

ALTERAÇÕES HIPOTALÂMICAS NA FASE CRÔNICA DA MOLÉSTIA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

Reynaldo de BRITTO-COSTA (1)

R E S U M O

Em trabalho anterior o Autor verificou, em material humano, além de uma desnervação do núcleo supraóptico do hipotálamo anterior, um aumento da substância Gomori-positiva ("neurosecreção") em indivíduos chagásicos crônicos. Em vista das dificuldades inerentes ao material utilizado (material de autópsia) impunha-se uma investigação de caráter experimental.

No presente trabalho o Autor estuda aspectos funcionais e morfológicos do hipotálamo anterior de ratos experimentalmente infetados pelo *T. cruzi*. Os resultados mostram que estes animais apresentam alterações na homeostase alimentar expressas por uma baixa ingestão de cloreto de sódio em condições habituais ou após depleção do sódio pela hidroclorotiazida ou após jejum. Além disso, constatou, como no homem, um aumento da substância Gomori-positiva e uma desnervação no núcleo supraóptico.

INTRODUÇÃO

BRITTO-COSTA & col.⁵ estudando o hipotálamo anterior na moléstia de Chagas, constataram, em material humano, além de uma desnervação do núcleo supraóptico, um aumento da substância Gomori-positiva ("neurosecreção") em indivíduos chagásicos crônicos. Dadas porém, as dificuldades inerentes ao material utilizado (material de autópsia) impunha-se uma investigação de caráter experimental.

No presente trabalho estuda-se o hipotálamo anterior de ratos experimentalmente infetados pelo *T. cruzi*, tanto morfológicamente como funcionalmente, por meio do método de Gomori para neurosecreção, bem como, através da medida da ingestão diária de sódio, nas condições habituais, ou após uma depleção deste ion provocada pela hidroclorotiazida ou após jejum.

MATERIAL E MÉTODOS

Material — Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar, do sexo masculino.

Métodos — A — *Infecção experimental dos ratos pelo T. cruzi*

Cem ratos, com 20 a 22 dias de idade, pesando 30 g em média, foram inoculados, por via peritoneal, com 0,1 ml de sangue contendo 150000 tripanosomas (*T. cruzi*). (A contagem dos tripanosomas se fez pela técnica de Pizzi ligeiramente modificada por BRENNER⁴). Este sangue foi obtido por punção cardíaca de ratos usados na repicagem da cepa Y (isolada de um caso agudo de moléstia de Chagas por FREITAS & col.⁸), mantida no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Todos os animais inoculados apresentaram parasitemia. Esta foi observada no oi-

Trabalho realizado com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Biológicas 69/335)

(1) Livre-Docente do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, Brasil (Serviço do Prof. Fritz Köberle)

tavo e no décimo quinto dias após a inoculação e variou de 1680 a 7140 tripanosomas por milímetro cúbico de sangue.

A mortalidade, após trinta dias de inoculação, foi de 35%.

Passados seis meses da infecção, 49 dos 65 animais sobreviventes, foram utilizados em nossas pesquisas.

B — *Estudo das alterações hipotalâmicas*

Esse estudo foi realizado por meio de provas funcionais e de cortes microscópicos seriados do hipotálamo anterior e consistiu do seguinte:

- 1 — *contrôle diário de:* a) *ingestão de água*, b) *ingestão de uma solução de cloreto de sódio a 1,5%*, c) *ingestão de ração* e d) *diurese*

O papel do hipotálamo na regulação da ingestão de água e alimentos tem sido estudado por vários Autores, todos demonstrando sua importância na regulação do equilíbrio hídrico (ANTUNES-RODRIGUES^{1,2}, faz excelente revisão sobre o assunto).

Pesquisas recentes (COVIAN & ANTUNES-RODRIGUES⁶; ANTUNES-RODRIGUES^{1,2}, demonstraram que a ingestão de cloreto de sódio é controlada por um mecanismo neurogênico, sem interferência da adrenal, cujos centros estão localizados no hipotálamo. Utilizando um aparelho estereotáxico os referidos Autores determinavam, através de eletrodos implantados no hipotálamo de ratos, lesões eletrolíticas que ocasionavam uma queda ou um aumento na ingestão de sódio pelos animais. A adrenal não interferia com a resposta obtida após a lesão hipotalâmica. Segundo ainda observações do mesmo Autor, as funções básicas do hipotálamo seriam inerentes a ele, porém abertas a modulações de informações vindas de outras estruturas (área septal, complexo amigdalóide e outras).

Em vista destes achados, consideramos de valor o controle diário da ingestão de água, da ingestão de uma solução de cloreto de sódio a 1,5%, da ração e da diurese, pois com isto, estaríamos provando as funções dos núcleos hipotalâmicos com relação à homeostase alimentar.

O método usado para esta investigação foi igual ao usado por ANTUNES-RODRIGUES^{1,2}. Os animais eram mantidos em gaiolas metabólicas, individuais, com dois bebedouros graduados em mililitros: um contendo água de torneira e o outro uma solução de cloreto de sódio a 1,5%. Um comedouro especial permitia, com pequena margem de erro, determinar a quantidade de ração moída (contendo 0,5% de CINa) ingerida diariamente. Um funil colocado sob a gaiola permitia a colheita da urina para a medida da diurese.

Antes de iniciarmos as medidas, fazíamos os animais permanecerem 10 dias nas gaiolas a fim de se adaptarem às novas condições e de se condicionarem aos dois bebedouros.

Foram utilizados 50 animais: 25 controles e 25 chagásicos crônicos, com peso variando de 250 a 350 g. A ingestão e a diurese foram medidas durante 30 dias consecutivos.

O volume total de água ingerido por dia era obtido somando-se o volume de água pura mais o volume da solução de cloreto ingeridos nesse dia.

Não nos preocupamos com as condições ambientes pois além de usarmos controles, ANTUNES-RODRIGUES¹ verificou que a temperatura, a umidade relativa e a pressão atmosférica não parecem ter influência sobre a ingestão.

A análise estatística do volume e do peso totais ingeridos individualmente pelos animais após os 30 dias de observação foi feita por meio do teste "t" de Student.

- 2 — *medida da ingestão de solução de cloreto de sódio a 1,5% após administração de hidroclorotiazida*

A finalidade desta observação foi verificar como se comportam os ratos chagásicos frente a uma depleção de sódio provocada pela hidroclorotiazida (Hidroclorotiazida, lote B-2-023-67, Merck Sharp & Dohme) cuja ação natriurética é acentuada (BEYER & BAER³; EARLEY & ORLOFF⁷).

Oito ratos chagásicos e sete controles, com peso variando entre 160 e 200 g, receberam cerca de 10 miligramas da droga, por via oral, duas vezes, com um intervalo de onze dias entre a primeira e a segunda administração. Antes da primeira, os animais foram observados por um período de treze

TABELA I

Médias dos resultados obtidos no controle diário da ingestão de água (25 animais), da solução de ClNa a 1,5% (25 animais) da diurese (20 animais) e da ração (17 animais) nos 30 dias de observação.

Dias	Contrôles				Chagásicos			
	Água (ml)	Sol. de ClNa (ml)	Diurese (ml)	Ração (g)	Água (ml)	Sol. de ClNa (ml)	Diurese (ml)	Ração (g)
1	36,9	10,3	12,5	19,0	36,2	7,2	11,5	21,1
2	34,3	9,3	11,0	19,2	36,9	9,5	12,6	20,6
3	38,6	11,2	11,4	18,0	35,6	6,1	12,1	19,3
4	37,0	9,8	11,8	19,2	37,1	8,0	11,7	20,9
5	38,0	13,3	13,3	17,8	35,8	8,3	12,6	19,8
6	38,1	13,4	12,0	18,9	35,8	8,0	11,3	20,3
7	35,7	10,7	11,1	18,3	34,7	7,3	11,7	20,5
8	37,6	12,0	13,9	18,5	37,4	7,4	12,5	20,6
9	37,4	11,8	12,5	18,5	36,6	6,7	11,6	20,1
10	36,2	9,8	10,8	19,7	36,2	7,8	12,3	21,8
11	37,2	11,8	12,2	18,4	38,6	9,2	12,5	20,8
12	37,5	10,6	11,5	20,4	39,4	10,0	14,1	22,3
13	38,7	12,4	11,6	19,0	39,3	8,1	13,1	21,1
14	38,6	12,0	11,3	18,4	39,1	8,2	13,1	21,1
15	39,0	12,8	12,2	19,4	40,2	8,6	13,7	21,8
16	38,5	12,2	12,0	20,0	39,4	7,9	13,2	22,3
17	39,3	11,9	11,9	19,2	36,5	6,4	11,3	21,4
18	39,5	13,6	13,2	19,1	39,5	8,5	13,1	21,8
19	40,3	12,0	12,8	19,8	39,6	8,2	14,3	21,3
20	40,6	13,3	12,4	20,4	41,8	9,4	15,1	22,2
21	39,0	10,4	11,4	19,9	40,2	9,4	14,6	21,7
22	37,9	11,0	12,1	20,9	41,3	9,0	14,5	22,5
23	42,7	12,3	13,7	19,6	41,3	7,5	13,0	21,8
24	43,3	12,2	13,5	21,1	41,0	8,5	13,4	22,2
25	42,7	14,4	13,9	20,7	42,1	8,1	14,2	23,7
26	41,5	10,3	12,2	19,3	42,8	8,8	14,3	21,4
27	38,9	12,0	14,1	18,4	39,3	6,9	14,3	21,1
28	41,9	12,4	13,5	20,7	39,7	6,8	13,6	22,8
29	41,3	11,6	11,9	19,4	39,7	8,3	14,2	22,1
30	40,5	12,5	12,1	18,9	39,5	6,7	13,3	21,1

dias, medindo-se a ingestão diária de água, da solução de cloreto de sódio a 1,5% da ração e, a diurese.

3 — *medida da ingestão de água, da solução de cloreto de sódio a 1,5%, da ração e da diurese após jejum de 24 horas*

Com esta observação pretendíamos ter uma idéia de como se recuperam os ratos chagásicos após o jejum, onde os mecanismos homeostáticos são muito mais amplos e complexos do que na prova anterior.

Assim, após 24 horas de jejum total, oferecia-se água, solução de cloreto de sódio a

1,5% e ração, medindo-se a ingestão e a diurese, de hora em hora, durante 6 horas.

Utilizamos 16 ratos chagásicos e 14 controles, pesando de 180 a 240 g.

4 — *avaliação quantitativa dos neurônios do núcleo supraóptico e verificação de prováveis alterações histopatológicas*

Os ratos de números 1 a 10, tanto controles como chagásicos, da primeira observação foram sacrificados por luxação da coluna cervical. Seus hipotálamos foram retirados, fixados em líquido de Bouin por 24 horas, incluídos em parafina e cortados se-

riadamente com cortes de 10 micra de espessura, tomando-se um e desprezando-se os dois seguintes. Isto porque os maiores neurônios do núcleo supraóptico do rato, segundo nossas observações, têm 30 micra de diâmetro máximo. Assim, evitamos contar o mesmo neurônio duas vezes. Os cortes aproveitados foram corados pela hematoxilina-crômica de GOMORI⁹. Este método de coloração, além de permitir a contagem dos neurônios, possibilita o estudo de "neurosecreção", bem como das alterações histopatológicas.

RESULTADOS

1 — As médias dos resultados obtidos no controle diário da ingestão de água, da solução de cloreto de sódio, da ração e no controle da diurese estão na Tabela I. O

contrôle da ingestão de ração foi feito somente em 17 animais contrôles e 17 chagásicos (n.^{os} 9 a 25), e o da diurese em 20 animais de cada grupo (n.^{os} 6 a 25).

Os resultados da ingestão de água e da diurese foram, praticamente, iguais para os chagásicos e para os contrôles.

Quanto à ingestão da solução de cloreto de sódio a 1,5% verificamos que as médias diárias do grupo controle foram sempre superiores às dos ratos chagásicos, com exceção do 2.^o dia, chamando a atenção a constância com que este fato se repetiu, como bem demonstra a Fig. 1. O fenômeno tornou-se mais evidente em oito animais os quais constituem 36% da nossa amostra.

Nos contrôles, uma baixa ingestão de sódio desta magnitude só foi observada em apenas dois animais (8%).

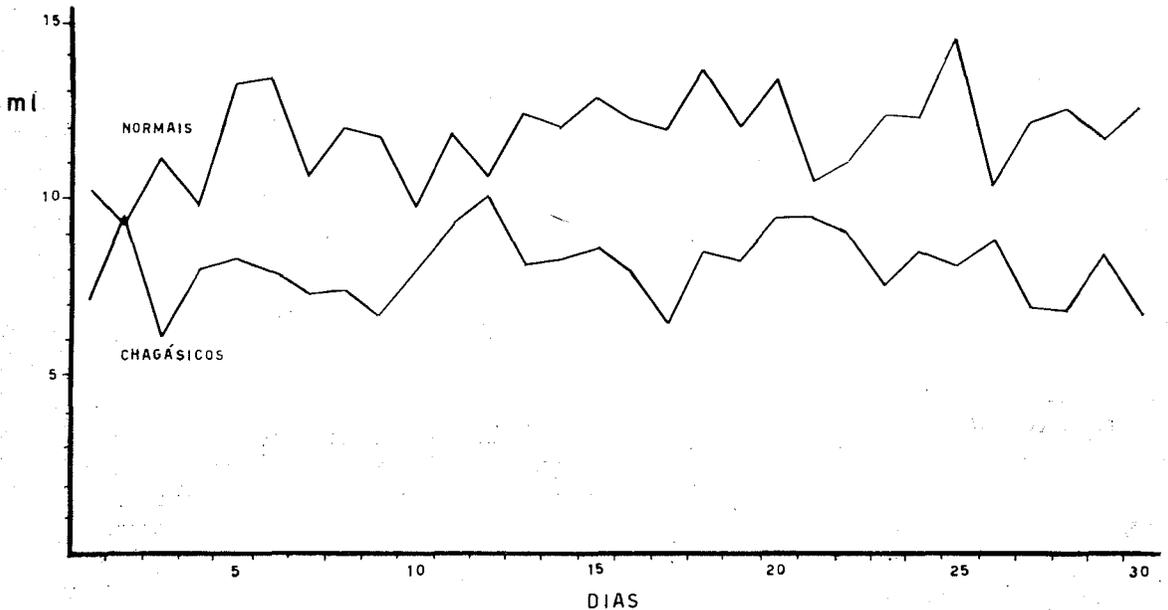


Fig. 1 — Evolução da ingestão média diária da solução de ClNa a 1,5% pelos 25 ratos normais e pelos 25 contrôles nos 30 dias de observação.

A Fig. 2 representa as médias diárias da ingestão de cloreto de sódio nos dois grupos estudados e nos trinta dias de observação, dispostas por ordem de grandeza.

Restaria saber se os ratos chagásicos compensaram esta diminuição da ingestão de

cloreto de sódio contido no bebedouro por uma maior ingestão desta substância contida na ração (hiperfagia).

O controle diário da ingestão de ração mostra que os ratos chagásicos ingeriram, em média, uma quantidade um pouco maior

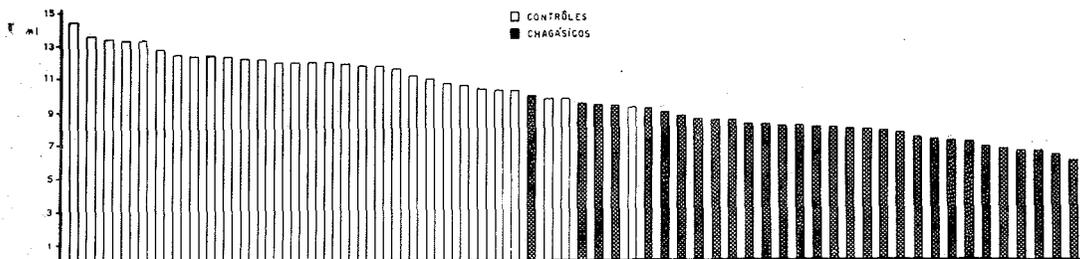


Fig. 2 — Médias diárias de ingestão da sol. de ClNa a 1,5%, dispostas em ordem de grandeza por 25 ratos contrôles e 25 chagásicos em 30 dias de observação.

TABELA II

Médias dos volumes da solução de cloreto de sódio a 1,5% ingerida pelos 7 ratos contrôles e 8 chagásicos, em ml/24 horas, antes e após administração de duas doses de 10 mg de hidroclorotiazida, por via oral, indicadas pelas setas.

Dias	Contrôles	Chagásicos
1	15,6	5,7
2	13,6	6,9
3	14,1	9,6
4	12,4	7,5
5	12,4	8,0
6	14,4	9,6
7	13,7	8,3
8	14,7	7,5
9	10,8	6,6
10	12,7	8,8
11	12,2	8,8
12	12,0	4,3
Hidroclorotiazida →	13,1	4,0
14	25,1	12,2
15	17,6	4,4
16	10,2	4,5
17	31,8	2,8
18	13,2	2,8
19	13,1	6,3
20	15,2	3,5
21	12,2	5,0
22	14,8	3,8
23	15,2	4,6
Hidroclorotiazida →	13,6	2,4
25	26,4	11,8
26	14,4	5,5
27	10,8	3,1
28	14,4	3,3
29	17,7	5,6
30	16,3	5,5

a quantidade de sal ingerida a mais através da ração não compensou a quantidade ingerida a menos através da solução de cloreto contida nos bebedouros, com exceção de dois dias (2.º e 12.º).

2 — Os resultados médios obtidos na medida da ingestão da solução de cloreto de sódio a 1,5% antes e após administração de hidroclorotiazida estão na Tabela II.

A Fig. 3 mostra a evolução diária das médias de ingestão da referida solução nos trinta dias em que os animais (chagásicos e contrôles) foram observados, antes e após a administração da droga, indicada pelas setas.

Pelo exame desta figura, verifica-se que a resposta dos ratos contrôles foi superior à dos chagásicos após a administração das duas doses de hidroclorotiazida.

Considerando-se como base a média da ingestão diária dos 13 dias anteriores à primeira dose, verificamos que os contrôles ingeriram 90,1% a mais e, os chagásicos 64,8%. Note-se ainda que a linha base do traçado dos animais contrôles permanece na sua altura habitual após o efeito da droga, enquanto que a mesma linha correspondente aos animais chagásicos muda para níveis inferiores.

Os mesmos fenômenos repetem-se quando da administração da segunda dose.

que os normais. Porém, a diferença máxima observada foi de 3 g de ração. Sabendo-se que a concentração de cloreto de sódio na ração é de 0,5% pudemos verificar que

3 — Os resultados obtidos no controle da ingestão de água, da solução de cloreto, da ração e da diurese após jejum de 24 horas estão na Tabela III.

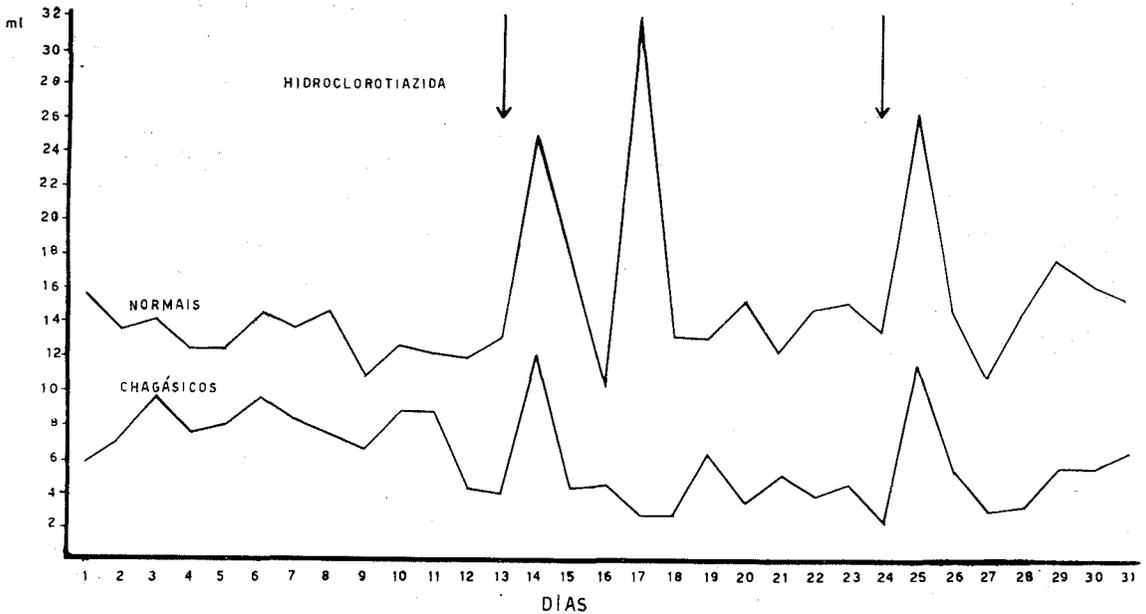


Fig. 3 — Evolução da ingestão média diária da solução de cloreto de sódio a 1,5% pelos 7 ratos contrôles e pelos 8 chagásicos antes e após a administração de 2 doses de 10 mg cada, de hidroclorotiazida, indicadas pelas setas, em 30 dias de observação.

TABELA III

Evolução da ingestão média de água, da solução da ClNa a 1,5%, da ração e da diurese, de 14 animais contrôles e 16 chagásicos, durante as 6 primeiras horas após jejum total de 24 horas.

	Contrôles				Chagásicos			
	Água (ml)	Sol. de ClNa (ml)	Ração (g)	Diurese (ml)	Água (ml)	Sol. de ClNa (ml)	Ração (g)	Diurese (ml)
1. ^a hora	6,7	2,7	4,0	0	4,8	1,0	3,3	0
2. ^a hora	2,3	0,1	1,5	0,7	4,0	0,5	1,7	0,3
3. ^a hora	1,1	0,1	0,3	0,2	1,3	0,6	0,6	0,4
4. ^a hora	2,3	0,2	0,7	0,3	1,8	0,3	0,2	0,2
5. ^a hora	2,1	0,7	0,7	0	1,6	0	0,6	0,4
6. ^a hora	2,5	0,3	1,0	0,8	1,6	0,1	0,4	0,4
Total ingerido nas 6 hs	50,7	11,4	20,5	11,0	41,6	4,7	19,3	7,9

A Fig. 4 representa estes resultados (frequências acumuladas).

Podemos observar que após 24 horas de jejum os níveis de ingestão dos ratos chagásicos são sempre inferiores aos dos normais. Isto fica mais evidente no traçado da inges-

tão da ração e, principalmente, da solução de cloreto de sódio.

4 — Os resultados da contagem de neurônios no núcleo supraóptico estão na Tabela IV.

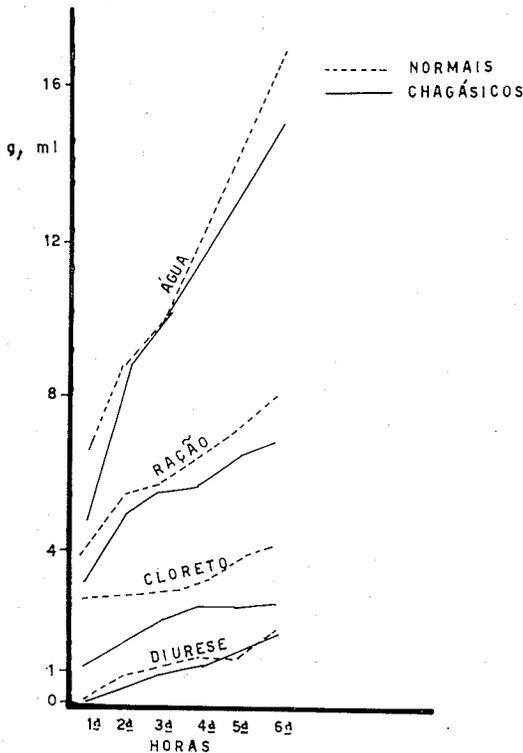


Fig. 4 — Evolução da ingestão média de água, da solução de ClNa, da ração e da diurese nas primeiras 6 horas após 24 horas de jejum, nos 14 ratos contrôles e dos 16 chagásicos.

TABELA IV

Resultados das contagens dos neurônios nos núcleos supraópticos, direito e esquerdo, em 10 ratos contrôles e 10 chagásicos

Rato n.º	Contrôles	Chagásicos
1	7022	8215
2	7653	6341
3	8050	6836
4	8540	2868
5	8339	6256
6	9247	4548
7	7423	9804
8	8045	7747
9	9919	3341
10	7211	3807
Média	8144	5976

A Fig. 5 representa estes resultados em ordem de grandeza.

Verificamos assim que o grau de desnervação variou de um animal para outro, sendo mais intenso no animal n.º 4 e praticamente não existindo nos animais n.ºs 1, 7 e 8. A desnervação média foi de 27%.

Os achados histopatológicos encontrados consistiam de infiltrados inflamatórios, granulomas e áreas de gliose.

Como nos casos humanos, os ratos chagásicos parecem apresentar também um aumento da substância Gomori-positiva (Figs. 6 e 7).

DISCUSSÃO

A medida da ingestão de cloreto de sódio pelos ratos, revelou fatos bastante sugestivos. Os animais chagásicos crônicos empregados nesta observação, apresentaram uma baixa ingestão média diária de sódio que em 36% dos animais foi muito acentuada. Este achado constitui um fato inédito na literatura concernente à moléstia de Chagas, e abre perspectivas para ulteriores estudos clínicos relacionados ao emprego dos diuréticos no tratamento da cardiopatia chagásica, dado o fato de que, a depleção de sódio poderá condicionar alterações relevantes no equilíbrio hidro-eletrolítico daqueles pacientes.

Confirmando-o, verificamos que os mecanismos homeostáticos postos em jôgo, frente a uma depleção de sódio provocada pela hidroclorotiazida, acham-se comprometidos pois, as respostas dos chagásicos quanto à ingestão da solução de cloreto, continuaram sendo inferiores às dos contrôles. Além disso, o aumento da ingestão de sódio pelos ratos chagásicos após a administração de hidroclorotiazida, embora inferior aos dos contrôles, levaria os núcleos hipotalâmicos a uma fase de exaustão, motivo pelo qual, provavelmente, a linha base correspondente aos ratos chagásicos desce para níveis inferiores.

O mesmo se pode dizer quanto à recuperação dos animais após jejum total de 24 horas, quando a ingestão do sal pelos chagásicos continuou sendo inferior à dos normais.

Esta baixa ingestão de sódio foi verificada por ANTUNES-RODRIGUES² por meio de le-

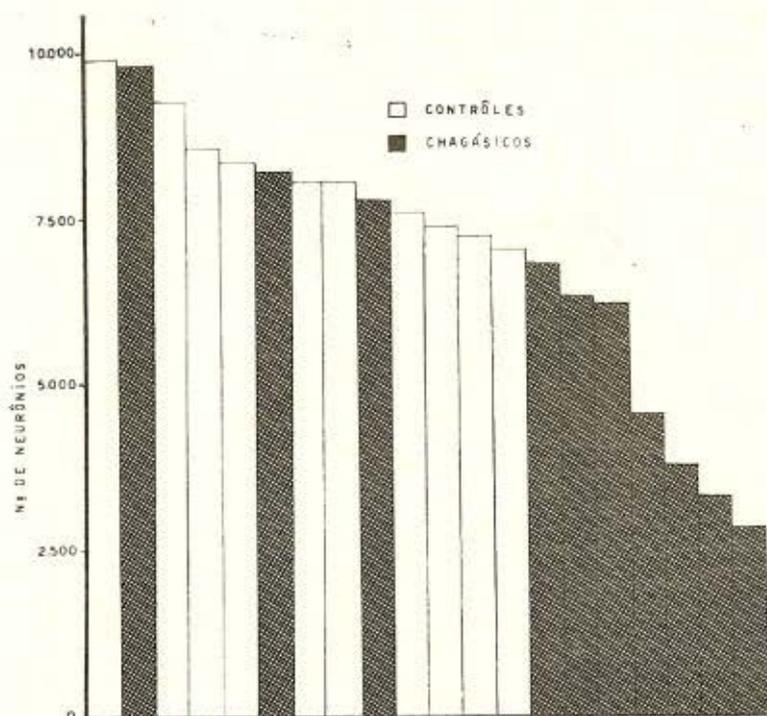


Fig. 5 — Número total de neurônios encontrados nos núcleos supraópticos, direito e esquerdo, dos 10 ratos contrôles e 10 chagásicos, por ordem de grandeza.

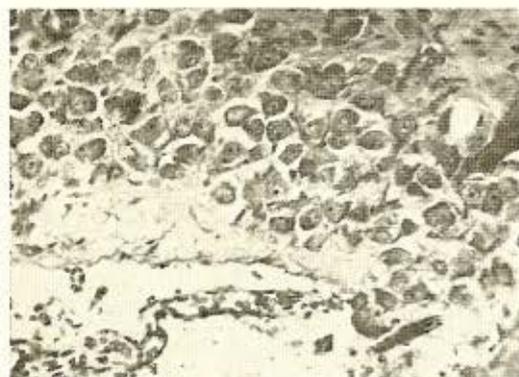


Fig. 6 — Núcleo supraóptico de um rato contrôles para mostrar a quantidade habitual de substância Gomori-positiva observada neste grupo de animais (500 X).

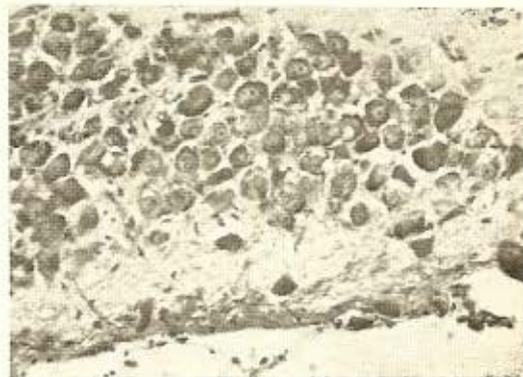


Fig. 7 — Núcleo supraóptico de um rato chagásico para mostrar o aumento da substância Gomori-positiva neste grupo de animais (500 X). Compare-se com a figura anterior.

sões provocadas nas partes laterais do hipotálamo anterior, em ratos, provando assim que a ingestão deste íon depende, diretamente, de um mecanismo neurogênico no qual o hipotálamo seria o ponto nodal e independente da adrenal. Em trabalho anterior¹,

o mesmo Autor, usando igual método de estudo, obteve uma diminuição da ingestão de cloreto de sódio, sem alterações na ingestão de água, por meio de lesões na região hipotalâmica anterior e lateral, térço posterior,

comprometendo, às vezes, os núcleos supra-ópticos e paraventriculares, total ou parcialmente. As lesões de regiões mais posteriores determinavam aumento da ingestão de cloreto de sódio.

Relativamente aos nossos achados nos animais chagásicos, somente encontramos diminuição da ingestão de sódio, e nunca um aumento, sem que entretanto, possamos oferecer para êste achado, uma explicação satisfatória.

Entretanto, JARDIM¹⁰ verificou que “A distribuição do parasitismo em relação aos níveis hipotalâmicos anterior, médio e posterior mostrou evidente predomínio das porções anterior e média, o que poderá ser atribuído a uma irrigação sanguínea mais pronunciada destas regiões”, (pág. 42), sugerindo lesões dos núcleos supraóptico e paraventriculares, responsáveis, segundo vários Autores, pela elaboração do hormônio anti-diurético e jogando papel de relêvo na homeostase hidro-eletrolítica.

Da análise de nossas investigações se depreendem os seguintes fatos:

- 1) ratos na fase crônica da moléstia de Chagas experimental apresentam uma baixa ingestão média diária de cloreto de sódio;
- 2) frente a uma depleção de sódio determinada pela hidroclorotiazida ou após jejum de 24 horas a ingestão dêste íon pelos ratos chagásicos continua sendo inferior à dos contrôles;
- 3) êstes fenômenos se devem, muito provavelmente, a lesões do hipotálamo anterior determinadas pelo *T. cruzi*;
- 4) êstes achados corroboram com aqueles já observados na espécie humana.

SUMMARY

Hypothalamic alterations in the chronic phase of experimental Chagas' disease

In anteriorly published research, the Author has found, in human material, beside a

denervation of the supraoptic nucleus of the anterior hypothalamus, an increase in the amount of “neurosecretion” (Gomori-positive substance) in individuals in the chronic phase of Chagas' disease.

On account of the difficulties proper to the materials obtained from autopsies, it would seem necessary an experimental investigation.

In the present work the Author studies functional and morphological aspects of the anterior hypothalamus of rats experimentally infected with *T. cruzi*. The results have shown alterations in the alimentary homeostasis expressed by a lower ingestion of sodium chloride in normal conditions and after a depletion of sodium induced by hydrochlorothiazide or fasting of the infected animals. In addition, like in man, it was observed an increase in the amount of the Gomori-positive substance and a denervation in the supra-optic nucleus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTUNES-RODRIGUES, J. — *Contrôle hipotalâmico da ingestão seletiva de água e cloreto de sódio*. Tese de doutoramento. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1962.
2. ANTUNES-RODRIGUES, J. — *Estudos sobre a influência do hipotálamo na ingestão de sódio*. Tese de Livre-Docência. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1968.
3. BEYER, K. H. & BAER, J. E. — Physiological basis for the action of newer diuretic agents. *Pharmacol. Rev.* 13:517-525, 1961.
4. BRENNER, Z. — *Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas*. Tese. Belo Horizonte, Faculdade de Medicina, Universidade de Minas Gerais, 1961.
5. BRITTO-COSTA, R. & GALLINA, R. A. — Hipotálamo anterior na moléstia de Chagas humana. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13:92-98, 1971.
6. COVIAN, M. R. & ANTUNES-RODRIGUES, J. — Specific alterations in sodium chloride intake after hypothalamic lesions in the rat. *Amer. J. Physiol.* 205:922-926, 1963.
7. EARLEY, L. E. & ORLOFF, J. — Thiazide diuretics. *Ann. Rev. Med.* 15:149-166, 1964.

8. FREITAS, J. L. P.; LION, M. & TARTARI, J. — Resultados de uma investigação sobre a moléstia de Chagas realizada no Município de Marília e outros, com estudo clínico de dois casos da doença. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. Univ. São Paulo* 8:81-92, 1953.
9. GOMORI, G. — Observations with differential stains on human islets of Langerhans. *Amer. J. Path.* 17:395-406, 1941.
10. JARDIM, E. — *Estudo das manifestações clínicas e do parasitismo do hipotálamo e do núcleo do terceiro par craneano na moléstia de Chagas experimental aguda, no rato.* Tese de Livre-Docência. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1968.

Recebido para publicação em 9/2/1971.