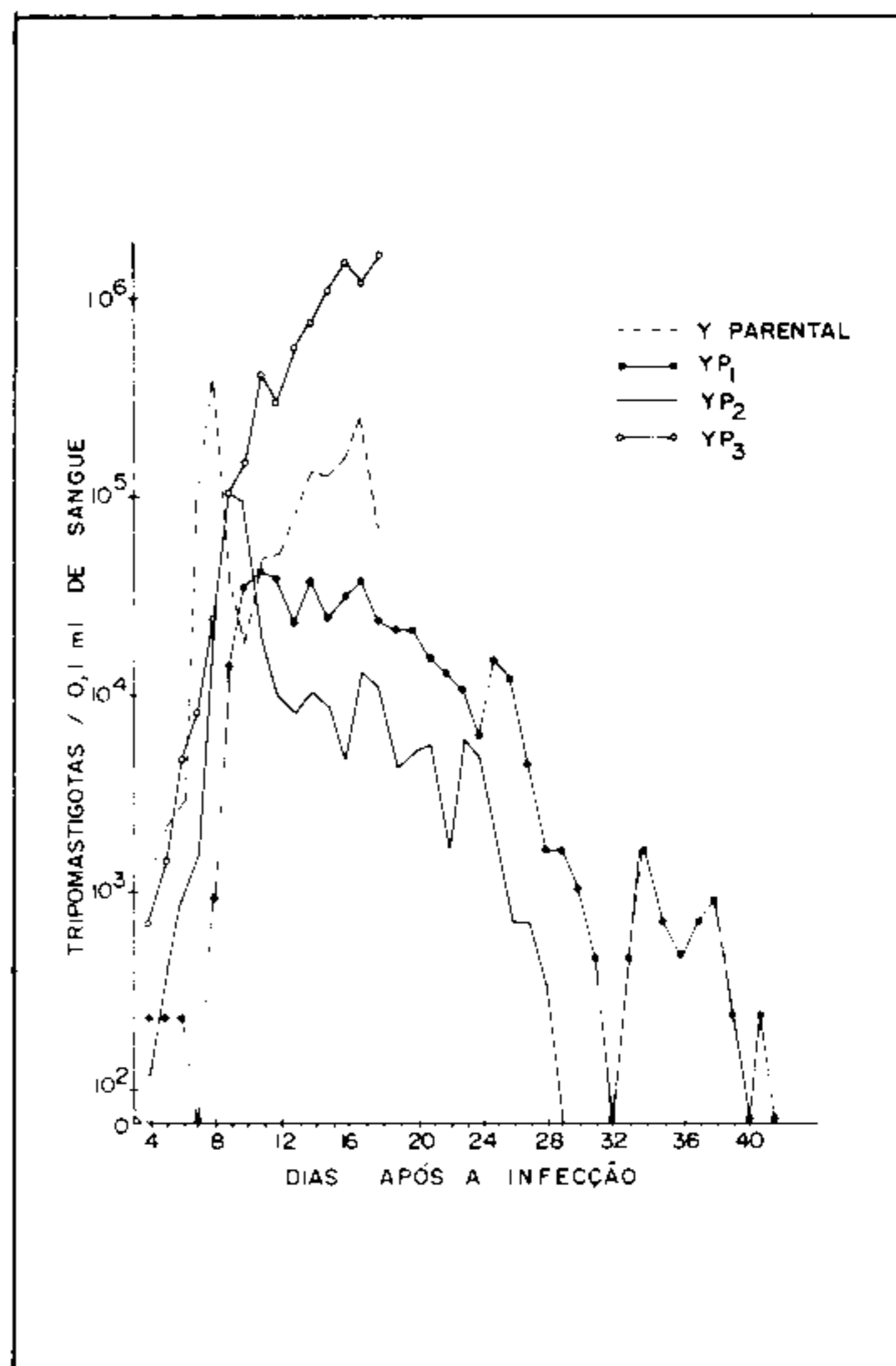


Fig. 1: curvas de parasitemia média calculadas para a 6ª e 11ª passagens para a cepa Y-parental, clone YP₁ e YP₃, e para a 5ª e 11ª passagens para o clone YP₂, em camundongos C₃H isogênicos inoculados I. P. com 5.000 tripomastigotas.

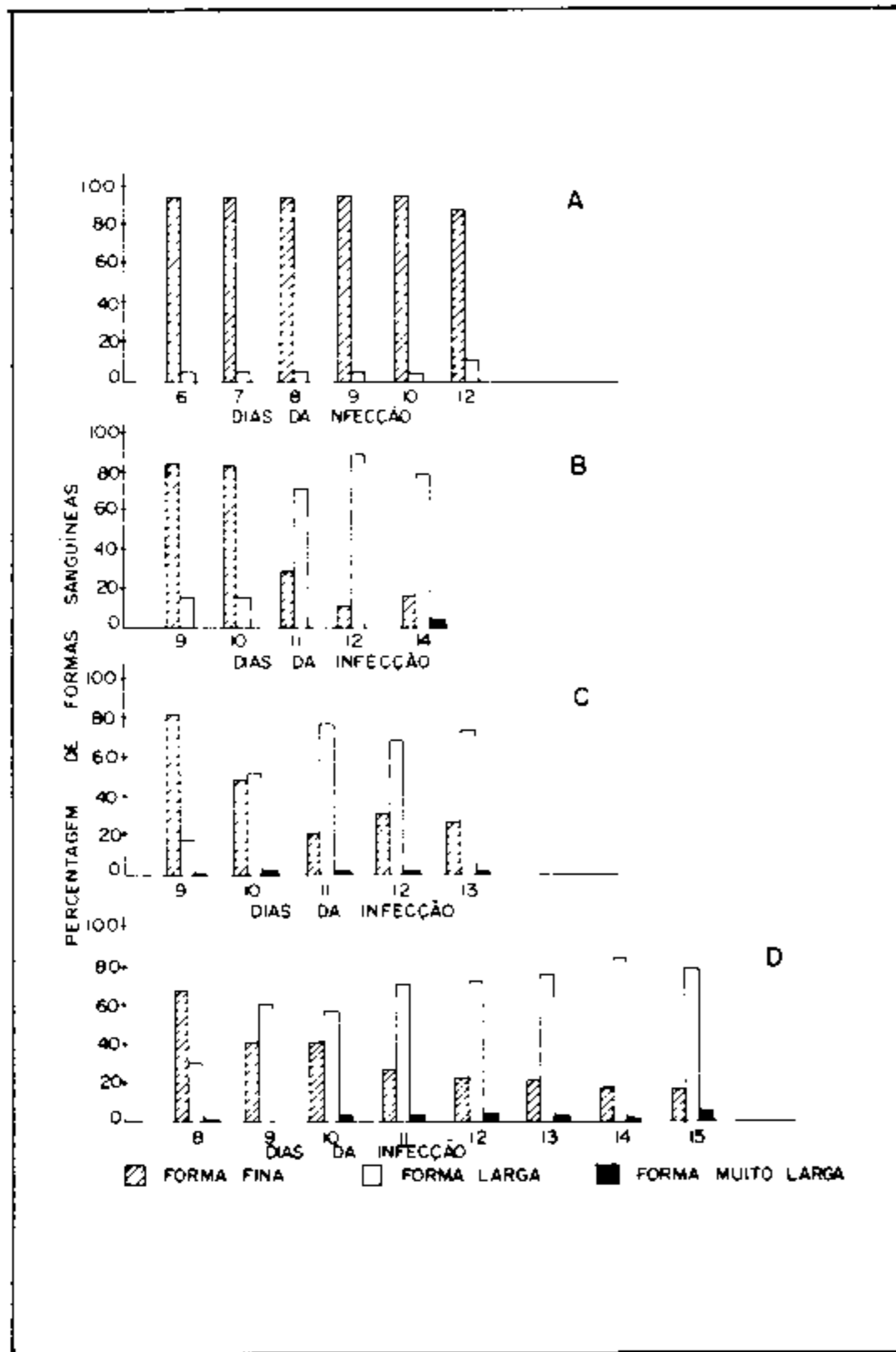


Fig. 2: percentagem de formas delgadas, largas e muito largas de tripomastigotas sangüíneas em camundongos C₃H isogênicos inoculados com a cepa CL-Parental (A) e clones CLP₁ (B) e CLP₃ (C).

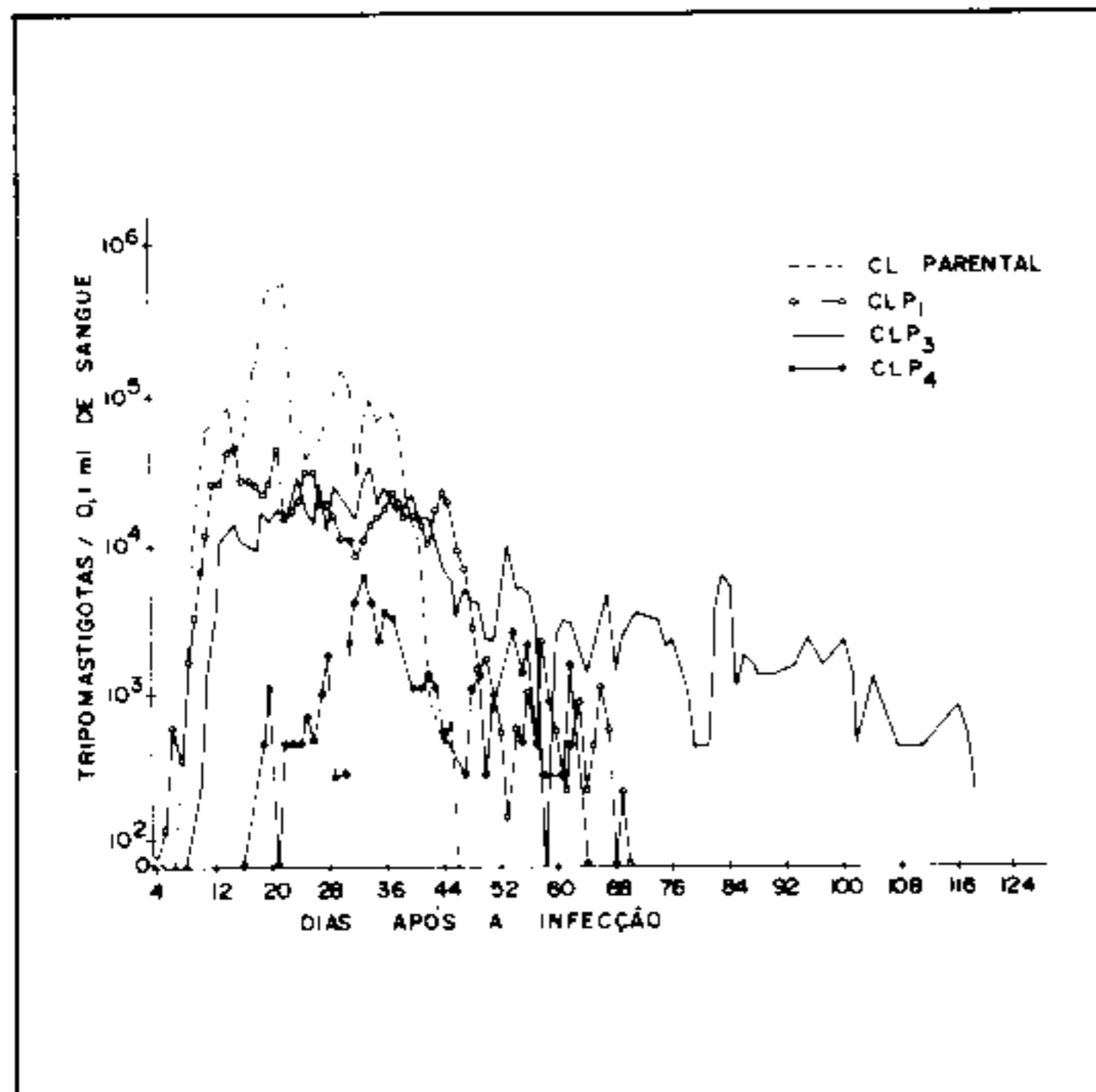


Fig. 3: curvas de parasitemia média calculadas para a 4ª e 9ª passagens para a cepa CL-Parental e clones CLP₁ e CLP₃ e para a 4ª passagem do clone CLP₄, em camundongos C₃H isogênicos inoculados, I. P., com 5.000 tripomastigotas sangüíneas.

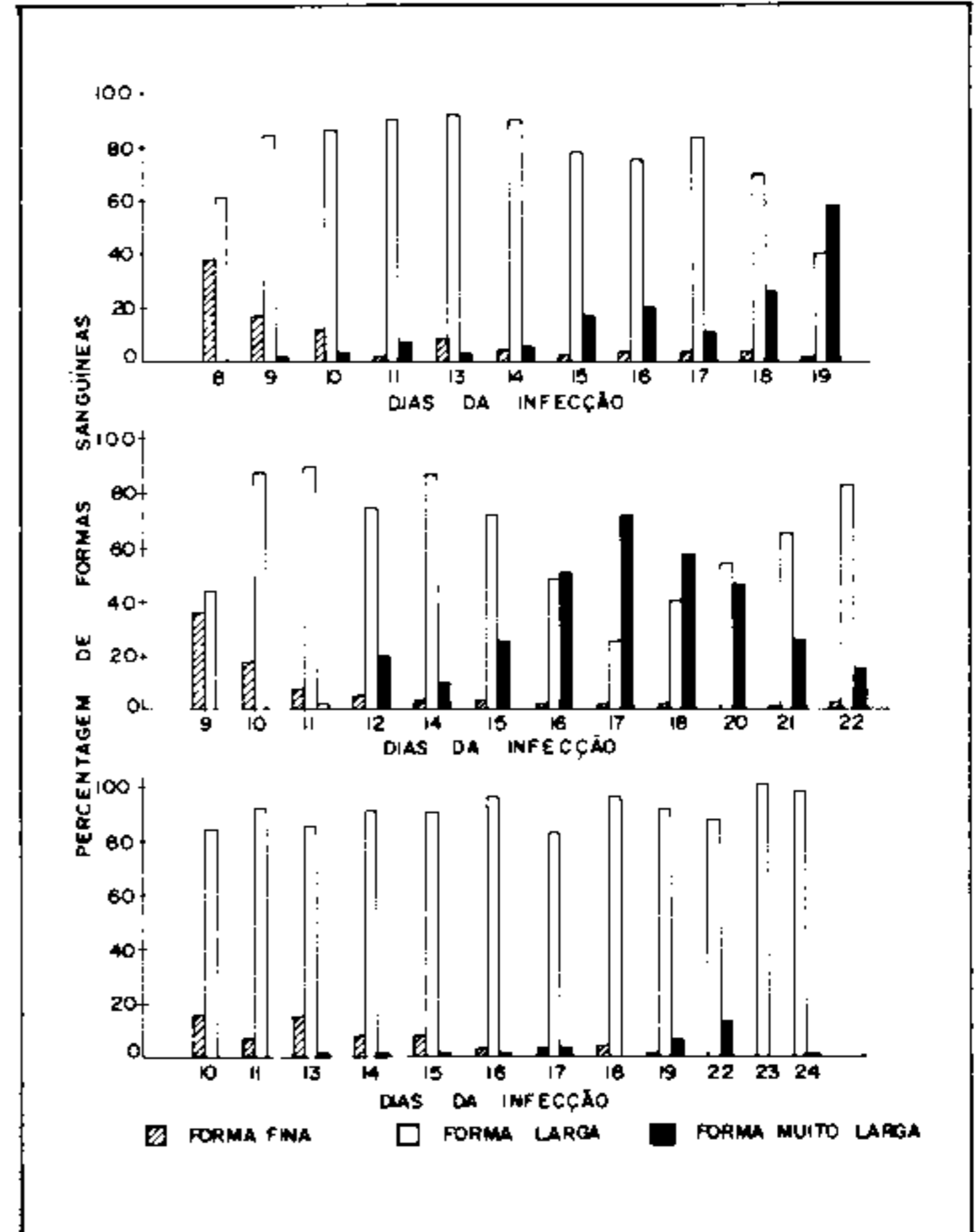


Fig. 4: percentagem de formas delgadas, largas e muito largas de tripomastigotas sangüíneas em camundongos C₃H isogênicos inoculados com a cepa CL-Parental (A) e clones CLP₁ (B) e CLP₃ (C).

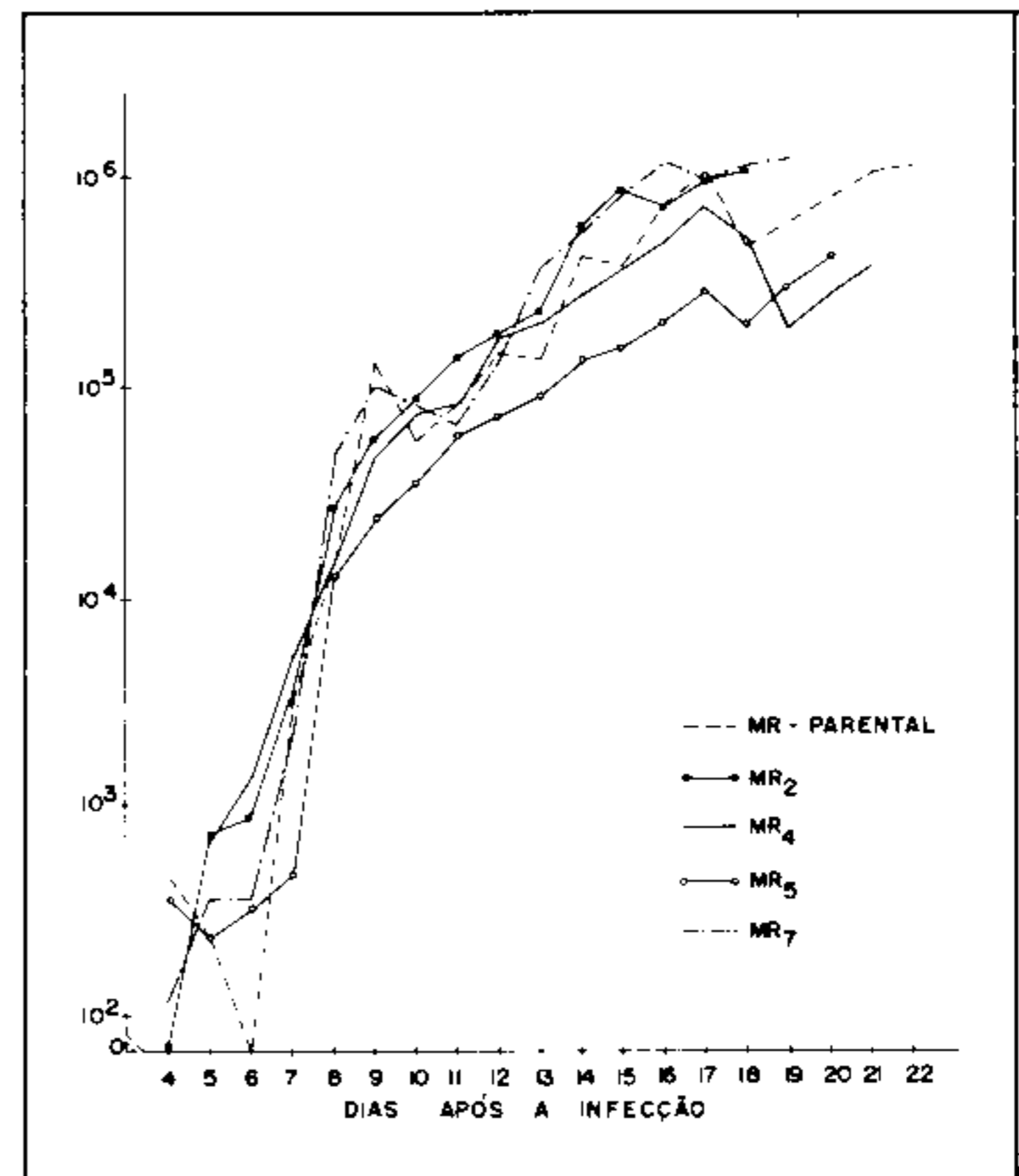


Fig. 5: curvas de parasitemia média calculadas para a 2ª e 7ª passagens para a cepa MR-Parental e clone MR₇; 2ª e 9ª para o clone MR₂; 4ª e 9ª para o clone MR₄ e 2ª e 8ª passagens para o clone MR₅ em camundongos C₃H isogênicos inoculados I. P., com 5.000 tripomastigotas sangüíneas.

TABELA

Períodos pré-patente e patente, mortalidade e forma sangüínea predominante na infecção de camundongos C₃H isogênicos por clones e cepas de *Trypanosoma cruzi*

Cepa ou clone	Período (dias)		Mortalidade (%)	Forma sangüínea predominante
	pré-patente	patente		
Cepa Y parental	4	17-18	100	fina
Clone YP ₁	4	40	0	larga
YP ₂	4	15	45,5	larga
YP ₃	4	16-18	100	larga
Cepa CL parental	6	19	81,8	larga
Clone CLP ₁	4	70	8,3	larga/muito larga
CLP ₃	9	118	25,0	larga
CLP ₄	18	63	0	larga
Cepa MR parental	4	16-22	100	fina/larga
Clone MR ₂	4	17-18	100	larga/muito larga
MR ₄	5	18-22	100	larga
MR ₅	4	18-21	100	larga
MR ₇	4	17-19	100	fina/larga

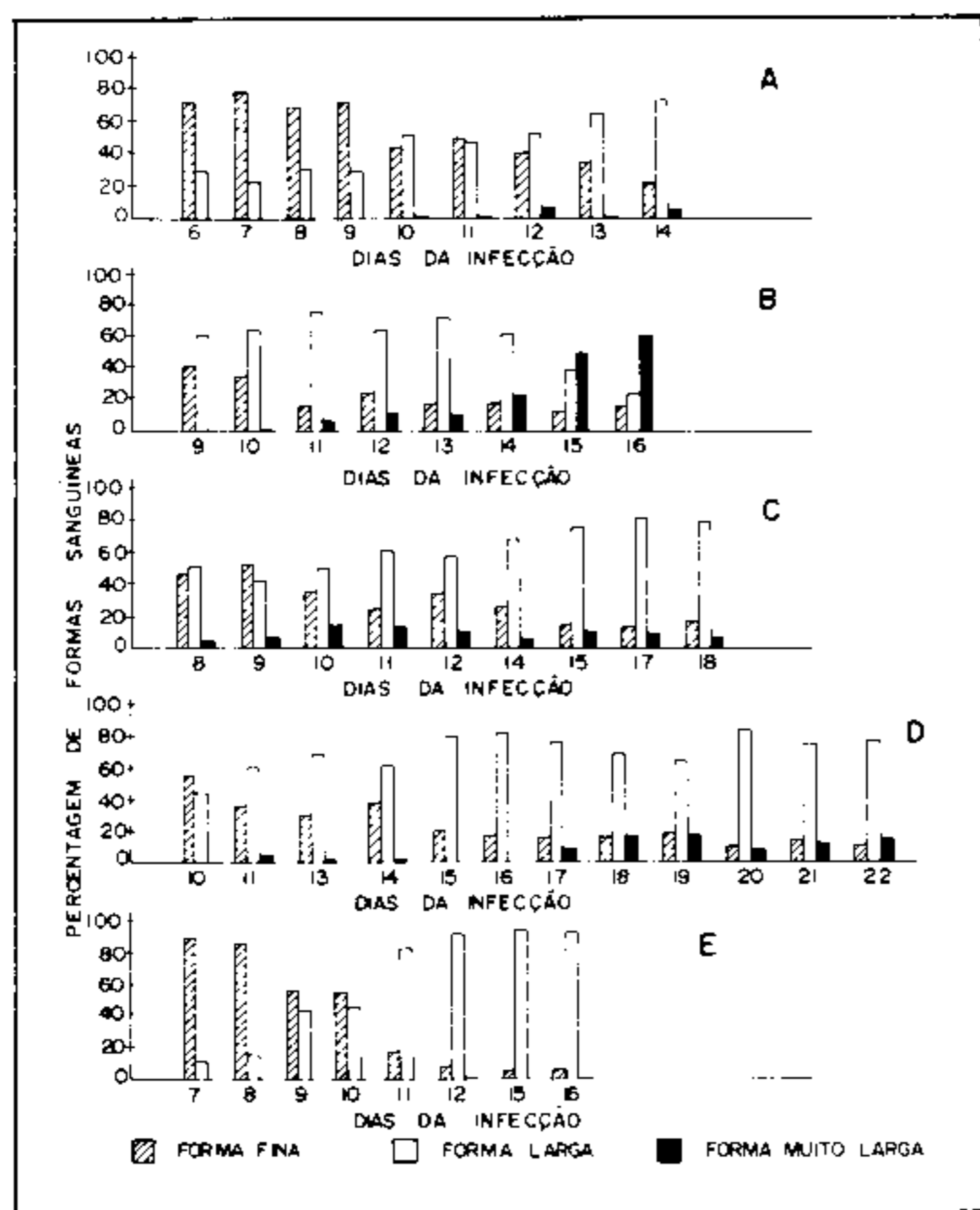


Fig. 6: porcentagem de formas delgadas, largas e muito largas de tripomastigotas sangüíneos em camundongos C₃H isogênicos inoculados com a cepa MR-Parental (A) e clones MR₂ (B), MR₄ (C), MR₅ (D) e MR₇ (E).

DISCUSSÃO

Desde a descrição do *T. cruzi* por Chagas (1909) inúmeras cepas têm sido isoladas de vários hospedeiros de diferentes regiões. Trabalhos recentes (Deane et al., 1984a, b) demons-

traram a importância do manuseio destes parasitos em laboratório. A heterogeneidade de subpopulações que constituem as cepas de *T. cruzi* vem sendo avaliada frente a parâmetros tais como cinética de crescimento de epimastigotas, comportamento no vetor, análise de esquizodemas e zimodemas e DNA total/organismo, composição antigênica, comportamento em animais isogênicos e infectividade para células de cultura (Dvorak et al., 1980; Garcia & Dvorak, 1980; Morel et al., 1980; Dvorak et al., 1982; Brongertz & Dvorak, 1983; Postan et al., 1983; Doyle et al., 1984; Engel et al., 1985).

Nosso trabalho vem reafirmar a possibilidade de coexistência de várias subpopulações dentro de uma cepa que podem se expressar ou não dependendo do tipo de manuseio. Observa-se também diferentes graus de heterogeneidade entre as cepas de *T. cruzi*.

Vários autores (Goble, 1951; Pizzi & Prager, 1952; Pizzi, 1957) têm demonstrado que a virulência de uma cepa que está sendo mantida em laboratório, em meios de cultivo, sem passar pelo animal vertebrado, varia inversamente com o período de cultivo. Outros autores (Packchnian & Sweets, 1947; Deane et al., 1963) demonstraram não ter ocorrido variação da virulência de algumas amostras estudadas, enquanto exemplos podem ser citados (Norman & Kagan, 1960; Kagan & Norman, 1960) em que a manutenção em cultura determinou aumento da virulência para algumas cepas. Chiari (1974) mostra

que tripomastigotas metacíclicos guardam a capacidade de infectar vertebrado mesmo após longo período de manutenção em meio acelu- lar, embora o tempo de cultivo influencie na infectividade. Lambrecht (1965) tentando explicar esta diminuição na virulência, afirma ser este fato consequência da seleção de formas mais aptas a se desenvolverem em cultura que em animal vertebrado.

Como foi observado, todas as amostras aqui estudadas apresentaram infectividade com parasitemia patente, embora os níveis de parasitos circulantes tenham sido diferentes. A diferença de infectividade a nível de clone foi também demonstrada por Doyle et al. (1984).

Pereira da Silva & Nussenzweig (1953) descrevendo pela primeira vez o comportamento da cepa Y falam da variação dos perfis das primeiras curvas de parasitemia obtidas para esta cepa. Takeda et al. (1980) trabalhando com um novo isolamento da cepa Y, denominado Y_r, observaram resultados distintos dos até então atribuídos à cepa Y. Brener & Chiari (1963) relataram que altos níveis parasitêmicos somente foram conseguidos com a cepa CL após cerca de 25 passagens, quando do isolamento desta cepa. Estes dados falam a favor da existência de subpopulações dentro destas cepas.

Nossos experimentos mostram curvas de parasitemia distintas para os clones da cepa Y. Para a cepa CL parental os resultados mostram nitidamente ser a cepa uma mistura de populações. As curvas de parasitemia dos clones de CL apresentam diferenças em seus períodos pré-patente e patente e nos níveis parasitêmicos alcançados, além da exigência de diferentes números de passagens alternadas para a manutenção em animais normais. O clone CLP₄ mostra as diferenças mais marcantes.

Nossos resultados confirmam achados bioquímicos e de biologia molecular (Romanha, 1982; Morel et al., 1980) quando foram mostradas diferenças em subpopulações das cepas Y e CL.

A homogeneidade de comportamento encontrada para os clones da cepa MR vem mostrar ser o grau de heterogeneidade variável. Brener (1965) relata para a cepa MR parasitemias altas e irregulares que se conservavam até o 2º mês da infecção quando diminuíam. Muitos dos animais inoculados sobreviviam. Este conjunto de

informações parece sugerir-nos que inicialmente existiam dentro da cepa MR, subpopulações outras que de alguma forma interagiram entre si, permitindo parasitemias irregulares e sobrevida de parte dos animais. Estas subpopulações teriam desaparecido com a manutenção prolongada.

A predominância de 90% de formas finas observada para a cepa Y não foi repetida por nenhum de seus clones. Para a cepa MR os 70% de formas muito largas citadas por Brener (1965) não foram por nós encontrados. Em lugar deste valor, apenas 7% destas formas foi observado. No entanto, o clone MR₂ mostrou mais de 60% de formas muito largas. Possivelmente o clone MR₂ estaria envolvido com o aparecimento deste caráter na cepa parental, que por prolongado período de manuseio em laboratório não mais estaria oferecendo condições para esta população se expressar. O fato de estar, agora, atuando isoladamente sobre o hospedeiro permitiria a evidência da característica.

A mortalidade variou grandemente entre os clones de Y: 100% para cepa Y parental e clone YP₃; 0% para clone YP₁ e 45,5% para o clone YP₂. Também para os clones da cepa CL foram observados valores extremos de mortalidade.

Frente aos dados apresentados podemos sugerir que as características estabelecidas para uma cepa, em laboratório, ao longo dos anos, seria a resultante da interação do comportamento de vários clones que por terem se beneficiado de determinadas condições de manuseio, tiveram sua expressão perpetuada de forma marcante em relação às demais subpopulações anteriormente presentes.

RESUMO

Caracterização de clones de *Trypanosoma cruzi* – Dez clones isolados das cepas Y, CL e MR foram caracterizados segundo infectividade das culturas, curvas de parasitemia, polimorfismo e mortalidade em camundongos C₃H isogênicos. Entre os clones das cepas Y e CL foram encontradas diferenças intragrupos bastante significativas. Os clones da cepa MR apresentaram maior homogeneidade. Estes resultados indicam que as cepas do *T. cruzi* podem apresentar diferentes graus de heterogeneidade. Também sugerem que as condições utilizadas para a manutenção de cepas de *T. cruzi* podem resul-

tar em vantagens seletivas para algumas subpopulações, podendo uma cepa ser o resultado da interação destas subpopulações (clones) selecionadas após alguns anos de manutenção em laboratório.

Palavras-chave: clone – heterogeneidade –
Trypanosoma cruzi

AGRADECIMENTOS

A Afonso da Costa Viana e Orlando Carlos Magno pelo trabalho técnico no laboratório.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, Z. A. & ANDRADE, S. G., 1979. Patologia. p. 214-248. In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro.
- BICE, D. E. & ZELEDÓN, R., 1970. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J. Parasitol.*, 56: 663-670.
- BRENER, Z., 1962. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 4: 389-396.
- BRENER, Z., 1965. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 59: 19-26.
- BRENER, Z., 1980. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.*, 18: 247-292.
- BRENER, Z. & CHIARI, E., 1963. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 5 (5): 220-224.
- BONGERTZ, V. & DVORAK, J. A., 1983. *Trypanosoma cruzi*: antigenic analysis of cloned stocks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32 (4): 716-722.
- CARNEIRO, M., 1982. *Caracterização biológica de amostras de Trypanosoma cruzi de diferentes zimodemas e esquizodemas*. Tese. Universidade Federal de Minas Gerais, 90 p.
- CHAGAS, C., 1909. Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schisotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1: 159-218.
- CHIARI, E., 1974. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* culture forms kept in laboratory for different periods of time. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 16: 81-87.
- CHIARI, E.; MARQUES DE ARAUJO, S. & CARNEIRO, M., 1980. Meios empobrecidos em nutrientes na diferenciação epimastigota-tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*. VII Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu, MG, B141.
- DEANE, M. P.; BRITO, T. de & DEANE, L. M., 1963. Pathogenicity to mice of some strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from wild animals of Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 5: 225-235.
- DEANE, M. P.; MANGIA, R. H. R.; PERIERA, N. M.; MOMEN, H.; GONÇALVES, A. M. & MOREL, C. M., 1984a. *Trypanosoma cruzi* strain selection by different schedules of mouse passage of an initially mixed infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79 (4): 495-497.
- DEANE, M. P.; SOUZA, A. M.; PERIERA, N. M.; GONÇALVES, A. M.; MOMEN, H. & MOREL, C. M., 1984b. *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analyses. *J. Protozool.*, 31 (2): 276-280.
- DVORAK, J. A.; HALL, T. E.; CRANE, M. S. T.; ENGEL, J. C.; Mc DANIEL, J. P. & CHIEGAS, R., 1982. *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. *J. Protozool.*, 29 (3): 430-437.
- DVORAK, J. A.; HARTMAN, D. L. & MILES, M. A., 1980. *Trypanosoma cruzi*: correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. *J. Protozool.*, 27 (4): 472-474.
- DOYLE, P. S.; DVORAK, J. A. & CRANE, J. C., 1984. *Trypanosoma cruzi*: quantification and analysis of the infectivity of cloned stocks. *J. Protozool.*, 31 (2): 280-283.
- ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S. & DVORAK, J. A., 1985. Clones derived from chronic chagasic patients. II. Quantitative analysis of the intracellular cycle. *J. Protozool.*, 32 (1): 80-83.
- ENGEL, J. C.; DVORAK, J. A.; SEGURA, E. L. & CRANE, M. S. T. J., 1982. *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid medium. *J. Protozool.*, 29 (4): 555-560.
- GARCIA, E. S. & DVORAK, J. A., 1980. Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31 (2): 259-262.
- GOBLE, F. C., 1951. Studies on experimental Chagas' disease in mice in relation to chemotherapeutic testing. *J. Parasitol.*, 37: 408-414.
- GOLDBERG, S. S. & CHIARI, E., 1980. Growth and isolation of single colonies of *Trypanosoma cruzi* on solid medium. *J. Parasitol.*, 66 (4): 677-679.
- KAGAN, I. G. & NORMAN, L., 1960. Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi*. I. Susceptibility of CFW stock mice for the "Tulahuen" strain of *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.*, 107: 165-167.
- KOBERLE, F., 1968. Chagas' disease and Chagas' syndrome: The pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.*, 6: 63-116.
- LAMBRECHT, F. L., 1965. Biological variation in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' disease. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 7: 346-352.
- LANA, M., 1986. *Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice e Berenice-78 de Trypanosoma cruzi isoladas da mesma paciente em diferentes períodos*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81 (3): 247-253.
- MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. & SIMPSON, L., 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 77 (11): 6910-6814.
- NORMAN, L. & KAGAN, I. G., 1960. Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi*. II. Acquired immunity in mice infected with avirulent american strain of *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.*, 107: 168-174.

- PACKCHANIAN, N. & SWEETS Jr., H. H., 1947. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* after cultivation for 13 years *in vitro* without animal passage. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 64 (1): 169-173.
- PEREIRA DA SILVA, L. H. & NUSSENZWEIG, V., 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.*, 20 (3): 191-208.
- PIZZI, T., 1957. Immunologia de la enfermedad de Chagas. Monografia. Colecion de Monografia Biologicas de la Universidad de Chile.
- PIZZI, T. & PRAGER, R., 1952. Inmunidad a la sobreinfeccion inducida mediante cultivo de *Trypanosoma cruzi* de virulencia atenuada. *Bol. Inf. Paras. Chilenas.*, 7: 20-21.
- POSTAN, M.; DVORAK, J. A. & Mc DANIEL, J. P., 1983. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones inbred mice. I. Comparison of the course of infection of C₃H/HEN⁻ mice with two clones isolated from a common source. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32 (3): 497-506.
- ROMANHA, A. J., 1982. *Heterogeneidade isoenzimática em Trypanosoma cruzi*. Tese. Universidade Federal de Minas Gerais. 110 p.
- ROMANHA, A. J.; DA SILVA PEREIRA, A. A.; CHIARI, E. & KILGOUR, V., 1979. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62: 139-142.
- SCIENTIFIC WORKING GROUP OF CHAGAS' DISEASE, 1979. Second Meeting of the Immunology Component of the Scientific Working Group on Chagas Disease. UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease, TDR/IMMCHA - SWG (2)/79.3.
- TAKEDA, G. K. F.; CHIARI, L. & CAMPOS, C. A. M., 1980. Alguns caracteres biológicos da cepa Yr de *Trypanosoma cruzi*. V Congresso Brasileiro de Parasitologia. FIOCRUZ. Rio de Janeiro.
- TEIXEIRA, A. R. L., 1979. Chagas' Disease: Trends in immunological research and prospects for immunoprophylaxis. *Bull. W. H. O.*, 57: 697-710.