

## AÇÃO DO ASPERGILLUS SP. SOBRE O TRYPANOSOMA CRUZI "IN VITRO"

O. CÁCERES (1), M. C. S. SALGUEIRO (2), E. KIMURA (3), G. MORAES (4)  
e T. A. R. MACHADO (5)

### RESUMO

*Aspergillus sp.* quando cultivado em meio líquido (Sabouraud), secreta substância letal para formas de cultura do *Trypanosoma cruzi*. Verificamos os seguintes efeitos sobre o *T. cruzi* quando em presença do filtrado obtido pelo crescimento do fungo naquele meio: lise dos epimastigotas e inibição de incorporação de timidina ( $^3\text{H}$ ) por estas formas; inviabilidade das formas sanguícolas em meio LIT e perda da infectividade desses tripomastigotas sanguícolas para células HeLa e camundongos.

### INTRODUÇÃO

Embora a doença de Chagas seja conhecida há várias décadas, ela continua sendo uma das parasitoses para a qual são poucos os recursos terapêuticos. Os quimioterápicos normalmente usados têm efeitos discutíveis, existindo muitas controvérsias quanto às suas utilidades práticas<sup>6,7,21</sup>. Entre as drogas que apresentaram alguma atividade na doença de Chagas estão a Fumagilina<sup>1,4</sup> a Stilomicina<sup>10,18</sup>; o Suramin; Nivaquina<sup>11</sup>; Aminoquinoleínas<sup>12</sup>; Aureomicina<sup>13</sup>; Nitrofuranos<sup>5,16</sup>; Acromicina<sup>19</sup>; Spirotrypan<sup>21</sup>; Iloticina ou Eritromicina<sup>23</sup>. Entre esses, alguns apresentaram resultados animadores durante a fase aguda da doença<sup>7</sup>, porém o mesmo não acontece na fase crônica da moléstia.

Neste trabalho, apresentamos alguns resultados preliminares da ação de um fungo contaminante de cultura, *Aspergillus sp.*;<sup>3,14,15</sup> com a propriedade de inibir o crescimento e lisar as formas de cultura do *T. cruzi* e tornar avirulentas as formas sanguíneas para camundongos.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Camundongos** — Os camundongos utilizados, apresentavam 16 a 20 g de peso corporal e 40 a 60 dias de idade no início dos experimentos.

**T. cruzi** — O *T. cruzi* utilizado foi o de cepa Y<sup>17</sup>, mantido em cultura em meio LIT (Liver Infusion and Tryptose) pH 7,2 a 28°C, a mais de 20 anos. As contagens dos tripanosomas de cultura foram feitas em câmara de Neubauer. As formas sanguíneas foram contadas em gota espessa<sup>7</sup>. As lâminas com esfregaço de cultura de *T. cruzi* foram coradas conforme o método de Leishman.

**Aspergillus sp.** — O *Aspergillus sp.* contaminante de uma cultura de *T. cruzi* em meio LIT pH 7,2 foi isolado em meio de ágar-Sabouraud, classificado e cultivado em Sabouraud-líquido. Após 15 dias à temperatura ambiente, a cultura foi filtrada em Seitz e dividida em 4 amostras, denominadas: A, B, C e D.

**Cultura de Tecido** — As células HeLa foram cultivadas e mantidas em estufa a 33°C<sup>20</sup>

Este trabalho foi patrocinado pela FAPESP, CNPQ e FEMESM

- (1) Prof. Titular de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Marília
- (2) Acadêmica — 6ª anista da Faculdade de Medicina de Marília
- (3) Profª Assist. do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP
- (4) Prof. Assist. do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Marília
- (5) Acadêmico — 3ª anista da Faculdade de Medicina de Marília

Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Medicina de Marília — C.P. 451 — São Paulo, Brasil  
Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo — C.P. 20.780 — São Paulo — Brasil

e infectadas com formas metacíclicas do *T. cruzi*, provenientes de cultura em meio HIL pH 6,7.

**Atividade proteolítica** — A presença de proteases secretadas pelo *Aspergillus* sp., no seu meio de cultura, foi determinada pelo método da Azocaseína<sup>9</sup>.

**Experimentos** — A amostra A foi subdividida em 6 frações de 200 ml cada uma, aqui representada em algarismos romanos. A fração I foi utilizada em diferentes proporções (de 1,6 a 13% V/V) nas culturas de *T. cruzi* em meio LIT pH 7,2 a 28°C. A fração II foi adicionada na proporção de 20% (V/V) em cultura de *T. cruzi* em meio LT pH 7,2, medindo-se a incorporação de Timidina (<sup>3</sup>H), Uridina (<sup>3</sup>H) e Leucina (<sup>3</sup>H) pelos flagelados. Foram feitas duas culturas em LIT pH 7,2 com inóculo inicial de  $9 \times 10^6$  *T. cruzi*/ml, incubados durante 20 horas a 28°C, contendo uma delas 20% de fração II (cultura A) e a segunda 20% de meio Sabouraud (cultura S). Após esse período de incubação, foi feita a contagem dos flagelados. A cultura S apresentou  $15 \times 10^6$  *T. cruzi*/ml e a cultura A,  $6 \times 10^6$  *T. cruzi*/ml. A cultura S foi distribuída em 3 frascos com 3 ml cada uma (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e S<sub>3</sub>) e a cultura A em 6 frascos com 3 ml cada uma (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>) e (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>), respectivamente. As frações L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub> foram centrifugadas, lavadas com salina estéril e os sedimentos ressuspensos em meio LIT pH 7,2 íntegro. A seguir foi adicionada solução de Timidina (<sup>3</sup>H) nas culturas S<sub>1</sub>, A<sub>1</sub> e L<sub>1</sub>; Uridina (<sup>3</sup>H) em S<sub>2</sub>, A<sub>2</sub> e L<sub>2</sub> e Leucina (<sup>3</sup>H) em S<sub>3</sub>, A<sub>3</sub> e L<sub>3</sub> para uma atividade específica de 9 µc/ml em todos os frascos. Após 3 horas de incubação a 28°C, as culturas foram centrifugadas a 3.000 rpm 4°C (Centrifuga Sorvall RC-2B) por 10 minutos e lavadas com salina 0,9% por três vezes. A seguir foi adicionado ácido tricloroacético 5% e as suspensões foram congeladas e descongeladas 3 vezes em banho de gelo seco, filtradas em membranas de Millipore, plaqueadas e a radioatividade contada no cintilador LS-100 da Beckman.

A fração III foi aquecida a 100°C de 1 a 60 minutos e a seguir utilizada em culturas de *T. cruzi* em meio LIT pH 7,2 na proporção de 10% (V/V).

A fração IV foi adicionada em cultura de *T. cruzi* em meio HIL 6,7, contendo  $10 \times 10^7$  flagelados/ml com 40% de formas tripomasti-

gotas na proporção de 10% (V/V), incubando-se a preparação a 28°C durante 4 horas. A seguir a cultura (10 ml) foi centrifugada a 3.000 rpm a 4°C (Sorvall RC-2B), por 10 minutos e lavada com salina 0,9% estéril, por três vezes. Os flagelados foram ressuspensos em salina (10 ml). Dessa preparação adicionamos 0,1 ml em cada uma das dez culturas de células HeLa, mantidas a 33°C em laminula fluante de 1 a 5 dias. Diariamente duas laminulas eram lavadas com salina a 0,9%, coradas e fixadas em lâminas de vidro, pesquisando-se a presença de células infectadas ao exame microscópico. Paralelamente, realizamos o mesmo experimento com a fração IV aquecida a 100°C durante 60 minutos.

A fração V foi adicionada em meio LIT pH 7,2 a 28°C a 10% (V/V) contendo sangue de camundongos infectados a 6 dias e que apresentavam intensa parasitemia. Estas culturas, que apresentavam inicialmente  $16 \times 10^3$  tripomastigotas/ml, foram observadas durante 6 dias consecutivos, fazendo-se as contagens de flagelados diariamente. Culturas controles sem a fração V e com a fração V aquecida a 100°C durante 1 hora, foram igualmente observadas.

A fração VI foi adicionada em sangue de camundongos, contendo  $9 \times 10^4$  flagelados por ml, na proporção de 10% (V/V). Esta preparação, após permanecer por 24, 48 e 72 horas a 10°C, para prevenir o crescimento de eventuais bactérias contaminantes, foi injetada em 18 camundongos divididos em 3 lotes, A, B, e C. No lote A, dois camundongos receberam a preparação mantida a 10°C por 24 horas, dois a de 48 horas e dois a de 72 horas. Outro lote, B, de 6 camundongos recebeu igual tratamento com sangue infectado com *T. cruzi* com a adição da fração VI aquecida a 100°C durante 60 minutos. Em todos os animais foi injetado aproximadamente  $2 \times 10^3$  flagelados. Sangue de camundongo, não tratado com a fração VI e obedecendo as mesmas condições anteriores foi injetado em um terceiro lote (C) de 6 camundongos. Os camundongos dos lotes A e B foram sacrificados 30 dias após a infecção. O sangue de cada camundongo foi reinoculado em dois novos camundongos.

A amostra B (4 litros) foi liofilizada (Liofilizador Virtis) e a seguir utilizada em culturas de *T. cruzi* em meio LIT pH 7,2 para concentração final de 1 mg de liofilizado por

ml de meio. Parte dessa amostra foi dissolvida em água aquecida a 100°C durante 60 minutos antes da sua adição nas culturas.

As amostras C e D foram extraídas (5x) com clorofórmio e éter etílico, respectivamente, na tentativa de obtenção do "princípio ativo". Ambas foram separadas em funil e cristalizadas à vácuo, a primeira a 50°C e a segunda a 45°C. A seguir foram dissolvidas em glicerol, para concentração final de 0,1 mg/ml e utilizadas em culturas de *T. cruzi* em meio LIT pH 7,2. As atividades proteolíticas das amostras A, B, C e D foram medidas pelo método de azocaseína<sup>9</sup>, fazendo preparações que continham 200 µl de azocaseína (5,25 mg/ml de água), 100 µl de tampão Tris-HCl 0,5M, pH 7,4 e 1,8 ml de amostra (A, B, C ou D). Após incubação a 37°C por 30 minutos, a reação foi interrompida por adição de 150 µl de ácido tricloroacético 70% e deixada em repouso em banho de gelo por 15 minutos. A seguir foi filtrada em Whatmann n.º 1, neutralizada com

200 µl de NaOH 10 N, permanecendo em repouso por 10 minutos e a densidade óptica lida em 440 nm no Espectrofotômetro EEL.

**Reagentes** — Os reagentes utilizados nestes experimentos foram adquiridos da Merck A.G. Darmstadt, exceção feita aos compostos radioativos, que foram obtidos na Volk Radiochemical Company.

## RESULTADOS

**Aspecto geral do *Aspergillus* sp.** — Na Fig. 1 podemos ver o aspecto geral do *Aspergillus* sp., em meio de ágar-Sabouraud. Quando o fungo foi cultivado em Sabouraud-líquido à temperatura ambiente da ordem de 20°C o seu crescimento foi muito rápido, ocupando toda a superfície líquida, quatro dias após o inóculo. A ação letal sobre o *T. cruzi* de cultura, começou aparecer por volta do 8.º dia, atingindo a atividade máxima por volta do 15.º dia, após o inóculo.

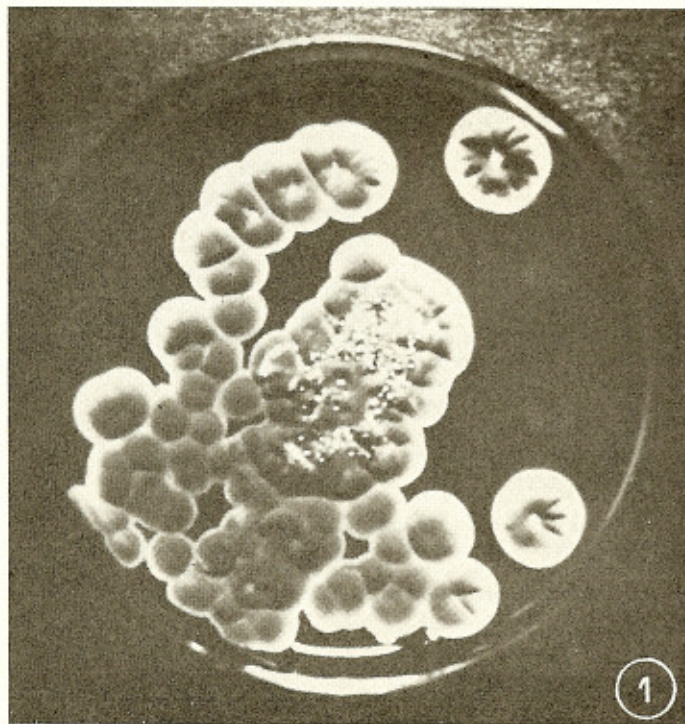


Fig. 1 — Aspecto geral do fungo contaminante *Aspergillus* sp. após 120 horas do inóculo em meio ágar-Sabouraud

**Atividade do *Aspergillus* sp. "in vitro"** — Como pode ser observado na Fig. 2, a atividade

do filtrado (fração I) sobre o crescimento do *T. cruzi* foi bastante drástica, diminuindo ra-



pidamente o número de flagelados nas culturas. Com 1,6% do filtrado (V/V), houve um período de inibição de crescimento, seguido de multiplicação dos flagelados. Com 3,3%, a inibição foi completa, notando-se alterações morfológicas profundas após 48 horas de ação do filtrado A. Na Fig. 3 podemos observar o aspec-

to dos tripanosomas após a ação da fração I do filtrado A em diferentes intervalos de tempo, notando-se alterações morfológicas e diminuição do número de flagelados. Após 72 horas de incubação a 28°C, a lise dos tripanosomas foi completa com 10% de filtrado A.

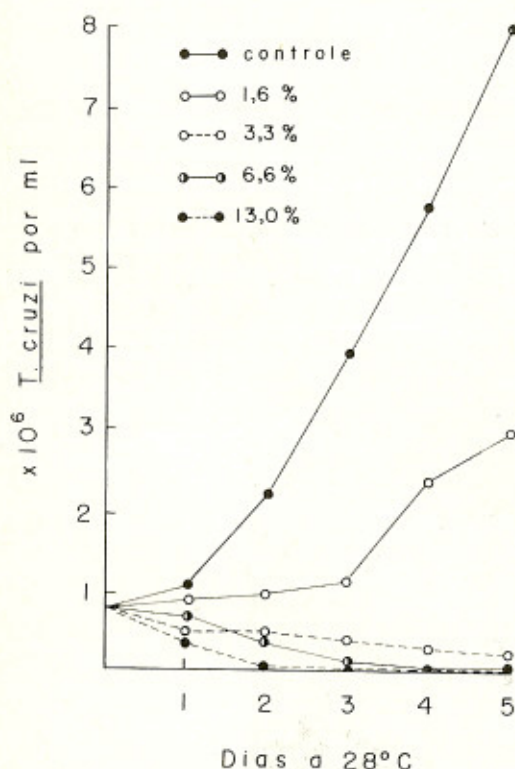


Fig. 2 — Efeito do filtrado A no crescimento do *T. cruzi* em fase de multiplicação exponencial em meio LIT, pH 7,2. As concentrações do filtrado variaram de 1,6 a 13% em relação ao meio LIT (V/V). Neste caso, observou-se clara diminuição do número de flagelados, a medida que aumentamos o volume do filtrado A.

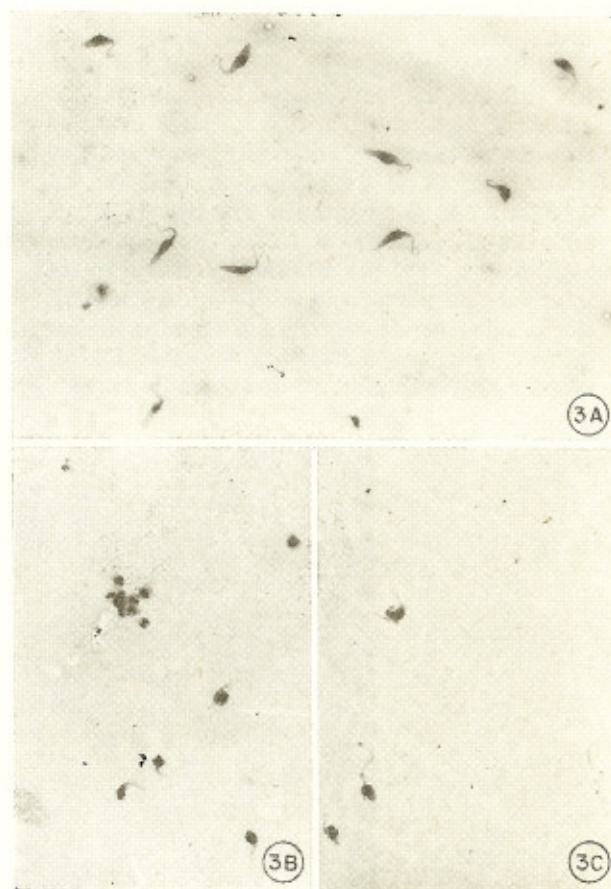


Fig. 3 — Aspecto geral da cultura do *T. cruzi* em meio LIT, pH 7,2 na presença e na ausência do filtrado A. 3A) — Cultura normal após 48 horas de incubação a 28°C. 3B) — Após 24 horas de incubação com 10% de filtrado A. 3C) — Após 48 horas de incubação com 10% de filtrado A. Em 3C pode ser observado que os tripanosomas sofreram degeneração quase completa. Coloração Leishman com 1000 X de aumento.

**Incorporação de timidina (<sup>3</sup>H), uridina (<sup>3</sup>H) e leucina (<sup>3</sup>H) pelo *T. cruzi* tratado com o filtrado A (fração II) em meio LIT pH 7,2** — Como pode ser observado na Tabela I, a incorporação desses precursores de DNA, RNA e proteínas, foi fortemente inibida na presença do filtrado. Porém, após a lavagem dos flagelados da cultura A com salina e reincuba-

ção em meio LIT íntegro, somente a incorporação de timidina (<sup>3</sup>H) continuou inibida (L<sub>1</sub>); a de uridina (<sup>3</sup>H) e leucina (<sup>3</sup>H) voltaram ao normal; (L<sub>2</sub>) e (L<sub>3</sub>), respectivamente. Neste caso, utilizamos volumes de filtrado A (fração II) em proporção de 20% (V/V), com a finalidade de diminuir o tempo para obtenção de efeito tripanocida. Procedendo dessa forma

podemos medir a incorporação dos radioisótopos durante a fase de crescimento exponencial onde a diferença de incorporação dos precursores marcados, pelo flagelado tratado e controle, é mais acentuada.

TABELA I

Efeito do filtrado A (fração II) na incorporação de precursores de DNA, RNA e proteínas. (S) cultura com 20% de Sabouraud-líquido (V/V). (A) cultura com 20% de filtrado A, fração II (V/V) e (L) cultura com 20% de filtrado A, fração II (V/V). Após 20 horas de incubação a cultura L foi centrifugada, lavada com salina e ressuspensa em meio novo (LIT pH 7,2)

Precusores marcados	cpm por 10 <sup>6</sup> T. cruzi								
	S <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	L <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	A <sub>2</sub>	L <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	A <sub>3</sub>	L <sub>3</sub>
Timidina	433	11	180	—	—	—	—	—	—
Uridina	—	—	—	80	10	81	—	—	—
Leucina	—	—	—	—	—	—	8	5	8
% inibição de incorporação	—	97	59	—	88	0	—	32	0

**Efeito da temperatura sobre a atividade lítica do filtrado A (fração III) a 10% (V/V) em cultura de T. cruzi em meio LIT pH 7,2** — A fração III do filtrado A foi dividida em 6 partes iguais e aquecidas em banho de água a 100°C, por 1, 5, 10, 30 e 60 minutos. Uma das frações não foi aquecida. Os resultados expressos na Tabela II, mostram que a atividade lítica do filtrado A sobre o T. cruzi de cultura em meio LIT pH 7,2 permaneceu quase inalterada mesmo com aquecimento de uma hora a 100°C.

TABELA II

Efeito da temperatura na atividade inibidora do filtrado A (fração III) sobre o crescimento do T. cruzi em meio LIT pH 7,2 com 10% de filtrado (V/V)

Dias a 28°C	Tempo de aquecimento a 100°C (minutos)						
	0	1	5	10	30	60	controle
	crescimento em milhões de T. cruzi/ml						
1	30	30	30	30	30	30	30
3	2	5	8	10	15	19	52
5	0	0	0	2	4	5	86

**Atividade do filtrado A (fração IV) em cultivo de tecido infectado com T. cruzi** — Os tripanosomas de cultura HIL pH 6,7 com 40%

de formas tripomastigotas, previamente tratados com 10% de filtrado A durante 4 horas, tornaram-se avirulentos para células de cultivo de tecido (células HeLa), mesmo quando esse filtrado foi aquecido a 100°C durante 60 minutos. A cultura controle apresentou uma proporção de 1 célula infectada para cada 30 normais, enquanto que as culturas com formas pré-tratadas não apresentaram células infectadas em 2.000 campos microscópicos médios examinados.

**Viabilidade das formas sanguíneas de T. cruzi em meio LIT pH 7,2 contendo 10% de filtrado A (fração V) (V/V)** — Sangue de camundongos (0,2 ml) com parasitemia de  $8 \times 10^4$  tripanosomas/ml foi inoculado em meio LIT pH 7,2 contendo 10% de filtrado para uma concentração final de  $16 \times 10^3$  flagelados/ml. Após 4 dias de incubação a 28°C, encontramos tripanosomas na forma de amastigotas na cultura controle e nenhuma forma nas culturas com filtrado A. Na cultura controle apareceram formas epimastigotas em divisão após 4 dias de incubação. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela III.

TABELA III

Efeito do filtrado A (fração V) sobre o T. cruzi sanguínea, em meio LIT pH 7,2 a 10% (V/V). A — Sangue infectado + LIT pH 7,2. B — Sangue infectado + LIT pH 7,2 + filtrado A. C — Sangue infectado + LIT pH 7,2 + filtrado A pré-aquecido a 100°C por 60 minutos

Dias a 28°C	Crescimento: nº de T. cruzi/ml (x 10 <sup>3</sup> )		
	A	B	C
1	16	11	12
3	16	2	3
6	21	0	0

**Avirulência das formas sanguíneas do T. cruzi tratadas com filtrado A (fração VI)** — Como pode ser visto na Tabela IV, sangue de camundongos com  $9 \times 10^4$  tripanosomas/ml, previamente tratado com filtrado A (aquecido ou não a 100°C por 60 minutos) durante 24, 48 e 72 horas a 10°C, mostrou-se inócuo quando injetado em camundongos, não se constatando a presença de flagelados no sangue, 7, 15 e 30 dias após a infecção. Os camundongos do grupo controle morreram todos entre o 9.º e 15.º dia após a infecção. Os camundongos

dos grupos A e B foram sacrificados 30 dias após a infecção. O sangue desses camundongos subinoculado em novos camundongos não provocou infecção.

TABELA IV

Avirulência do *T. cruzi* sanguícola, previamente tratado com filtrado A (fração VI) e mantido a 10°C, durante 24, 48 e 72 horas. Um total de 18 camundongos foi dividido em 3 lotes (A, B e C) com 6 animais cada um. Os lotes A e B foram inoculados com tripanosomas previamente tratados com filtrado A natural e aquecido a 100°C, respectivamente. O lote C é o controle. Cada subgrupo de A, B e C tem 2 camundongos cada um

Tempo de incubação a 10°C (horas)	Parasitemia: 7 dias após a infecção em nº de <i>T. cruzi</i> /ml de sangue (x 10 <sup>4</sup> )								
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
24	0	—	—	0	—	—	9	—	—
48	—	0	—	—	0	—	—	3	—
72	—	—	0	—	—	0	—	—	4

**Efeito do filtrado B (amostra liofilizada) sobre o *T. cruzi* de cultura em meio LIT pH 7,2**

— Esta amostra dissolvida em água (5 mg/ml), foi adicionada em cultura de *T. cruzi* em meio LIT pH 7,2 para uma concentração final de 1 mg de liofilizado por ml de meio. O liofilizado determinou a lise total dos flagelados após 24 horas de incubação a 28°C, mesmo quando previamente aquecido a 100°C durante 60 minutos.

**Efeito dos filtrados C e D (extração com clorofórmio e éter etílico) sobre o *T. cruzi* de cultura em meio LIT pH 7,2** — As extrações feitas com clorofórmio e éter etílico, aquecidos ou não a 100°C, também apresentaram atividade lítica sobre os flagelados de cultura em meio LIT pH 7,2. Contudo, a extração com clorofórmio foi a mais ativa, alterando bastante a morfologia dos tripanosomas em apenas 5 horas de ação e lisando totalmente a cultura em 24 horas de incubação a 28°C. A extração com éter etílico apresentou atividade inferior a do filtrado A.

**Atividade proteolítica das amostras A, B, C e D** — Como pode ser observado na Tabela V, as amostras A e B apresentaram atividade azocaseinólítica. Estas amostras quando aquecidas a 100°C durante 60 minutos perderam essa capacidade. Nas amostras C e D essa atividade foi medida nas fases clorofórmio e éter

etílico e nas suas respectivas fases aquosas. Constatamos efeito proteolítico somente nas frações aquosas.

TABELA V

Efeito proteolítico das amostras A, B, C e D sobre a azocaseína em unidades de absorvância a 440 nm. A absorvância da amostra A está expressa em unidades/ml de filtrado A, as de B, C e D por mg de liofilizado ou precipitado.

Amostras	A	B	C	D
Absorvância	0,300	1,200	0,0	0,0

As amostras A e B, quando pré-aquecidas apresentaram absorvância igual a zero, enquanto que as fases aquosas das extrações C e D tiveram absorvâncias iguais a 0,280 e 0,290 unidades por ml de filtrado, respectivamente.

**DISCUSSÃO**

O *Aspergillus* sp. utilizado neste trabalho, apresenta algumas características, tais como, morfologia, coloração e crescimento, semelhantes ao *Aspergillus fumigatus*. Contudo, deve tratar-se de um mutante deste, ou mesmo de um outro fungo desse grupo ainda não caracterizado. É fato conhecido de longa data que fungos do grupo *Aspergillus* produzem dezenas de substâncias com efeito antimicrobiano de largo espectro, atuando contra vírus, bactérias, protozoários e células tumorais<sup>6,14, 15,22</sup>. Além desses antibióticos, esse fungo também secreta proteases, quando cultivado em meio líquido. Entre os antibióticos produzidos pelo *Aspergillus fumigatus*, com ação anti-protozoário, são mais conhecidos a fumagilina<sup>1,4</sup> e a tripacidina<sup>2</sup>. Além desses, são conhecidos a fumigatina, a fugamicina e o ácido aspergílico, cujos espectros de ação não estão bem caracterizados. Desses antibióticos apenas a fumagilina<sup>1,4</sup> e a tripacidina<sup>2</sup> foram utilizadas na quimioterapia experimental da Doença de Chagas. Como a fumagilina é termolábil e o nosso material é termoestável, fica excluída a possibilidade de ser esse o único antibiótico, responsável pela lise do *T. cruzi* “in vitro” em nossa preparação. Quanto a tripacidina, ficou constatado que apresenta atividade contra *T. cruzi* apenas “in vitro”, não estando bem caracterizado seu papel “in vivo”.

Os resultados de nosso experimento sugerem a presença de alguma substância tripano-

cida, excretada pelo *Aspergillus* sp. durante o seu crescimento e que apresentou características de termoestabilidade até 100°C e é pouco solúvel em éter etílico e bastante solúvel em clorofórmio.

O efeito lítico observado, poderia ser devido às proteases excretadas por esse fungo, porém, como as preparações aquecidas por 1 hora a 100°C e extraídas com clorofórmio, também provocam a lise dos tripanosomas e não apresentam atividade azocaseinolítica, podemos excluir essa possibilidade. Já a inibição de incorporação de timidina (<sup>3</sup>H) pelo *T. cruzi*, sugere que essa substância tem algum efeito na síntese de DNA desse flagelado. Contudo, o mais interessante do ponto de vista prático, é o fato das formas tripomastigotas tornarem-se avirulentas para células de cultivo de tecido e para camundongos, quando pré-incubadas com o filtrado A. Sabendo-se que as infecções com as formas tripomastigotas sanguíneas, provocam intensa parasitemia em camundongos, 5 a 7 dias após a inoculação e a morte durante os 15 primeiros dias, o fato de não ter sido constatada infecção dos camundongos 7 dias após o inóculo e a sobrevivência de todos após 15 dias é um dado promissor. Isto, sem dúvida, abre uma perspectiva para o campo da imunização contra a Doença de Chagas.

Quanto ao efeito terapêutico dessa preparação para camundongos infectados com *T. cruzi*, nossos resultados são preliminares e ainda não permitem chegar a uma conclusão, ficando esse material para uma futura publicação.

#### SUMMARY

##### Action of *Aspergillus* sp. on *Trypanosoma cruzi* «in vitro»

*Aspergillus* sp. when cultured in a liquid medium (Sabouraud), secretes a substance which is lethal to culture forms of *Trypanosoma cruzi*. Filtrates of culture media in which *Aspergillus* sp. had been grown added to *T. cruzi* cultures produced the following effects: lysis of epimastigotes and inhibition of the <sup>3</sup>H thymidine uptake by these forms, inviability of blood stream forms in LIT medium and loss of infectivity of these trypanomastigotes for HeLa cells and for mice.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARMLEDER, H. & JARPA, A. — Ensayos de quimioterapia en la Enfermedad de Chagas experimental. IX — Fumagilina. *Bol. Chil. Parasitol.* 7: 38-39, 1952.
2. BALAN, J.; EBRINGER, L. & NEMEC, P. — Trypacidin a new antiprotozoal antibiotic. *Naturwissenschaften* 5: 227-237, 1964.
3. BALAN, J.; EBRINGER, L. & NEMEC, P. — Occurrence of anti-protozoal antibiotics in lower fungi. *Progr. Antimicrob. Anticancer Chemother. Proc. Int. Congr. Chemother.* 1: 489-491, 1970.
4. BEKKER, Z. E. — Fumagillin production by a variety of *A. fumigatus*. *Antibiotiki* 2: 14-16, 1957.
5. BRENER, Z. — A atividade terapêutica da furaltadone, furazolidone e furadantina na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. *Hospital (Rio)* 60: 947-952, 1961.
6. BRENER, Z. — Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. *Adv. Pharmacol. & Chemother.* 13: 1-44, 1975.
7. BRENER, Z. — Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4: 389-396, 1962.
8. CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L. V. & FERNANDES, J. F. — Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Protozool.* 14: 447-450, 1967.
9. CHARNEY, J. & TOMARELLI, R. M. — A corollimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.* 171: 501-505, 1947.
10. FERNANDES, J. F.; PEREIRA, J. P. M. & PEREIRA DA SILVA, L. H. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. IV — Effect of the aminonucleoside of stylomycin on mouse infections. *Exptl. Parasitol.* 8: 496-501, 1959.
11. GALLIARD, H. & BOUTET, R. — Modifications de l'évolution et de la virulence d'une souche de *Trypanosoma cruzi* Chagas sous l'action de divers produits chimiotherapiques et antibiotiques. *Ann. Parasitol. Hum. et Comp.* 26: 5-18, 1951.
12. GOBLE, F. C. — Studies on experimental Chagas's in mice in relation to chemotherapeutic testing. *J. Parasitol.* 37: 408-414, 1951.
13. JARPA, A. — Ensayos de quimioterapia del *Trypanosoma cruzi*. I — Aureomicina. *Bol. Chil. Parasitol.* 4: 49-50, 1949.
14. KUBEKA, W. — *Aspergillus* Revision. *Oesten, Apoth. Ztg.* 27: 681-684, 1973.
15. KUTKOVA, M. & BETINA, V. — Chromatographic study of antibiotics produced by strains of

- the species *A. fumigatus*. *Chem. Zvest.* 20: 439-445, 1966.
16. PACKCHANIAN, A. — Chemotherapy of experimental Chagas disease with thirty antibiotics. *Amer. J. Trop. Med.* 2: 243-264, 1953.
  17. PEREIRA DA SILVA, L. H. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol. São Paulo* 20: 191-201, 1953.
  18. PEREIRA DA SILVA, L. H. & KIRCHNER, E. — Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection in tissue culture. A comparative study on the action of primaquine, carbidium sulphate and the aminonucleoside of stylomycin. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4: 16-23, 1962.
  19. PORTER, N. J. — Achromycin: A new antibiotic having trypanocidal properties. *Antibiotics & Chemother.* 2: 409-410, 1952.
  20. RIBEIRO, L. V.; KIMURA, E. & FERNANDES, J. F. — Factors affecting the density of intracellular infection of tissue culture cells by *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 29: 295-308, 1969.
  21. ROMANA, C. — Ensayos de antibioticos y quimioterapicos en enfermedad de Chagas. *An. Inst. Med. Reg.* 3: 255-263, 1953.
  22. SEMENOV, M. N. — An antibiotic produced simultaneously with fumagillin. *Antibiotiki* 10: 219-222, 1965.
  23. TORREALBA, J. F. — La iloticina y la enfermedad de Chagas. Otros experimentos con el mismo antibiótico. *Gac. Med. (Caracas)* 61: 309-313, 1953.

Recebido para publicação em 23/6/1977.