

MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA

ESTUDO IMUNOLÓGICO NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual  
de Campinas para a obtenção do  
grau de Mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Carlos Corsini

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Campinas

São Paulo - Brasil

1980

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos pacientes do ambulatório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas - UNICAMP, razão de ser deste trabalho, pela colaboração.

À Nila (*in Memoriam*);  
ã Edesio; ao Wolgrand ;  
ã Janaina e Juliana.

## AGRADECIMENTOS

A execução deste trabalho foi possível mediante os recursos fornecidos pela Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia da UNICAMP.

Ao Dr. Antonio Carlos Corsini, por sua criteriosa orientação científica, meu especial agradecimento.

Ao Dr. Humberto de Araujo Rangel, por seu esforço em conseguir melhores condições para a formação de pesquisadores e professores na UNICAMP, minha homenagem.

Aos Drs. Antonio F. Pestana de Castro e Luiz Candi-do de Souza Dias, pelas valiosas contribuições na análise prévia deste trabalho.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Imunologia, em especial Daria Repka, pelos ensinamentos.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, especialmente Odete L. P. de Oliveira, pela solidariedade.

Aos Drs. José Martins Filho e colegas, especialmente Silvia Regina Brandalise e Roberto Jarbas Toledo, pelo apoio e colaboração durante o período de afastamento das minhas atividades no Departamento de Pediatria - FCM - UNICAMP.

Ao Dr. Daniel Marangon, responsável pelo ambulatório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas - UNICAMP.

A Dra. Marlene Braide Serafim pela prestimosa colaboração.

A todos aqueles que no anonimato, tornaram possível a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	9
2.1 - Pacientes .....	9
2.2 - Controles .....	9
2.3 - Teste de Hipersensibilidade retardada .....	10
2.3.1 - Reação cutânea com os antígenos de Candida, SK-SD, P.P.D. e Vacinia ..	10
2.3.2 - Teste de sensibilização da pele pe- lo DNCB (1 cloro 2,4 dinitrobenze- no) .....	11
2.4 - Preparo da suspensão de linfócitos do san- gue humano periférico .....	11
2.4.1 - Separação dos linfócitos .....	11
2.4.2 - Contagem de células e viabilidade celular .....	12
2.5 - Eritrócitos de carneiro .....	12
2.6 - Contagem de linfócitos T .....	13
2.7 - Contagem de linfócitos B .....	13
2.8 - Pesquisa de imunocomplexo circulante .....	14
2.9 - Determinação do complemento sérico total ..	15
2.9.1 - Amostra do soro humano .....	15

2.9.2 - Sensibilização das hemácias de car-	
neiro com anticorpo anti-hemácia,	
preparado em coelho .....	16
2.9.3 - Reação .....	16
2.10 - Imunização contra febre tifóide (Vacina	
T.A.B.) .....	17
2.11 - Medida da resposta humoral à vacina T.A.B.	17
2.12 - Reação de aglutinação .....	18
2.12.1 - Preparo do antígeno somático "O"	
de <i>S. typhi</i> .....	18
2.12.2 - Preparo do antígeno flagelar "H"	
de <i>S. typhi</i> .....	19
2.12.3 - Reação .....	19
2.13 - Reação de hemaglutinação passiva .....	20
2.13.1 - Padronização do antígeno "O" para	
sensibilização das hemácias .....	20
2.13.2 - Reação .....	20
2.14 - Determinação do nível de imunoglobulinas	
séricas .....	21
2.15 - Hemograma .....	21
2.16 - Análise estatística .....	21
3. RESULTADOS .....	23
3.1 - Reação de hipersensibilidade retardada nos	
pacientes chagásicos .....	23

3.2 - Sensibilização pelo DNCB .....	26
3.3 - Linfócitos T periféricos em pacientes com Doença de Chagas crônica .....	30
3.4 - Linfócitos B periféricos em pacientes com Doença de Chagas crônica .....	30
3.5 - Níveis de complemento (UCH <sub>50</sub> ) em pacientes com Doença de Chagas crônica .....	32
3.6 - Imunocomplexo no soro de pacientes chagásicos cos .....	32
3.7 - Níveis de imunoglobulinas no soro de pacien <u>tes</u> tes chagásicos .....	32
3.8 - Resposta humoral à vacina T.A.B. em pacien <u>tes</u> tes chagásicos .....	34
4. DISCUSSÃO .....	38
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	50
6. BIBLIOGRAFIA .....	53

## 1. INTRODUÇÃO

A Tripanosomíase Americana, identificada por Carlos Chagas em 1909, é considerada uma entidade mórbida de grande importância devido à sua ampla distribuição geográfica, sua alta morbidade (especialmente na forma cardíaca), alta prevalência e uma história natural envolvendo diversos hospedeiros.

A doença ocorre em quase todos os países da América Central e do Sul, e é prevalente na área rural. Estima-se que pelo menos 35 milhões de pessoas vivem em áreas da América do Sul onde o *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* Chagas, 1909 é endêmico e que cerca de 12 milhões estão atualmente infectados, dos quais aproximadamente 6 milhões são brasileiros (WHO, 1977; MACEDO, 1980).

Estes dados são suficientes para justificar uma maior intensidade na pesquisa desta doença, visto que ela representa um perigo humano permanente e um grande obstáculo para o desenvolvimento, juntamente com outras doenças tropicais. Entretanto, a despeito das expressões como nova ordem econômica, interdependência das nações e cooperação, as doenças tropicais têm sido amplamente ignoradas (DOROZYNSKY, 1976).

A Doença de Chagas se apresenta com quatro fases distintas (WHO, 1977). O período de incubação, que dura de uma a três semanas, caracteriza-se pela proliferação de amastigotas dentro das células de vários tecidos e penetração

dos tripomastigotas na circulação. A *fase aguda*, com duração de 2 a 3 semanas, caracteriza-se por alta parasitemia e invasão das células de vários órgãos, acometendo principalmente a musculatura lisa, cardíaca e estriada, embora outros tecidos também possam ser invadidos (MARSDEN, 1971). Contudo, nem todos os indivíduos infectados relatam ter desenvolvido a sintomatologia da fase inicial aguda. Na fase *indeterminada* não existe doença clínica, embora ocorra uma reduzida parasitemia. Esta fase da doença é a de maior prevalência, acometendo 50% dos indivíduos infectados (MACEDO, 1980), podendo durar indefinidamente ou evoluir para a forma crônica. Na *fase crônica*, aparecem os aspectos mais característicos da doença, surgindo lesão cardíaca e/ou dilatação progressiva e irreversível do esôfago ou do cólon terminal (KÖBERLE, 1974). Todas estas lesões são caracterizadas histologicamente por um infiltrado de células mononucleares e degeneração das fibras musculares, seguidas por fibrose (ANSEMI & MOLEIRO, 1974).

Esta variação na expressão clínica da doença é atribuída a vários fatores tais como: o parasita (cepas diferentes com variações na virulência), o vetor, e o próprio hospedeiro no que se refere ao seu estado geral, infecção prévia inaparente e fatores genéticos (WHO, 1977), a exemplo do que ocorre na malária (BUTCHER *et al.*, 1974; ALLISON, 1963) e na leishmaniose experimental (MAUEL *et al.*, 1974). Desta forma, a suscetibilidade e a resistência do hospedeiro podem não ser dependentes exclusivamente de fatores séricos responsáveis pela resistência específica, mas dependerem também da presença ou ausência de fatores inespecíficos.

Estes fatos exemplificam a complexidade da rela

ção hospedeiro-parasita, quando cada um destes elementos procura manter um equilíbrio biológico.

Estudos recentes demonstram que nas infecções por protozoários podem existir mecanismos comuns de agressão. Conseqüentemente, o estudo do envolvimento do sistema imune nestas infecções pode ser realizado em conjunto, no que diz respeito à virulência dos parasitas e seus mecanismos de evasão das defesas do organismo, assim como às reações do próprio hospedeiro.

Sabe-se que em decorrência do poder antigênico relativamente potente dos protozoários (COHEN, 1974), como também de sua presença persistente no organismo do hospedeiro, desenvolve-se neste último, uma série complexa de respostas, humorais e celulares, que em última análise visam ao controle do número de parasitas tornando possível a sobrevivência do binômio hospedeiro-parasita. Em algumas infecções, há uma produção elevada de imunoglobulinas séricas e o desenvolvimento de hipersensibilidade celular (COHEN, 1974). Paradoxalmente, apenas uma pequena proporção destas imunoglobulinas possui atividade específica para os agentes agressores (COHEN, 1975). Sugere-se que estes fatos podem resultar da estimulação do linfócito "B" pela interação do complexo antígeno-anticorpo-complemento que se liga a receptores de superfície nestas células (NUSSENZWEIG & PINCUS, 1972; TERRY *et al.*, 1973), ou por mitógenos produzidos pelos parasitas (GREENWOOD, 1968; GREENWOOD & VICK, 1975). Em conseqüência, fenômenos que deveriam compatibilizar hospedeiro e parasita, culminando com a eliminação do parasita, podem se transformar

em mecanismos imunopatogênicos sérios para o hospedeiro (COOMBS & GELL, 1975).

Na Doença de Chagas, as evidências acumuladas através de experimentos em animais de laboratório e também das observações no homem, sugerem que mecanismos imunológicos devem exercer um papel muito importante na patogênese dessa enfermidade. Assim sendo, fatos como: a resistência adquirida após a infecção com cepas de baixa virulência, a recuperação da fase aguda, a proliferação de organismos na ausência de lesões seguida por uma reação inflamatória do tipo que sugere hipersensibilidade retardada, e a lesão tecidual progressiva na fase crônica da doença associada com número mínimo de organismos (WHO, 1974) vêm reforçar esta suposição.

No entanto, a patogênese das lesões provocadas pelo *T. cruzi* no hospedeiro ainda permanece obscura (WHO, 1977), embora alguns trabalhos experimentais tenham contribuído para a elucidação da patogênese das lesões verificadas nesta tripanosomíase. Desta forma, coelhos infectados intraperitonealmente com *T. cruzi*, após a fase aguda da infecção, desenvolveram dentro de 7 a 13 meses sinais de miocardite crônica ou megacolon em 50% dos animais (TEIXEIRA *et al.*, 1975). Estas lesões possivelmente foram mediadas por reações linfocitotóxicas, visto que os linfócitos obtidos de animais infectados com o *T. cruzi* foram capazes de destruir as células cardíacas cultivadas "in vitro" (SANTOS BUCH & TEIXEIRA, 1974).

Estas evidências sugerem um mecanismo de hipersensibilidade retardada na patogênese da Doença de Chagas. Mais recentemente, o estudo do índice da migração de leucócitos

tos demonstrou que pacientes com miocardiopatia chagásica crônica apresentavam hipersensibilidade retardada para o extrato de cultura do *T. cruzi* e que apenas uma pequena proporção de indivíduos com a fase indeterminada da doença mostrou hipersensibilidade retardada para o mesmo antígeno (TOLEDO BARROS *et al.*, 1979).

Outro aspecto imunológico da Doença de Chagas foi explorado através do estudo de anticorpos circulantes no soro de indivíduos infectados. Noventa e cinco por cento dos pacientes com cardiopatia chagásica e 45% dos indivíduos assintomáticos infectados pelo *T. cruzi* possuíam anticorpos circulantes que reagiam com endocárdio, células endoteliais, interstício de musculatura estriada, membrana plasmática de fibras do músculo estriado (COSSIO *et al.*, 1974a e 1974b) e com a bainha de Schwann de nervos periféricos, de nervos autônomos e somáticos (KHOURY *et al.*, 1979). A presença destes anticorpos foi correlacionada com alterações morfológicas na biópsia de músculo esquelético (LAGUENS *et al.*, 1975).

No homem, em analogia com o que ocorre em infecções experimentais o primeiro anticorpo específico a aparecer é da classe IgM, que pode ser detectado precocemente, seguido pelo anticorpo IgG, que persiste durante todo o curso da doença (MARSDEN *et al.*, 1970; VATTUONE *et al.*, 1973). Até o momento, o papel desses anticorpos na resistência não está claro, visto que eles são detectados no sangue simultaneamente com parasitas circulantes. Em relação a este fato, alguns investigadores têm referido proteção específica, quando camundongos com infecção recente recebem soro de camundongos croni

camente infectados, promovendo a redução da parasitemia e da mortalidade (HANSON, 1976). Os anticorpos protetores são da classe IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>2b</sub>, porém não da classe IgM (TAKEHARA & NOTA, 1979).

Na Tripanosomiase americana, outros mecanismos provavelmente estariam contribuindo na defesa do hospedeiro, visto que a imunossupressão com radiação X, ciclofosfamida e corticosteróide têm sido descrita como responsável pela exacerbação da infecção em camundongos (GOBLE, 1970). Além desses, a timectomia neonatal (ROBERSON *et al.*, 1973; SCHMUNIS *et al.*, 1971) e o tratamento com soro antilinfócito (ROBERSON *et al.*, 1973) foram apontados como causa de parasitemia mais elevada, maior densidade de parasitas nos tecidos e aumento da mortalidade.

Demonstrou-se também que o soro imune de animais infectados com *T. cruzi* é capaz de lisar "in vitro" a forma de cultura destes parasitas (DENISON, 1943a, 1943b; MUNIZ & BORRIELLO, 1945). A cinética desta reação é semelhante àquela seguida pela lise imune de hemácias de carneiro sensibilizadas (ANZIANO *et al.*, 1972). Contudo, em camundongos infectados com formas sangüíneas virulentas do *T. cruzi*, a depleção do complemento com o fator veneno de cobra provocou uma exacerbação da doença, evidenciada por uma parasitemia mais elevada e mortalidade precoce, quando comparado com os camundongos infectados não tratados (BUDZKO *et al.*, 1975). Um segundo mecanismo de lise do *T. cruzi*, mas que não requer anticorpo específico foi demonstrado pela incubação de soro normal de galinha com o *T. cruzi* (KIERSZENBAUM *et al.*, 1976).

Estas observações mostram um possível papel "in vivo" para o complemento na resistência natural contra o *T. cruzi*.

Em resumo, ambos os braços da resposta imune, humoral e mediada por célula, parecem operar na defesa do hospedeiro e/ou na patogênese da Doença de Chagas. No entanto, a exemplo do que ocorre em outras infecções por protozoários, existe uma imunossupressão humoral (RAMOS *et al.*, 1978) e mediada por célula (REED *et al.*, 1977) em infecções experimentais com *T. cruzi*. Esta imunossupressão pensa-se ser mediada por células T supressoras (RAMOS *et al.*, 1979) de maneira semelhante ao que acontece com *Trypanosoma brucei* (JAYAWARDENA & WAKSMAN, 1977; CORSINI *et al.*, 1977), muito embora uma exaustão do potencial de células T e B (CORSINI *et al.*, 1977; ASKONAS *et al.*, 1979) possam também coexistir na supressão mediada pelo *T. cruzi*.

Assim sendo, nosso trabalho se propõe a estudar a reatividade imunológica geral dos indivíduos portadores da Doença de Chagas crônica, com o objetivo de verificar se esta reatividade é igual ou diferente da encontrada em indivíduos normais. Este estudo foi desenvolvido através da:

- Determinação do nível sérico de IgM, IgG e IgA;
- Dosagem de complemento sérico;
- Determinação do número de linfócitos T e B circulantes;
- Determinação de imunocomplexos circulantes;
- Verificação da resposta humoral após imunização com a vacina T.A.B. (vacina anti febre ti

fóide);

- Verificação da resposta celular após a inoculação intradérmica dos antígenos de Candida, P.P.D., estreptoquinase e estreptodornase (SK-SD), vírus da vacinia (VV) e a sensibilização da pele com o DNCB (dinitroclorobenzeno).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - PACIENTES

Foram estudados 68 indivíduos entre 15 e 70 anos de idade, sendo 36 do sexo masculino e 32 do sexo feminino. Todos eles foram seguidos clinicamente no ambulatório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas da UNICAMP e possuíam sorologia positiva para esta enfermidade (Reação de Guerreiro-Machado e imunofluorescência indireta). Estes pacientes procediam de vários estados (Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Paraná), mas com residência atual em áreas circunvizinhas à cidade de Campinas. Cardiopatia Chagásica, comprovada pelo eletrocardiograma e/ou cicloergometria, além do Raio X de tórax, estava presente em 24 pacientes. Envolvimento digestivo constatado radiologicamente foi verificado em 8 indivíduos. Reação sorológica positiva, porém sem nenhuma manifestação clínica da doença, foi evidenciada em 36 pacientes.

Além da Doença de Chagas foi constatada infestação por *Schistosoma mansoni* em 3 pacientes (os quais foram excluídos da população de estudo) e os 65 restantes não apresentavam nenhuma outra doença aparente. Nenhum dos indivíduos estudados estava sob tratamento com drogas imunossupressoras ou outros tratamentos especiais.

### 2.2 - CONTROLES

Foram utilizados como controles 79 indivíduos

aparentemente sadios, entre 20 e 40 anos de idade, dos quais 49 do sexo feminino e 30 do sexo masculino, com provas sorológicas e dados epidemiológicos negativos para Doença de Chagas.

### 2.3 - TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE RETARDADA

#### 2.3.1 - Reação cutânea com os antígenos de Candida, SK-SD, P.P.D. e Vacinia.

Os antígenos utilizados foram: Oidiomicina a 1:100 (Candida); Estreptoquinase/estreptodornase 40/5 U em 0,1 ml (SK-SD); Derivado protéico purificado (PPD-5 UT em 0,1 ml); Vírus vacinia - suspensão inativada pelo calor, contendo 2 U/0,1 ml (VV) e DNCB (dinitroclorobenzeno) em discos de feltro contendo 2000, 100 e 50 microgramas de antígenos. Estes antígenos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Oliveira Lima da Fundação Ataulpho de Paiva - Rio de Janeiro - Brasil. Após ser feita assepsia do local com álcool, tanto os pacientes quanto os controles receberam 0,1 ml da solução de cada antígeno, intradermicamente, na face anterior do antebraço. As medidas do eritema e da induração foram realizadas em duas dimensões, 24, 48 e 72 horas após a inoculação e expressas em mm. A reação foi considerada positiva quando havia uma indução igual ou superior a 5 mm (SPITLER, 1976).

Todos os antígenos empregados para realização do teste de hipersensibilidade retardada foram aplicados no mesmo dia em que se colheram amostras de sangue para contagem de linfócitos T e B, hemograma, dosagem de complemento, pes-

quisa de imunocomplexo circulante e dosagem de anticorpos heterófilos.

2.3.2 - Teste de sensibilização da pele pelo DNCB  
(1 cloro 2,4 dinitrobenzeno).

Este teste foi realizado mediante a aplicação de discos de feltro de 7 mm de diâmetro, contendo 2000 microgramas de DNCB (dose sensibilizante) e 100 µg e 50 µg (doses desencadeantes). Com auxílio de pinça, os discos foram depositados sobre a pele, previamente limpa com álcool, na região superior do braço, em área protegida da luz solar por curativo oclusivo, durante 24 horas. Nas primeiras 24 e 48 horas após a aplicação da dose sensibilizante (2000 µg), o aparecimento de reações como eritema, vesiculação ou bolhas, foram caracterizadas como reação inflamatória inespecífica. Quatorze dias mais tarde, mediu-se a resposta específica mediada por células e, neste mesmo dia, foram aplicadas doses desencadeantes de 50 e 100 µg de DNCB, cujas leituras eram feitas 24, 48 e 72 hs após (CATALONA *et al.*, 1972).

2.4 - PREPARO DA SUSPENSÃO DE LINFÓCITOS DO SANGUE HUMANO  
PERIFÉRICO.

2.4.1 - Separação dos linfócitos

O sangue coletado dos pacientes e controles foi misturado a etileno-diamino-ácido tetraacético (EDTA), na proporção de 0,1 ml de EDTA a 10% para 3 ml de sangue.

Os linfócitos foram separados em gradiente de

Ficoll-Hipaque, seguindo-se a técnica descrita por BÖYUM (1968) com ligeiras modificações. Um ml de sangue diluído 1:2 em meio mínimo essencial de Eagle pH 7.2 com 1% de soro bovino fetal (MME 1% SBF pH 7.2) foi colocado sobre 2 ml da mistura Ficoll-Hipaque, usando-se 12 volumes de Ficoll a 10% (Ficoll-Sigma Chemical Company, PM=400.000) e 5 volumes de Hipaque a 32,8% (Hipaque Winthrop Products Inc. New York USA), com densidade final de 1,076 g/ml. A preparação foi centrifugada a 1500 rpm, em temperatura ambiente, durante 15 minutos. Os linfócitos colhidos na interface, foram lavados duas vezes em MME 1% SBF, 1200 rpm durante oito minutos e, logo em seguida, feita a contagem, pesquisando-se paralelamente a viabilidade das mesmas.

#### 2.4.2 - Contagem de células e viabilidade celular.

Os linfócitos separados pelo gradiente de Ficoll-Hipaque foram contados utilizando-se um hemocitômetro de Neubauer e diluições em ácido acético 1%.

A viabilidade celular foi determinada utilizando-se 1 ml da solução de azul-tripán contendo 2 mg/ml e 0,25 ml de NaCl a 4,25%, segundo informação pessoal de Alex Matter.

A suspensão de linfócitos foi ajustada para  $25 \times 10^5$  células por ml em MME 1% SBF pH 7.2 e mantidas em banho de gelo até a sua utilização para formação de roseta E (linfócito T) e roseta EAC (linfócito B).

## 2.5 - ERITRÓCITOS DE CARNEIRO

O sangue de carneiro foi colhido assepticamente por

punção jugular em solução de Alsever, em volumes iguais e armazenado a 4°C não mais do que 20 dias. Antes do uso, as hemácias foram lavadas três vezes em salina tamponada pH 7.2 (para formação de rosetas) e em NaCl 0,15 M (para titulação de complemento sérico total).

#### 2.6 - CONTAGEM DE LINFÓCITOS T

A determinação de linfócitos T foi feita mediante a técnica descrita por WINCHESTER & ROSS (1976) com ligeiras modificações. Suspensões de linfócitos ( $5 \times 10^5/0,2$  ml) foram misturados a igual volume de uma suspensão de hemácias de carneiro a 0,5% em MME 1% de SBF, em tubos de vidro medindo 13 x 100 mm. Após centrifugação a 500 rpm, durante cinco minutos em temperatura ambiente, incubava-se por uma noite a 4°C. Antes do exame, a amostra foi removida da geladeira e a ressuspensão de células feita suavemente com uma pipeta pasteur. Uma gota da suspensão foi transferida por capilaridade para um hemocitômetro de Neubauer e deixada sedimentar por um ou dois minutos. Foram contados 200 a 400 linfócitos sob uma objetiva de 10 X e ocular de 12,5 X para determinar a porcentagem de células que formavam rosetas com 3 ou mais hemácias de carneiro.

#### 2.7 - CONTAGEM DE LINFÓCITOS B

Os linfócitos B foram detectados pela formação de roseta com hemácias de carneiro ligadas com anticorpo e complemen

to (EAC), segundo o método descrito por WINCHESTER & ROSS (1976) com pequenas modificações.

A separação dos linfócitos do sangue periférico foi realizada da mesma maneira que para Roseta E (linfócito T). Alíquota de 0,5 ml da suspensão de hemácias de carneiro a 5% foi sensibilizada em banho maria a 37° C, durante trinta minutos, com anticorpo (IgM) anti-hemácia de carneiro, preparado em coelho. As hemácias sensibilizadas foram lavadas duas vezes com salina tamponada pH 7.2 e ressuspensas no mesmo volume inicial (0,5 ml). Em seguida, 0,25 ml dessa suspensão de hemácias sensibilizadas foram incubadas com igual volume de soro fresco de camundongo diluído 1:10 em salina tamponada pH 7.2 (como fonte de complemento), durante trinta minutos a 37° C. O complexo eritrócito-anticorpo e complemento (EAC) foi lavado duas vezes com salina tamponada pH 7.2. Porções de 0,2 ml desse complexo foram misturadas com  $5 \times 10^5$  linfócitos em 0,2 ml de MME 1% SBF pH 7.2 em pequenas cubetas de plástico, medindo 17 x 10 mm. Estas cubetas foram fechadas com parafilm "M" (Marathon Products) e submetidas a rotação de 20 rpm (Slow Rotator) na posição horizontal, em estufa a 37° C durante trinta minutos. A contagem dos linfócitos que formavam rosetas EAC (3 ou mais hemácias) foi realizada em um hemocitômetro de Neubauer da mesma maneira que se procedeu para roseta E.

## 2.8 - PESQUISA DE IMUNOCOMPLEXO CIRCULANTE

A pesquisa de imunocomplexo circulante foi realizada utilizando-se a técnica descrita por DIGEON *et al.*, (1977).

O soro humano (pacientes e controles) foi diluído 1:25 em tampão borato 0,1 M pH 8.4. Aliquota de 4 ml desta solução foram misturados a 4 ml de uma solução de polietilenoglicol (PEG, 6000 Merck) em tampão borato, de modo a obter uma solução final com 3,5% de PEG. A mistura foi incubada 18 hs a 4º C e centrifugada 20 minutos a 2000 G a 4º C. O sobrenadante foi decantado e o precipitado lavado uma vez com solução de PEG na mesma concentração (3,5 g%). O precipitado foi então dissolvido em NaOH 0,1 N (5 ml) e a quantidade de proteínas presentes no precipitado foi medida em um espectrofotômetro Zeiss-M4 QIII em comprimento de onda de 280 nm, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. A comparação do método de LOWRY *et al.* (1951) para dosagem de proteínas e a medida da densidade óptica correspondente, mostrou que 0,10 unidades de DO correspondiam a 0,07 mg/ml de proteína, avaliado de acordo com a densidade óptica da IgG.

## 2.9 - DETERMINAÇÃO DO COMPLEMENTO SÉRICO TOTAL

### 2.9.1 - Amostra do soro humano

O sangue de cada indivíduo foi coletado em tubos separados, colocados em banho de gelo (para transporte), em seguida no banho-maria a 37º C durante trinta minutos para retração do coágulo. Cada amostra de soro foi centrifugada a 2000 rpm durante 8 minutos a 4º C e imediatamente armazenada a menos 70º C até o momento da titulação. O título de complemento foi determinado de acordo com as instruções fornecidas por MAYER (1971), e expresso em UCH<sub>50</sub> (unidade hemolíti

ca do complemento - 50% de lise).

2.9.2 - Sensibilização das hemácias de carneiro com anticorpo anti-hemácia, preparado em coelho.

As hemácias coletadas, segundo descrição no item 2.5, foram lavadas 3 vezes em NaCl 0,15 M. Preparou-se uma suspensão de hemácias  $1 \times 10^9$  células por mililitro, em tampão veronal pH 7.4 com 0,1% de gelatina. Esta suspensão foi padronizada de modo que a diluição 1:10 em água destilada fornecesse DO de 0,42 a 550 nm, em um espectrofotômetro Coleman Jr., em cubetas de 10 x 120 mm. Procedia-se então à sensibilização das hemácias, misturando-se em partes iguais a suspensão de células padronizadas com hemolisina diluída em tampão veronal, com título correspondente a 50% de lise. Após sensibilização, as hemácias foram mantidas em banho de gelo até sua utilização.

2.9.3 - Reação

A reação foi feita em triplicata. Nos tubos "reação", misturava-se 0,5 ml de cada diluição do soro a 0,5 ml do sistema hemolítico (hemácia ligada a anticorpo anti-hemácia), completando-se para um volume final de 2,5 ml com tampão veronal pH 7.4. Nos tubos controle, misturava-se 0,5 ml de cada diluição do soro a 0,5 ml de suspensão de hemácias não sensibilizadas, para verificar o título dos anticorpos hemolíticos naturais (anticorpos heterófilos) presentes no soro, e que poderiam interferir na titulação do complemento.

Todos os tubos foram agitados e colocados em banho-maria a 37° C durante sessenta minutos, com agitação de quinze em quinze minutos. Ao término da incubação, foram centrifugados a 2000 rpm a 4° C durante 8 minutos e no sobrenadante de cada tubo foi medida a quantidade de oxihemoglobina liberada, em um espectrofotômetro Coleman Jr. em cubetas medindo 10 x 120 mm, em comprimento de onda de 540 nm.

#### 2.10 - IMUNIZAÇÃO CONTRA FEBRE TIFÓIDE (VACINA T.A.B.)

Foram submetidos à vacinação voluntários chagásicos e controles, devidamente esclarecidos sobre a finalidade do experimento e alertados sobre possíveis reações e efeitos colaterais da vacina.

Utilizou-se a vacina T.A.B. - produzida pelo Instituto Butantan - SP, preparada com culturas de *Salmonella typhi* de elevado poder imunizante e rica em antígeno Vi. Esta vacina continha *S. typhi* ( $10^9$  bactérias/ml), *S. paratyphi* A ( $0,75 \times 10^9$  bactérias/ml), e *S. paratyphi* B ( $0,75 \times 10^9$  bactérias/ml) correspondendo a 8 unidades protetoras. A dose administrada constituiu-se de duas injeções intramusculares de 0,5 e 1,0 centímetro cúbico respectivamente, com um intervalo de 8 a 10 dias (WILSON & MILES, 1964).

#### 2.11 - MEDIDA DA RESPOSTA HUMORAL À VACINA T.A.B.

As amostras de soro de cada indivíduo testado foram obtidas antes da primeira dose e 21 dias após a segunda dose. A soroconversão das aglutininas "H" e "O" anti *S. typhi* foi

verificada através das reações de *aglutinação* (WILSON & MILES, 1964) e *hemaglutinação passiva* (PENNER & HENNESSY, 1979), para efeito de comparação quanto à sensibilidade da técnica.

## 2.12 - REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO

### 2.12.1 - Preparo do antígeno somático "O" de *S. typhi*

Na preparação deste antígeno, utilizou-se uma cepa lisa de *S. typhi* 86, Vi positiva, cultivada a 37° C em garrafa de Roux contendo ágar simples. Os germes foram suspensos e mortos através da adição de 10 ml de NaCl 0,85%, contendo 0,5% de fenol. O volume coletado foi transferido para um erlenmeyer e adicionado lentamente sob agitação, igual volume etanol absoluto. A suspensão foi aquecida a 60° C por uma hora e sua esterilidade verificada por repiques em placas de ágar. O armazenamento, até o uso da suspensão bacteriana, foi feito em frasco estéril a 4° C (EDWARDS & EWING, 1972).

A suspensão bacteriana para o preparo do antígeno "O" foi padronizada pela técnica de três contagens sucessivas em câmara de Neubauer, utilizando o microscópio de contraste de fase. A partir dos dados obtidos, foi construída uma curva, com base na absorbância lida no nefelômetro (OLIVEIRA LIMA, 1970), projetando-se a densidade óptica em ordenadas e as concentrações bacterianas por ml de suspensão, em abscissas.

O poder aglutinante e hemaglutinante dessa suspensão foi comparada ao da "Bacto-Salmonella Antigen "O"

(Difco Laboratories Detroit Michigan USA).

### 2.12.2 - Preparo do antígeno flagelar "H" de *S. typhi*

A cepa lisa de *S. typhi* 86 Vi positivo, após cinco passagens sucessivas em tubos contendo gel semisólido para ativação de sua mobilidade, foi cultivada em garrafas de Roux, a 37° C por 24 hs. Os bacilos foram suspensos em salina formolada 0,5%, aproximadamente 0,5 ml por garrafa. A suspensão foi conservada a 4° C, sendo praticadas provas de esterilidade nas primeiras 48 hs (EDWARDS & EWING, 1972).

A determinação do número total de bactérias da suspensão rica em antígeno flagelar foi efetuada da mesma maneira que se padronizou o antígeno somático "O".

Na reação de aglutinação, foi utilizada uma suspensão contendo aproximadamente  $3,6 \times 10^9$  organismos por ml (quatro vezes a densidade do tubo nº 3 da escala de McFARLAND) e seu poder aglutinante foi comparado ao da "Bacto-Salmonella Antigen "H"" (Difco Laboratories Detroit Michigan USA).

### 2.12.3 - Reação

No teste de aglutinação, ambas as preparações de antígeno "O" e "H" foram diluídas 1:10 em salina 0,15 M e misturadas a diluições seriadas 1:2 em soro dos indivíduos chagásicos e controles. A reação foi incubada a 50° C durante uma hora para titulação de aglutininas anti "H" e por 18 hs para titulação de aglutininas anti "O".

## 2.13 - REAÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA

### 2.13.1 - Padronização do antígeno "O" para sensibilização das hemácias.

A suspensão bacteriana, rica em antígeno somático "O", após ser autoclavada 1 hora a 120° C, foi resfriada, centrifugada e o sobrenadante diluído 1:10 em salina tamponada pH 7.0.

A dosagem de polissacárides da suspensão bacteriana foi efetuada segundo o método de DUBOIS *et al.* (1956), com a finalidade de se padronizar a quantidade mínima de polissacárides, que promovessem a máxima sensibilização das hemácias, na reação de hemaglutinação passiva. Foram preparadas diluições seriadas do antígeno, e sua densidade óptica determinada a 490 nm em espectrofotômetro Coleman Jr. A concentração de polissacárides foi determinada a partir da curva de calibração da glicose.

### 2.13.2 - Reação

Na reação de hemaglutinação passiva para dosagem das aglutininas anti "O", o soro dos indivíduos chagásicos e controles foi previamente inativado a 56° C durante 30 minutos e absorvido com hemácias de carneiro. A cada 2 ml de soro diluído 1:10, foi adicionado 0,2 ml de papa de hemácias. Após a absorção, a mistura foi centrifugada 2000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante coletado (soro absorvido).

Para um volume do antígeno "O", contendo 72 µg/ml de polissacárides, foi adicionado um volume de hemácias de carneiro a 1% previamente lavadas e padronizadas e logo em seguida incubado a 37° C durante uma hora com agitação intermitente. As hemácias sensibilizadas foram lavadas três vezes com salina tamponada pH 7.0 e ressuspensas para um volume final equivalente a 0,5% dos eritrócitos. As misturas da reação foram constituídas de 50 microlitros de hemácias sensibilizadas e 50 microlitros de diluições seriadas do soro humano. As leituras foram feitas após períodos de incubação de uma hora a 37° C e 18 hs a 4° C, tomando-se como título final a maior diluição do soro que ainda era capaz de aglutinar as hemácias sensibilizadas.

#### 2.14 - DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE IMUNOGLOBULINAS SÉRICAS

Foi utilizada a técnica de imunodifusão radial (MANCINI *et al.*, 1965) para a determinação dos níveis séricos de IgG, IgA, IgM, usando placas de imunodifusão "Tri-Partigen" (BEHRING WERKE AG, MARBURG/LAHN).

#### 2.15 - HEMOGRAMA

Foi realizado segundo as indicações do Comitê de Padronização em Hematologia (1975).

#### 2.16 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados os testes T-"STUDENT" e  $\chi^2$  (quiquadra

do).

O teste do quiquadrado foi empregado pela equação de Brandt-Snedicus, para contrastar as diversas causas de variação. Nos casos de tabelas 2 x 2 que não apresentavam frequências suficientes para aplicação do teste do quiquadrado, utilizou-se o teste Exato de Fisher. A significância dos resultados foi estabelecida ao nível de 5%.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 - REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE RETARDADA NOS PACIENTES CHAGÁSICOS

Para se verificar a capacidade do paciente chagásico crônico desenvolver imunidade mediada por células, os pacientes foram submetidos a testes de hipersensibilidade retardada com os antígenos de Candida, P.P.D., SK-SD, Vírus da Vacinia e DNCB.

Os resultados na tabela 1 expressam a positividade das reações nos dois grupos (induração mínima de 5 mm de diâmetro) 48 hs após aplicação dos antígenos. O número de indivíduos que apresentaram reações positivas foi significativamente menor no grupo chagásico, para os antígenos de Candida ( $p < 0,01$ ) e SK-SD ( $p < 0,05$ ). O total de reações positivas tomadas independentemente dos antígenos foi também significativamente menor ( $p < 0,01$ ) no grupo chagásico.

Pelo fato de existir maior heterogeneidade com relação à idade no grupo chagásico, foi verificado o número de reações positivas nos indivíduos abaixo e acima de 30 anos de idade, fazendo-se uma análise comparativa entre os dois grupos (tabela 2). As diferenças de positividade em relação aos antígenos de Candida e SK-SD persistiram ( $p < 0,01$ ), quando se comparou os indivíduos chagásicos e normais abaixo de 30 anos. Entretanto, estas diferenças não foram significativas nos indivíduos acima de 30 anos.

Analisando-se o total de reações positivas independente

mente dos antígenos, verificou-se diferença significativa apenas nos indivíduos abaixo de 30 anos (tabela 2).

TABELA 1

REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE RETARDADA EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES.

ANTÍGENOS	FREQUÊNCIA DE REAÇÕES POSITIVAS		NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA
	CHAGÁSICOS	CONTROLES	
CANDIDA	14/55	35/69	p < 0,01
P.P.D.	33/55	40/71	NS
SK-SD	30/55	53/72	p < 0,05
VACINIA	50/55	69/70	NS
TOTAL	127/220	197/282	p < 0,01

O numerador indica o número de reações positivas: o denominador indica o número de indivíduos testados.

N.S.: não significante

Quando se comparou a positividade das reações para cada antígeno investigado, nos indivíduos menores e maiores de 30 anos dentro do grupo chagásico, foi verificado que os pacientes mais jovens (menores de 30 anos) deram menos reações posi

TABELA 2

DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DE REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE RETARDADA EM PACIENTES CHAGÁSICOS, RELATIVAS A IDADE

ANTÍGENOS	FREQUÊNCIA DE REAÇÕES POSITIVAS				
	ABAIXO DE 30 ANOS		ACIMA DE 30 ANOS		
	CHAGÁSICOS	CONTROLES	CHAGÁSICOS	CONTROLES	
CANDIDA	3/17	31/58	11/38	4/11	NS
P.P.D.	7/17	31/60	26/38	9/11	NS
SK-SD	3/17	46/61	27/38	7/11	NS
VACINIA	15/17	57/59	35/38	11/11	NS
TOTAL	28/68	165/238	99/152	31/44	

O numerador indica o número de reações positivas; o denominador indica o número de indivíduos testados.

NS.: não significativo

tivas para SK-SD ( $p < 0,01$ ), enquanto que para os outros antígenos não houve diferença significativa. Esta mesma comparação realizada no grupo de normais demonstrou diferença significativa apenas para o P.P.D. (Tabela 3).

Estes resultados sugerem que as reações do tipo hipersensibilidade retardada para estes antígenos não estão comprovadas na Doença de Chagas crônica, embora a frequência de positividade para Candida e SK-SD seja menor em pacientes chagásicos menores de 30 anos. Além dos resultados aqui apresentados, foi encontrado apenas um indivíduo com reação negativa para os 4 antígenos testados. Este paciente apresentava anemia ferropriva considerável.

Considerando que não houve diferença significativa entre os maiores de 30 anos dos grupos chagásico e controle, tomamos o índice de positividade global dos dois grupos como representativo da população em estudo. Por conseguinte dentro de um limite de confiança de 95%, podemos esperar que a positividade da população testada está compreendida entre 19,5% e 44,5% para o antígeno de Candida; entre 57,6% e 82,2% para o PPD; entre 55,5% e 80,5% para SK-SD e 83,5% e 97,9% para a Vacinia (Figura 1).

### 3.2 - SENSIBILIZAÇÃO PELO DNCB

Os indivíduos dos dois grupos foram testados com uma dose sensibilizante de 2000  $\mu\text{g}$  e duas doses desencadeantes de 50 e 100 microgramas. Uma reação de eritema e/ou bolha no local de aplicação da droga foi considerada como reação infla

TABELA 3

DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DE REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE RETARDADA EM PACIENTES CHAGÁSICOS, RELATIVAS A IDADE

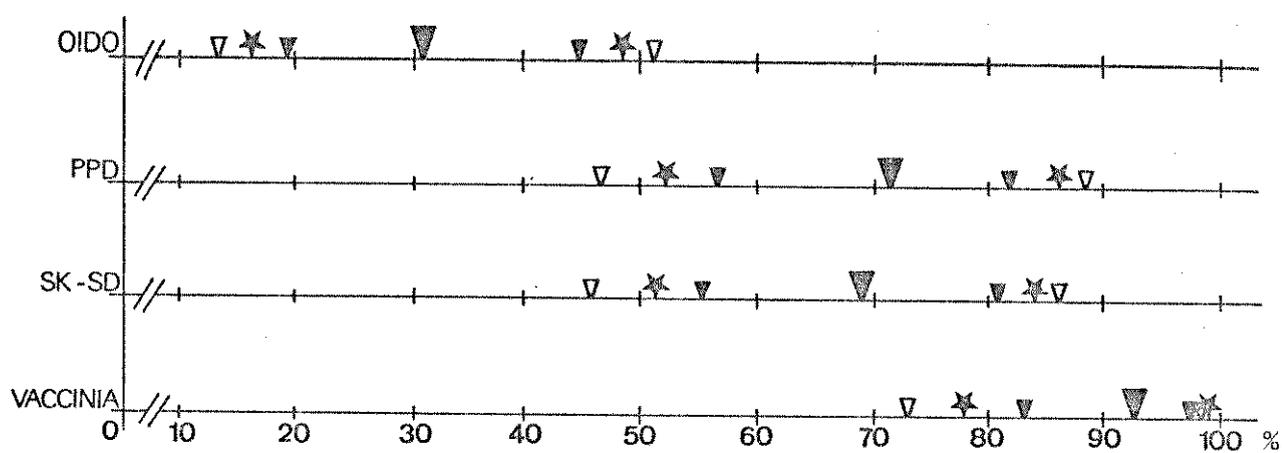
ANTÍGENOS	FREQUÊNCIA DE REAÇÕES POSITIVAS					
	CHAGÁSICOS		CONTROLES			
	MENORES DE 30 ANOS	MAIORES DE 30 ANOS	MENORES DE 30 ANOS	MAIORES DE 30 ANOS		
CANDIDA	3/17	11/38	NS	31/58	4/11	NS
P.P.D.	7/17	26/38	NS	31/60	9/11	p < 0,05
SK-SD	3/17	27/38	p < 0,01	46/61	7/11	NS
VACINIA	15/17	35/38	NS	57/69	11/11	NS

O numerador indica o número de reações positivas e o denominador o número de indivíduos testados.

NS.: não significativo

FIGURA 1

INTERVALOS DE CONFIANÇA AO NÍVEL DE 95% - PORCENTAGENS DE POSITIVIDADE DOS ANTÍGENOS (CONJUNTO CHAGÁSICOS E NÃO CHAGÁSICOS MAIORES DE 30 ANOS)



• LEGENDA •

▼▼▼ INTERVALO AO NÍVEL DE 95% -

★ ★ INTERVALO AO NÍVEL DE 99% -

▽ ▽ INTERVALO AO NÍVEL DE 99,9% -

	OIDO	PPD	SK-SD	VACCINIA
OIDO		***	***	***
PPD			NS	***
SK-SD				***
VACCINIA				

O número total do conjunto chagásico e não chagásico (N=49), dos quais 15 eram positivos para o antígeno de Candida; 35 para o P.P.D.; 34 para SK-SD e 46 para a Vacinia.

matéria inespecífica positiva. Foi observado que tanto os pacientes quanto os indivíduos normais apresentavam esta reação 24 hs após a sensibilização, diminuindo nas 72 hs seguintes.

Quatorze dias após a sensibilização, os indivíduos dos dois grupos apresentavam uma forte reação inflamatória local, caracterizada por eritema e induração, sendo que em alguns deles uma vesiculação também estava presente. Uma reação menos intensa foi verificada após as doses desencadeantes de 50 e 100 microgramas.

Quando se comparou nos dois grupos a positividade das reações para cada dose de DNCB empregada, não foi detectada diferença significativa (tabela 4).

TABELA 4

REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE RETARDADA AO DNCB EM PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES

DOSE-DNCB EM MICROGRAMAS	POSITIVOS		NEGATIVOS		
	CHAGÁSICOS	NORMAIS	CHAGÁSICOS	NORMAIS	
2000	32	20	0	3	NS
100	17	9	11	0	NS
50	11	7	17	3	NS

NS.: não significativo - teste Exato de Fisher

Foi concluído então que ambas as reações, inflamatórias específica e inespecífica, não estão comprometidas nos portadores da Doença de Chagas crônica.

### 3.3 - LINFÓCITOS T PERIFÉRICOS EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

O número de linfócitos T em pacientes com Doença de Chagas, foi determinado medindo-se a porcentagem de linfócitos circulantes com receptores para hemácias de carneiro (ROSETA E). Os resultados na tabela 5 expressam a porcentagem (média aritmética mais ou menos 1 EPM) de linfócitos T no grupo chagásico e normal. No grupo chagásico, detectou-se apenas 39,27% de linfócitos T periféricos comparado a 50,41% nos indivíduos normais. Estes resultados persistiram, quando se comparou no grupo chagásico, os indivíduos maiores e menores de 30 anos.

Os resultados evidenciam, portanto, uma redução significativa ( $p < 0,01$ ) dos linfócitos T circulantes nos pacientes chagásicos independentemente do grupo etário considerado.

### 3.4 - LINFÓCITOS B PERIFÉRICOS EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

Os linfócitos B periféricos em pacientes chagásicos, foram quantificados pela determinação da porcentagem de linfócitos circulantes que possuíam receptores para complemento (ROSETA EAC). Uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) foi

verificada em pacientes chagásicos quando comparada com o grupo controle (tabela 5). Da mesma maneira como para as células T, estes resultados não foram afetados quando se comparou no grupo de chagásicos, indivíduos maiores e menores de 30 anos.

TABELA 5

CÉLULAS T E B PERIFÉRICAS EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

	CHAGÁSICOS	CONTROLES	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA
% LINFÓCITOS T	39,27 $\pm$ 1,37	50,41 $\pm$ 2,20	p < 0,01
% LINFÓCITOS B	20,95 $\pm$ 2,68	24,77 $\pm$ 0,92	p < 0,05

Os resultados expressam a média aritmética mais ou menos 1 EPM.

Pacientes chagásicos N = 60; controles N = 20.

O número absoluto de linfócitos periféricos estava normal no grupo chagásico.

Os resultados são independentes da idade.

### 3.5 - NÍVEIS DE COMPLEMENTO (UCH<sub>50</sub>) EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

O nível de complemento total na infecção crônica pelo *T. cruzi* foi avaliado determinando-se a atividade hemolítica do soro (UCH<sub>50</sub>).

A tabela 6 expressa a média aritmética mais ou menos 1 EPM dos títulos obtidos nos indivíduos chagásicos e normais. Não houve diferença significativa nos níveis de complemento entre os grupos testados.

Foi também determinado o título de hemolisina "natural", visto que anticorpos heterófilos contra hemácias de carneiro foram descritos na Doença de Chagas aguda (CAMARGO, 1976). Novamente nenhuma diferença foi encontrada entre pacientes chagásicos e indivíduos normais (tabela 6). A frequência destes anticorpos "naturais" também não foi diferente entre os dois grupos.

### 3.6 - IMUNOCOMPLEXO NO SORO DE PACIENTES CHAGÁSICOS

Os imunocomplexos foram pesquisados no soro dos pacientes pela reação de precipitação com o polietilenoglicol. Não foi encontrada nenhuma evidência de imunocomplexos no soro dos pacientes.

### 3.7 - NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINAS NO SORO DE PACIENTES CHAGÁSICOS

Os níveis de imunoglobulinas no soro de pacientes chagá

TABELA 6

COMPLEMENTO (UCH<sub>50</sub>), ANTICORPOS HEMOLÍTICOS (UH<sub>50</sub>) e Ig NO SORO DE PACIENTES CHAGÁSICOS.

	COMPLEMENTO		ANT. HETERÓFILOS		Igs. SÉRICAS (mg/100 ml)	
	UCH <sub>50</sub> /ml		UH <sub>50</sub> /ml	IgM	IgG	IgA
CHAGÁSICOS	72.29 ± 3.16		41.28 ± 2.22	81.35 ± 7.20	908.05 ± 33.92	123.41 ± 6.28
CONTROLES	65.59 ± 3.79		41.14 ± 4.75	99.98 ± 9.34	773.00 ± 75.35	108.43 ± 19.05

Os resultados expressam a média aritmética mais ou menos 1 EPM. Pacientes chagásicos n = 36; controles n = 8.

As diferenças entre os grupos não foram significativas (p > 0,01).

sicos foram determinados por imunodifusão radial. A tabela 6 expressa os resultados em mg/100 ml encontrados entre pacientes chagásicos e indivíduos normais.

### 3.8 - RESPOSTA HUMORAL À VACINA T.A.B. EM PACIENTES CHAGÁSICOS

Pacientes e controles foram imunizados com a vacina TAB, aplicada por via intramuscular em duas doses. A resposta humoral para os antígenos "O" e "H" foi determinada 21 dias após a segunda dose. Foi feita uma comparação entre os títulos de aglutininas anti "O" e anti "H", verificados pelas reações de aglutinação (para "H" e "O") e hemaglutinação (para "O") antes e após a vacinação.

Não houve diferença entre chagásicos e normais em relação à resposta para o antígeno "O", quando se comparou os títulos pelas reações de aglutinação e hemaglutinação.

Ambos os grupos (chagásicos e controles) responderam fracamente. Os títulos obtidos antes e após a vacinação dos indivíduos normais não foram superiores a 1:20 na reação de aglutinação e de 1:20 até 1:80 na reação de hemaglutinação. No grupo chagásico, o maior título obtido foi de 1:20 na reação de aglutinação e de 1:40 na reação de hemaglutinação.

Entretanto, uma diferença significativa entre os dois grupos foi verificada na resposta humoral para o antígeno "H", a qual mostrou-se muito baixa no grupo dos chagásicos (tabela 7). Para verificar em que títulos havia maior diferença, testou-se separadamente os diferentes títulos encontrados no grupo dos chagásicos contra os títulos obtidos no grupo

controle. Assim, foi verificado que não havia diferença significativa entre os títulos (dos dois grupos) até 1:160.

No entanto, agrupando-se separadamente os títulos até 1:80, de 1:160 até 1:320 e de 1:640 até 1:1280, havia uma diferença altamente significativa ( $p < 0,001$ ), entre os dois grupos quando se comparou os títulos superiores a 1:640 (tabela 8). Para confirmar este fato, foi feita a comparação entre os títulos até 1:320 e superiores a 1:320, encontrando-se uma diferença significativa ( $P < 0,01$ ). Com estes resultados, foi concluído que os pacientes chagásicos desenvolveram uma resposta humoral significativamente inferior à resposta dos indivíduos normais.

TABELA 7

DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS TÍTULOS DE AGLUTININAS "H" EM  
PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES.

	RECÍPROCA DA DILUIÇÃO DO SORO						TOTAL
	< 1:80	80	160	320	640	1280	
CHAGÁSICOS	8	13	16	11	3	7	58
CONTROLES	0	4	4	2	4	6	20

Títulos de aglutinação observados 21 dias após a imunização.  
Os resultados expressam o número de indivíduos com resposta  
humoral positiva até o título indicado.

TABELA 8

DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DOS TÍTULOS DE AGLUTININAS "H" EM  
PACIENTES CHAGÁSICOS E CONTROLES.

	RECÍPROCA DA DILUIÇÃO DO SORO			TOTAL
	< 1:80 a 1:80	160 a 320	640 a 1280	
CHAGÁSICOS	21	27 (a)	10 (c)	58
CONTROLES	4	6 (b)	10 (d)	20

Títulos de aglutinação observados 21 dias após a imunização.  
 Os resultados expressam o número de indivíduos com resposta  
 humoral positiva até o título indicado.

a - b  $p < 0,01$

c - d  $p < 0,001$

#### 4. DISCUSSÃO

Os trabalhos referentes à resposta imune nas infecções por protozoários em humanos, têm acumulado várias provas experimentais da existência de imunossupressão humoral e/ou celular. Assim, pacientes infectados pelo *Trypanosoma gambiense* respondem pobremente à estimulação com vacina anti *S. typhi* e para os antígenos de Candida, PPD e DNCB (GREENWOOD, 1974). O mesmo estudo realizado em crianças com malária demonstrou que a resposta imune mediada por células estava preservada, enquanto que a resposta humoral para o antígeno "O" de *S. typhi* estava suprimida (GREENWOOD, 1974).

Na infecção com *T. cruzi*, os estudos realizados em camundongos infectados com  $10^4$  ou  $10^5$  parasitas, têm demonstrado comprometimento da resposta humoral e mediada por célula para antígenos não relacionados (RAMOS *et al.*, 1978; REED *et al.*, 1977; RAMOS *et al.*, 1979). Entretanto, animais inoculados com apenas 100 parasitas não apresentam comprometimento da reação de hipersensibilidade retardada para o DNFB (dinitrofluorbenzeno), independentemente da resistência do camundongo para a cepa Y do *T. cruzi* (CORSINI *et al.*, 1980). Conseqüentemente, os estudos em modelos experimentais não se ajustam ao modelo humano, por razões como: o desconhecimento do número de parasitas inoculados pelo vetor, como também as características biológicas peculiares do hospedeiro humano.

Em humanos, foi demonstrado por TEIXEIRA *et*

al. (1978) que pacientes de 1 a 15 anos de idade durante a fase aguda da doença de Chagas, porém sem sintomas aparentes, apresentavam reação de hipersensibilidade retardada testada "in vivo" e "in vitro" negativa para antígenos do *T. cruzi*, como também à sensibilização com o DNCB (dinitroclorobenzeno). Entretanto, os pacientes que apresentavam sintomatologia da fase aguda foram positivos para estes testes e muitos deles mostraram resposta positiva também para o DNCB. Os autores admitem, portanto, que a lesão tecidual observada na doença de Chagas seja dependente da imunidade mediada por células (TEIXEIRA *et al.*, 1978).

A imunossupressão da resposta celular em humanos, observada na fase aguda da infecção com o *T. cruzi*, não ocorre na infecção crônica no que se refere à inibição da migração de leucócitos na presença de extrato do *T. cruzi* (TOLEDO BARROS *et al.*, 1979). Entretanto, dados referentes à resposta imune dirigida para antígenos não relacionados durante a infecção crônica estão faltando.

Nossos resultados demonstram que as reações cutâneas do tipo hipersensibilidade retardada para os antígenos de Candida, PPD, SK-SD e vírus da Vacinia, não se encontram comprometidas em pacientes cronicamente infectados com *T. cruzi* (tabela 1). Entretanto, as reações positivas foram dependentes da idade, visto que os pacientes mais jovens tiveram mais reações negativas para os antígenos de Candida e SK-SD do que os indivíduos mais idosos (tabelas 2 e 3). Estas reações negativas são devidas, provavelmente, à dose de antígeno utilizada para selecionar os pacientes positivos e

negativos, ou então decorrentes da falta de sensibilização aos antígenos de *Candida* e SK-SD e não a uma supressão ativa.

Esta explicação está baseada no fato de que apenas um indivíduo apresentou reação negativa para os 5 antígenos empregados, sendo que todos os outros pacientes reagiram positivamente para dois ou mais antígenos. Verificou-se também que o paciente com as reações negativas estava com anemia ferropriva, tendo sido excluído das outras provas de medida da resposta imune. Além disto, o grupo de pacientes com mais de 30 anos estava constituído principalmente por indivíduos portadores da forma cardíaca (22 de um total de 25 indivíduos), ou com envolvimento digestivo (7 de um total de 8 indivíduos) e apenas alguns na fase assintomática da doença (14 de um total de 26 indivíduos), sugerindo, portanto, que não existe aparentemente uma relação direta entre positividade de reação e evolução da doença.

Conseqüentemente, o tempo de duração da relação hospedeiro-parasita ou mesmo a forma clínica apresentada pelo paciente não devem ter importância na expressão da hipersensibilidade retardada aos antígenos testados, visto que nenhuma diferença significativa foi encontrada, quando se comparou indivíduos maiores de 30 anos dos dois grupos (tabela 2).

Confirmando a suposição de que a infecção com *T. cruzi* não interfere na imunidade mediada por célula verificamos que a sensibilização da pele com o DNCB não está comprometida nos pacientes com doença de Chagas crônica (tabela 4). Além disso, a capacidade da pele desenvolver inflama

ção inespecífica também encontra-se preservada.

Em relação ao grupo controle, verificou-se que a frequência de reações positivas para o PPD foi menor entre os indivíduos abaixo de 30 anos ( $p < 0,05$ ) (tabela 3). É possível que alguns destes indivíduos não tenham se infectado com o bacilo de Koch ou perderam a sensibilidade tuberculínica ou, ainda, tenham inabilidade hereditária ou congênita para desenvolver hipersensibilidade retardada à tuberculina (HSU *et al.*, 1965).

Ficou também demonstrado que pacientes chagásicos e controles com idade superior a 30 anos, constituíram um grupo homogêneo no que diz respeito à reação de hipersensibilidade retardada, verificando-se uma frequência alta de reações positivas para PPD, SK-SD e Vacinia e uma frequência menor de reações positivas para o antígeno de Candida (Figura 1).

Estes fatos se devem provavelmente à alta incidência de tuberculose e infecção por estreptococos e ao amplo uso da vacinação antivariólica no Brasil (FARHAT, 1980).

Portanto, nossos resultados sugerem que a infecção crônica chagásica não interfere com a sensibilização para os antígenos testados. Em outras palavras, a indução ou expressão da imunidade mediada por célula para estes antígenos não foram prejudicadas.

Entretanto, a despeito das reações cutâneas do tipo hipersensibilidade retardada não estarem comprometidas nos pacientes chagásicos, encontrou-se uma diminuição altamen

te significativa ( $p < 0,01$ ) no número de linfócitos circulantes com receptores para hemácia de carneiro (Roseta E), independente da idade dos indivíduos, e uma discreta redução no número de linfócitos com receptores para complemento (linfócito B, roseta EAC), (tabela 5). Contudo, o número absoluto de linfócitos periféricos estava acima de  $1500/\text{mm}^3$  em 85% dos pacientes e abaixo deste valor em apenas 15%.

Este aparente paradoxo, resposta imune mediada por célula normal e número total de linfócitos T, determinado pela roseta E significativamente diminuído, pode ser devido à redução de uma das subpopulações de T, sem que ocorram necessariamente alterações funcionais importantes (KATZ & BENACERRAF, 1972).

Em relação à suposição acima, existem evidências de que as células T periféricas de murinos expressam aloantígenos timo dependentes Thy, Lyl (células T auxiliares) e Ly 2,3 (células supressoras). Da mesma maneira, as células T humanas periféricas expressam um aloantígeno  $\text{TH}_1$ . Assim, as células T foram divididas dentro de  $\text{TH}_1^+$  (60%) ou  $\text{TH}_1^-$  (40%), dependendo da expressão do antígeno. As células  $\text{TH}_1^+$  proliferam em resposta a aloantígenos em cultura mista de linfócitos e elaboram fator mitogênico, porém não desenvolvem uma resposta proliferativa mensurável para os antígenos da caxumba, P.P.D. e toxóide tetânico como o fazem as células  $\text{TH}_1^-$ . Os dados sugerem que a resposta imune celular em humanos é mediada pelo menos por duas sub-linhagens de linfócitos T (EVANS *et al.*, 1977). Reforçando esta suposição, MORETTA *et al.* (1977) identificaram funcionalmente duas sub-li

nhagens distintas de linfócitos T, baseadas na presença de receptores Fc para IgM e IgG, mostrando que as células auxiliares contêm receptores para IgM ( $T_M$ ) e as células supressoras receptores para IgG ( $T_G$ ).

Embora seja controverso correlacionar dados obtidos em experimentos realizados "in vitro" com aqueles obtidos "in vivo", fatos como hipersensibilidade retardada normal, número total de linfócitos T e B circulantes reduzidos, supressão na resposta humoral para o antígeno "H" de *S. typhi*, além dos autoanticorpos circulantes (COSSIO *et al.*, 1974a; KHOURY *et al.*, 1979), nos levam a supor que na doença causada pelo *T. cruzi* ocorreria um desequilíbrio na homeostase imune. Este desequilíbrio poderia ser resultado da perda da sub-linhagem de células T indutoras ou da ativação da população de células T supressoras (REINHERZ and SCHLOSSMANN, 1980). Contudo, o número absoluto de linfócitos no sangue periférico normal e a soma das porcentagens de linfócitos T e B muito reduzida (60,22%), nos fazem supor também que exista um aumento na população de células não T e não B, possivelmente células "null".

Naturalmente, esta discussão sobre influência de sub-linhagens de células T é muito especulativa, tendo em vista que não realizamos nenhum teste para distinguir as duas maiores sub-linhagens de células T funcionalmente distintas. Contudo, os nossos resultados indicam que este aspecto deve ser bem considerado em novos estudos, principalmente porque são os linfócitos T que possuem a capacidade de reconhecer antígenos específicos, executar funções efetoras e regular o

tipo e intensidade da resposta imune humoral e celular (REINHERZ & SCHLOSSMAN, 1980).

Entretanto, foi demonstrado por LELCHUCK *et al.* (1977), que o Nifurtimox (Bayer) promove uma imunossupressão da resposta celular para antígenos do *T. cruzi* em pacientes com a infecção crônica chagásica, assim como para P.P.D. em cobaias inoculadas com BCG (LELCHUCK *et al.*, 1977a). Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre o número ou porcentagem de linfócitos periféricos com receptores para hemácia de carneiro ou de linfócitos com receptores para complemento (Roseta EAC - linfócito B), entre os indivíduos controles e chagásicos tratados e não tratados com Nifurtimox (LELCHUCK *et al.*, 1977). Estes resultados afirmam, portanto, que não existem diferenças entre chagásicos em tratamento e não chagásicos, no que diz respeito a ambas as populações de linfócitos periféricos. Contudo, nossos resultados demonstram claramente o contrário, ou seja, reações cutâneas do tipo hipersensibilidade retardada normais para antígenos não relacionados e populações de linfócitos T e B periféricos reduzidas.

Um fato importante dos nossos resultados que vem reforçar as suposições anteriores, foi a diferença significativa ( $p < 0,01$ ) encontrada nos pacientes chagásicos com títulos superiores a 1:320 e altamente significativa ( $p < 0,001$ ) nos títulos superiores a 1:640, quando comparados com a resposta humoral dos indivíduos normais, para o antígeno "H" (tabela 8). Uma correlação entre a fase clínica da doença e uma resposta humoral menor não foi verificada. Esta redução

provavelmente não decorre da dose, natureza ou apresentação do antígeno, visto que foi utilizada a mesma vacina e o mesmo esquema de imunização nos dois grupos.

Entretanto, embora tenha sido descrito que a flagelina polimerizada purificada de *Salmonella adelaide* seja um antígeno timo independente, deve-se esclarecer que este fato foi demonstrado em camundongo letalmente irradiado e reconstituído com células de medula óssea. Além disso, é descrito também que os antígenos timo independentes produzem anticorpos principalmente da classe IgM (KATZ & BENACERRAF, 1972). No entanto, em ratos, a flagelina polimerizada é altamente imunogênica, produzindo inicialmente anticorpos da classe IgM e em seguida da classe IgG. Do mesmo modo, a flagelina preparada pela desagregação do flagelo é também imunogênica em ratos, embora produza apenas anticorpos da classe IgG (NOSSAL and ADA, 1971).

Analisando estes fatos, podemos supor, portanto, que a imunogenicidade do antígeno empregado (vacina TAB) está diretamente relacionada a sua interação com as células imunocompetentes do hospedeiro, isto é, não apenas uma interação entre as sub-linhagens de linfócitos T (REINHERZ & SCHLOSSMANN, 1980), mas também entre as células T e B e células acessórias (leucócitos polimorfonucleares e mononucleares). Esta conclusão está baseada no fato de que a flagelina desenvolve anticorpos predominantemente da classe IgG (BELLANTI, 1978) e esta resposta de memória ("Switch"-IgM-IgG) depende geralmente do efeito regulatório das células T (KATZ & BENACERRAF, 1972).

Contudo, embora nossos dados não permitam afirmar que existe uma imunossupressão humoral para o antígeno "H", podemos concluir que os indivíduos chagásicos quantificaram uma resposta mais baixa, decorrente provavelmente de uma alteração no mecanismo de regulação da produção de anticorpos.

Favorecendo esta possibilidade, considera-se que na infecção por *T. brucei* e por *T. cruzi*, o período de imunossupressão é precedido de um período de imunoestimulação (HUDSON *et al.*, 1976; SCHMUNIS *et al.*, 1977a). Considerações especulativas foram feitas a respeito de uma possível alteração do controle que as células T exercem sobre as células B, promovendo conseqüentemente uma estimulação policlonal acentuada das células B. Uma vez que estes anticorpos tenham sido originados, sua produção posterior já não seria regulada devido ao desequilíbrio entre as células T e B (SCHMUNIS, 1978).

Na Tripanosomíase americana, as informações existentes no que diz respeito às concentrações totais de IgM, IgG e IgA, nas fases aguda e crônica da infecção, são em parte contraditórias, visto que alguns autores encontram valores elevados e/ou normais (LELCHUCK *et al.*, 1970); MARSDEN *et al.*, 1970; VATTUONE *et al.*, 1973; ABLIN & CANESE, 1973; FREITAS *et al.*, 1976). Este fato pode ser devido à origem geograficamente diversa dos soros empregados como controles normais (LELCHUCK *et al.*, 1970; VATTUONE *et al.*, 1973) ou então à ausência de dados sobre as áreas em que as amostras foram coletadas (ABLIN & CANESE, 1973). Conseqüentemente,

torna-se difícil estabelecer uma possível correlação entre o nível sérico das imunoglobulinas e a fase da infecção. Neste trabalho, a quantificação das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM pela técnica de MANCINI *et al.* (1965) não demonstrou diferença significativa ( $p > 0,01$ ) entre chagásicos e controles.

Tem sido descrito na infecção aguda pelo *T. cruzi* uma macroglobulinemia coincidente com a existência de anormalidades nos níveis de anticorpos heterófilos (HENDERSON-BEGG, 1946). Vários autores confirmam este fato. Encontrou-se uma resposta heterófila a hemácias de carneiro nos estágios iniciais de infecção chagásica em cães (GOBLE, 1952) e camundongos (SCHMUNIS *et al.*, 1977a) e nas fases aguda e crônica em seres humanos (MUNIZ & SANTOS, 1950; GOES & BRUNO LOBO, 1950; FREITAS, 1952; AMATO NETO & PEREIRA DA SILVA, 1954; SACKMAN MURIEL, 1968; LELCHUCK *et al.*, 1970).

Na infecção experimental por *T. brucei* tem-se proposto uma possível ativação policlonal intensa, que originaria uma produção de IgM não totalmente específica (HOUBA & ALLISON, 1966; HOUBA *et al.*, 1969; HUDSON *et al.*, 1975 e 1976). A heterofilia da infecção por *T. cruzi* poderia ter essa origem, ainda mais porque é possível a existência de antígenos comuns entre as hemácias e os epimastigotas de *T. cruzi* (LELCHUCK *et al.*, 1970). Neste caso, poderia ser estabelecido um paralelismo com o que ocorre nas infecções por tripanosomas africanos.

Entretanto, nossos resultados demonstraram títulos elevados de anticorpos heterófilos (UH<sub>50</sub>) em chagásicos

e normais e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada quando se comparou os títulos dos dois grupos (tabela 6). Em 5 indivíduos chagásicos, o título  $UH_{50}$  foi bastante elevado de modo que impediu a titulação do complemento ( $UCH_{50}$ ); em 10 indivíduos chagásicos e em 4 normais, foi verificado que os títulos de anticorpos heterófilos ( $UH_{50}$ ) e de complemento total ( $UCH_{50}$ ) foram iguais. Portanto, é muito provável que outras infecções inaparentes, concomitante com a infecção por *T. cruzi*, sejam responsáveis pela presença desses anticorpos. Deve-se também levar em consideração que no grupo chagásico, foram encontrados valores superiores a 8.500 leucócitos por  $mm^3$  em 25% dos pacientes.

Embora não exista nenhuma evidência de que imunocomplexos circulantes sejam responsáveis pela patogênese da Doença de Chagas, na fase crônica há uma parasitemia muito baixa em comparação ao que é observado na fase aguda (WHO, 1974). Conseqüentemente, este fato contribui para um estímulo antigênico persistente, porém de baixa intensidade. Portanto, na ausência de um excesso de antígeno, é de se esperar que os pacientes em fase crônica não apresentem imunocomplexos circulantes. Nos pacientes estudados não foi detectado imunocomplexo circulante e o complemento estava normal. Contudo, é possível que outros métodos de investigação de imunocomplexos sejam mais sensíveis, a despeito da correlação altamente significativa obtida entre as técnicas de ligação ao  $C_{1q}$  marcado com  $^{125}I$ , o teste de fixação do complemento e a precipitação pelo polietilenoglicol, todas elas aplicadas na pesquisa de imunocomplexos em esquistossomose (BOUT *et al.*, 1976).

Verificamos, portanto, que os únicos dados que expressaram alterações na resposta imune do hospedeiro foram o número porcentual de linfócitos T significativamente reduzido e uma resposta humoral menor para o antígeno "H" de *S. typhi*.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho, realizou-se um estudo transversal, descritivo e analítico em indivíduos na fase crônica da Doença de Chagas, tendo-se como objetivo principal a verificação da reatividade imunológica geral dos pacientes.

Os parâmetros estudados foram:

1. Reação de hipersensibilidade retardada mediada através de testes cutâneos com os antígenos oidiomicina (candida), estreptoquinase - estreptodornase (Sk-SD), P.P.D. (derivado protéico purificado), vírus da vacinia (VV) e dinitroclorobenzeno (DNCB).

2. Contagem de linfócitos periféricos com receptores para hemácia de carneiro (linfócito T) e com receptores para complemento (linfócito B).

3. Resposta humoral para a vacina contra febre tifóide (vacina TAB).

4. Dosagem das imunoglobulinas séricas IgG, IgA e IgM.

5. Titulação dos anticorpos heterófilos (UH<sub>50</sub>).

6. Titulação do complemento sérico (UCH<sub>50</sub>).

7. Pesquisa de imunocomplexo circulante.

8. Hemograma.

Os resultados obtidos permitem fazer as seguintes

tes conclusões:

1. As reações cutâneas do tipo hipersensibilidade retardada foram normais, embora os indivíduos abaixo de 30 anos possam apresentar reações negativas para os antígenos de candida oidiomicina e SK-SD.

2. O número de linfócitos T estava significativamente reduzido ( $p < 0,01$ ), sem haver, no entanto, uma redução no número absoluto de linfócitos do sangue periférico. Embora tenha sido observado uma redução no número de linfócitos B circulantes, ( $p < 0,05$ ), provavelmente esta redução não é fisiologicamente importante.

3. A medida quantitativa das três maiores classes de imunoglobulinas séricas, IgG, IgA e IgM, estava normal.

4. Alterações nos níveis séricos do complemento ( $UCH_{50}$ ), não foram observadas.

5. Anticorpos heterófilos, embora presentes em títulos elevados, não foram estatisticamente diferentes dos títulos encontrados no grupo controle.

6. Imunocomplexos circulantes não foram detectados pela técnica de precipitação com o polietileno-glicol.

7. A resposta humoral para o antígeno "H" de *S. typhi* foi significativamente menor ( $p < 0,01$ ) quando se comparou os indivíduos dos dois grupos (chagásicos e controles) com títulos superiores a 1:320, sendo que esta diferença tornou-se mais evidente quando a comparação foi realizada

entre os indivíduos com títulos superiores a 1:640 ( $p < 0,001$ ).

8. Conclui-se que os únicos dados indicativos de que existe alteração na homeostase do sistema imune do hospedeiro foram: redução significativa no número percentual de linfócitos T periféricos com conseqüente diminuição na soma total de linfócitos T e B e uma resposta humoral significativamente menor para a vacina contra febre tifóide.

O conjunto de resultados sugere, portanto, que deve existir um desequilíbrio na regulação da produção de anticorpos. Este desequilíbrio pode ocorrer não apenas entre as duas sub-linhagens de linfócitos T periféricos, mas também entre classes de linfócitos e células acessórias, tais como leucócitos mononucleares e polimorfonucleares.

6. BIBLIOGRAFIA

01. ABLIN, R. J.; CANESE, A. (1973). Immunoglobulins and complement in Chagas' disease, *Zbl. Bakt. Hyp.* 223,125
02. ALLISON, A. C. (1963). Immunity to Protozoa (Garnham, P. C. C., Pierce, A. E. & Roitt, I., eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 109.
03. AMATO NETO, V.; PEREIRA da SILVA, L. H. (1954). Anticorpos heterófilos na Doença de Chagas. Resultados obtidos em casos agudos e crônicos. *Hospital*, 45,159.
04. ANSEMI, A. and MOLEIRO, F. (1974). Pathogenic Mechanisms in Chagas's cardiomyopathy. In: Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease. Ciba Foundation Symposium 20 (New Series) Amsterdam. Associated Scientific Publishers, p. 125.
05. ANZIANO, D. F., DALMASSO, A. F.; LELCHUCK, R., VAZQUEZ, C. (1972). Role of complement in immunelysis of *T. cruzi*. *Infect Immun.* 6, 860.
06. ASKONAS, B. A., CORSINI, A. C., CLAYTON, C. E. and OGILVIE, B. M. (1979). Functional depletion of T and B memory cells and other lymphoid cell subpopulation during Trypanosomiasis. *Immunol.* 36, 313.
07. BELLANTI, J. A. (1978). Diagnostic Applications of

Immunology. In: Immunology II. Ed, by W. B. Saunders Company (2<sup>nd</sup> Ed.), p. 758.

08. BOUT, D., SANTORO, F., CARLIER, Y., BINA, J. C. & CAPRON, A. (1976). Circulating immune complexes in schistosomiasis. *Immunol.* 33, 17.
09. BÖYUM, R. (1968). Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest* 29 (Suppl. 97), 77.
10. BUDZKO, D. B., PIZZIMENTI, M. C., KIERSZENBAUM, F. (1975). Effects of complement depletion in experimental Chagas disease: Immune lysis of virulent blood forms for *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 11, 86.
11. BUTCHER, G. A., MITCHELL, G. H. & COHEN, S. (1973). Mechanism of host specificity in malaria infection. *Nature (Lond.)* 244, 40.
12. CAMARGO, M. E. (1976). Identificação no Laboratório clínico de Doença de Chagas pós transfusional não suspeitada. *Rev. Bras. Patologia Clínica* 12, 201.
13. CATALONA, W. J., TAYLOR, P. T. and CHRETIEN, P. B. (1972) Quantitative dinitrochlorobenzene contact sensitization in a normal population. *Clin. Exp. Immunol.* 12, 325.

14. COHEN, S. (1974). The immune response to parasites. In: Parasites in the Immunized Host: Mechanisms of Survival. Ciba Foundation Symposium 25 (New Series). Associated Scientific Publishers, p. 3.
15. COHEN, S. (1975). Immunoprophylaxis of Protozoal Diseases. In: Clinical Aspects of Immunology. Ed. by P. G. H. Gell, RRA. Coombs and P. J. Lachmann (3 rd. ed.) Blackwell Scientific Publications.
16. Comitê de Padronização em Hematologia, (1975). Manual de Técnicas e Recomendações Hematologia. XII Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. São Paulo - SP.
17. COOMBS, R. R. A. and GELL, P. G. H. (1975). Classification of Allergic Reactions Responsible for Clinical Hypersensitivity and Disease. In: Clinical Aspects of Immunology. Ed., by P.G.H. Gell; R.R.A. Coombs and P.J. Lachmann (3 rd. ed) Oxford: Blackwell, p. 761.
18. CORSINI, A. C., CLAYTON, C., ASKONAS, B. R. and OGILVIE, B. M. (1977). Suppressor cells and loss of B cell Potential in mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Clin. exp. Immunol* 29, 122.
19. CORSINI, A. C., OLIVEIRA, O. L. P. and COSTA, M. G. (1980). Unimpaired delayed type hypersensitivity

reactions in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strain Y. Z. *Parasitenkd.* 61, 179.

20. COSSIO, P. M., DIEZ, C., SZARFMAN, A., KREUTZER, E., CANDIOLO, B. and ARANA, R. M. (1974 a). Chagasic cardiopathy: Demonstration of a serum gammaglobulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation* 49, 13.
21. COSSIO, P. M., LAGUENS, R. P., DIEZ, C., SZARFMAN, A., SEGAL, A. and ARANA, R. M. (1974 b). Chagasic cardiopathy: Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation* 50, 1252.
22. DENISON, N. (1943 a). Immunologic studies in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Lysins in blood of infected rats. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 52, 26.
23. DENISON, N. (1943 b). Experimental studies on *Trypanosoma cruzi* infection and reticuloendothelial blockade in rats. *J. trop. Med Hyg.* 38, 178.
24. DIGEON, M., LAYER, M., RIZA, J. and BACH, J. F. (1977). Detection of circulating immune complexes in human sera by simplified assays with polyethylene glycol. *J. Immunol. Methods* 16, 165.
25. DOROZYNSKY, A. (1976). The Attack on tropical disease. *Nature* 262, 85.

26. DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., RIBEIRO, P. A. and SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350.
27. EDWARDS, P. R. and EWING, W. H. (1972). Identification of Enterobacteriaceae (3 rd ed.). Burgess Publishing CO. Minneapolis.
28. EVANS, R. L., BREARD, J. M., LAZARUS, H., SCHLOSSMAN, S. F. and CHESS, L. (1977). Detection, isolation, and functional characterization of two human T-cell subclasses bearing unique differentiation antigens. *J. exp. Med.* 145, 221.
29. FARHAT, C. K. (1980). Fundamentos e Prática das Imunizações. 1ª Ed. Medisa Editora Ltda. São Paulo-SP.
30. FREITAS, J. L. P. (1952). O diagnóstico de laboratório da moléstia de Chagas. *Rev. Clin. São Paulo* 28, 1.
31. FREITAS, G. de, COSTA, S. C. G. da, PEREIRA, N. M., QUINTAO, L. G., SOUZA, J. G. de, (1976). Imunoglobulinas na fase crônica da Doença de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 74, 183.
32. GOBLE, F. C. (1952). Observation on experimental Chagas' disease in dogs. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 1, 189.
33. GOBLE, F. C. (1970). South American Trypanosomes.

*Immunity to animal Parasites* 2, 596.

34. GOES, P., BRUNO LOBO, M. (1950). Sobre o comportamento do anticorpo heterólogo ocorrente na Doença de Chagas. *Arq. bras. de Med.* 40, 307.
35. GREENWOOD, B. M. (1968). Autoimmune diseases and parasitic infections in Nigerians. *Lancet* 2, 380.
36. GREENWOOD, B. N. (1974). Immunosuppression in malaria and trypanosomiasis. In: "Parasites in the immunized host: mechanisms of survival". Eds. R. Porter and J. Knight. Ciba Foundation Symposium 25 (New Series) Associated Scientific Publishers, p. 137.
37. GREENWOOD, B. M. and VICK, R. M. (1975). Evidence for a malaria mitogen in human malaria. *Nature* 257, 592.
38. HANSON, W. L. (1976). Immunology of American trypanosomiasis. In: "Immunology of parasitic infections" (Eds. S. Cohen and E. Sadum). Blackwell Scientific Publications, 222.
39. HENDERSON-BEGG, A. (1946). Heterophile antibodies in trypanosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 40, 331.
40. HOUBA, V., ALLISON, A. C. (1966). M - antiglobulins (rheumatoid factor - like globulins) and other

gammaglobulins in relation to tropical parasitic infections. *Lancet* *i*:848.

41. HOUBA, V., BROWN, K. N., ALLISON, A. C. (1969). Heterophile antibodies, M-antiglobulins and immunoglobulins in experimental trypanosomiasis. *Clin. Exp. Immunol* *4*, 113.
42. HSU, K. H. K., CARREON, A. T., JEU, F. y JENKINS, D. E. (1965). Concepto Actual de la Prueba Tuberculinica. *Boletin de La Oficina Sanitaria Panamericana*, agosto, 122.
43. HUDSON, K. M., FREEMAN, J. C., BYNER, C., TERRY, R. J. (1975). Immunodepression in experimental african trypanosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* *69*, 273.
44. HUDSON, K. M., BYNER, C., FREEMAN, J. C., TERRY, R. J. (1976). Immunodepression, high IgM levels and evasion of the immune response in murine trypanosomiasis. *Nature* *264*, 256.
45. JAYAWARDENA, A. N. and WAKSMAN, B. H. (1977). Supressor cells in experimental trypanosomiasis. *Nature* *265*, 539.
46. KATZ, D. H. and BENACERRAF, B. (1972). The regulatory influence of activated T cells on B cells responses

to antigen. *Adv. Immunol.* 15, 1.

47. KHOURY, E. L., RITACCO, V., COSSIO, P. M., LAGUENS, R. P., SZARFMAN, A., DIEZ, C. and ARANA, R. M. (1979). Circulating antibodies to peripheral nerve in american trypanosomiasis (Chagas'disease). *Clin. exp. Immunol.* 36, 8.

48. KIERSZENBAUM, F., IVANYI, J., BUDZKO, D. B. (1976). Mechanism of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol.* 30, 1.

49. KÖBERLE, F. (1974). Pathogenesis of Chagas'disease. In: trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas'disease. Ciba Foundation Symposium 20 (New Series) Amsterdam: Associated Scientific Publishers, p, 137.

50. LAGUENS, R. P., COSSIO, P. M., DIEZ, C., SEGAL, A., VAZQUEZ, C., KREUTZER, E., KHOURY, E. and ARANA, R. M. (1975). Immunopathologic and morphologic studies of skeletal muscle in Chagas'disease. *Am. J. Pathol.* 80, 153.

51. LELCHUCK, R., DALMASSO, A. P., INGLESINI, C. L., ALVAREZ, M., CERISOLA, J. A. (1970). Immunoglobulin studies in serum of patients with American trypanosomiasis (Chagas'disease). *Clin. Exp. Immunol.* 6, 547.

52. LELCHUCK, R., CARDONI, R. L., FUKS, A. S. (1977). Cell mediated immunity in Chagas disease. Alterations induced by treatment with a trypanocidal drug (Nifurtimox). *Clin. Exp. Immunol.* 30, 434.
53. LELCHUCK, R., CARDONI, R. L., LEVIS, S. (1977 a). Nifurtimox induced alterations in the cell mediated immune response to PPD in guinea pigs. *Clin. Exp. Immunol.* 30, 469.
54. LOWRY, O. H., ROSENBOUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDAL, R. J. (1951). Protein measurement with the pholin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
55. MACEDO, V. (1980). Forma Indeterminada da Doença de Chagas. *J. Bras. de Medicina* 38, 34.
56. MANCINI, G., CARBONARA, A. O. and HEREMANS, J. F. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2, 235.
57. MARSDEN, P. D., SEAH, S. K. K., MOTT, K. E., PRATA, A., PLATT, H. (1970). Immunoglobulins in Chagas's disease. *J. Trop. Med. Hyg.* 73, 157.
58. MARSDEN, P. D. (1971). South American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Int. Rev. Trop. Med.* 4, 97.
59. MAUEL, J., BEHIN, R., BIROUM-NOERJASIN & DOYLE, J. J.

- (1974). Survival and death of *Leishmania* in macrophages. In: "Parasites in the immunized host: mechanisms of survival". (Eds. R. Porter and J. Knight). Ciba Foundation Symposium 25 (New Series) Associated Scientific Publishers, p. 225.
60. MAYER, M. M. (1971). Complement and Complement Fixation. In: "Experimental Immunochemistry" (Eds. E.A. Kabat and M. M. Mayer) Charles C. Thomas Publisher, p. 133.
61. MORETTA, L. S., WEBB, S. R., GROSSI, C. E., LYDYARD, P. M. and COOPER, M. D. (1977). Functional analysis of two human T cell subpopulations help and suppression of B cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG. *J. Exp. Med.* 146, 184.
62. MUNIZ, J., BORRIELLO, A. (1945). Estudo sobre a ação lítica dos diferentes soros sobre as formas de cultura e sanguícolas do *Schizotrypanum cruzi*. *Rev. bras. Biol.* 5, 563.
63. NOSSAL, G. J. V. and ADA, G. L. (1971). Antigens and the afferent limb of the immune response. In: Antigens, lymphoid cells, and the immune response. Ed. by F. J. Dixon, Jr. and Henry G. Kunkel. Academic Press New York and London.
64. NUSSENZWEIG, W. and PINCUS, C. S. (1972). C<sub>3</sub> receptor sites on leucocytes: possible role in opsonization

- and in the immune response. *Contemp. Top. Immunobiol.* 1, 69.
65. OLIVEIRA LIMA, A., DIAS DA SILVA, W. (1970). Preparação e Padronização de antígenos e vacinas bacterianas. In: *Imunologia, Immunopatologia, Alergia*. Ed. Guanabara Koogan S.A. - Rio de Janeiro.
66. PENNER, J. L. and HENNESSY, J. N. (1979). The antigen grouping of *Morganella morgani* (*Proteus morgani*) by slide agglutination. *J. Clin. Microbiol.* 10, 8.
67. RAMOS, C., LAMOYI, E., FEOLI, M., RODRIGUEZ, M., PEREZ, M. and ORTIZ-ORTIZ, L. (1978). *Trypanosoma cruzi*: Immunosuppressed responses to different antigens in the infected mouse. *Exp. Parasitol.* 45, 190.
68. RAMOS, C., SCHÄDTLER-SIWON, I. and ORTIZ-ORTIZ, L. (1979) Suppressor cells present in the spleens of *Trypanosoma cruzi* infected mice. *J. Immunol.* 122, 1243.
69. REED, S. C., LARSON, C. L. and SPEER, C. A. (1977). Suppression of cell - mediated immunity in experimental Chagas disease. *Z. Parasitenkd.* 52, 11.
70. REINHERZ, E. L. and SCHLOSSMAN, S. F. (1980). Regulation of the Immune Response Induce and Suppressor T-Lymphocyte Subsets in Human Beings. *New Engl. J. of Med.* 303, 370.

71. ROBERSON, E. L., HANSON, W. L., CHAPMAN, W. L. (1973).  
*Trypanosoma cruzi*: effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal Thymectomy in rats. *Exp. Parasit* 34, 168.
72. SACKMAN MURIEL, F. (1968). Enfermedad de Chagas, linfocitos atipicos y reaccion de Paul-Bunnell Davidsohn. *Rev. Hosp. Niños* (Buenos Aires) 39, 177.
73. SANTOS-BUCH, C. A. and TEIXEIRA, A. R. L. (1974). The immunology of experimental Chagas'disease: III Rejection of Allogenic heart cells in vitro. *J. Exp. Med.* 140, 38.
74. SCHMUNIS, G. A., GONZALES CAPPA, S. M., TRAVERSA, O. C., YANOSVSKY, J. F. (1971). The effect of imunodepression due to neonatal thymectomy on infections with *Trypanosoma cruzi* in mice. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.* 65, 89.
75. SCHMUNIS, G. A., SZARFMAN, A., PESCE, U. J., GONZALEZ CAPPA, S. M. (1977 a). The effect of acute infection by *Trypanosoma cruzi* upon the response of mice to sheep erythrocytes. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 19, 323.
76. SCHMUNIS, G. A. (1978). A resposta imune humoral na infecção humana recente pelo *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado, apresentada no Instituto de Microbio-

logia da UFRJ, Rio de Janeiro,

77. SPITLER, L. E., Delayed hypersensitivity skin testing (1976). In: Manual of clinical Immunology. (Eds. N. R. Rose and H. Friedman) American Society for Microbiology, p. 56.
78. TAKEHARA, H. A. and MOTA, I. (1979). Role of different antibody classes in protection against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Abstracts International Congress of Chagas'disease, p. 157.
79. TEIXEIRA, A. R. L., TEIXEIRA, M. L. and SANTOS BUCH, C. A. (1975). The immunology of experimental Chagas disease: IV Production of lesions in Rabbits similar to those of chronic Chagas'disease in man. Am. J. Pathol 80, 163.
80. TEIXEIRA, A. R. L., TEIXEIRA, G., MACEDO, V. and PRATA, A. (1978). Acquired cell - mediated Immunodepression in acute Chagas'disease. J. clin. Invest. 62, 1132
81. TERRY, R.J., FREEMAN, J., HUDSON, K. M. and LONGSTAFFE, J. A. (1973). Immunoglobulin M production and Immunosuppression in trypanosomiasis: A linking hypothesis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 67, 263.
82. TOLEDO BARROS, M. A. M., AMATO NETO, V., MENDES, E. and MOTA, I. (1979). *In vitro* cellular immunity in

Chagas'disease. *Clin. Exp. Immunol.* 38, 376.

83. VATTUONE, N. H., SZAREFMAN, A., GONZALES CAPPA, S. M. (1973). Antibody response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic *Trypanosoma cruzi* infections (Chagas'disease). *J. Trop. Med. Hyg.* 76(2), 45.
84. WILSON, G. S. and MILES, A. A. (1964). Enteric infections. In: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. Eds. Wdward Arnold Ltd. Publishers, p. 1833.
85. WINCHESTER, R. J. and ROSS, G. (1976). Methods of enumerating lymphocyte populations. In: Manual of Clinical Immunology (Eds. N. R. Rose and H. Friedman). American Society for Microbiology, p. 64.
86. World Health Organization (1974). Memoranda. Immunology of Chagas'Disease. *Bull. World Org.* 50, 459.
87. World Health Organization (1977). Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Buenos Aires, Argentina, 14-18 November.