

## ASPECTOS SOROLÓGICOS NA PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPÊUTICA NA DOENÇA DE CHAGAS

José Lima Pedreira de FREITAS (1)

### RESUMO

Ao analisar o valor dos métodos sorológicos para avaliação dos efeitos da terapêutica na moléstia de Chagas, o autor chama a atenção para que devem ser considerados separadamente os resultados fornecidos por êstes processos na forma aguda ou na forma crônica da doença.

Na fase aguda, principalmente reações de precipitação intensas têm sido obtidas precocemente em alta percentagem dos casos, porém o título dessas reações cai em curto prazo, independentemente da terapêutica instituída.

Na fase crônica a avaliação do efeito terapêutico de uma droga é dificultada pela longa duração da moléstia, pelo seu caráter evolutivo, porém nem sempre com agravação progressiva e porque a lesão fundamental nessa infecção se assesta nas células do sistema nervoso, incapazes de regeneração. Por outro lado, nessa protozoose é baixo o teor de anticorpos, sendo de se supor que êles possam se combinar, ao menos parcialmente, com o antígeno "in vivo". O autor passa, em seguida, a considerar os resultados fornecidos pelas técnicas sorológicas denominadas quantitativas quando aplicadas às formas crônicas da moléstia de Chagas, analisando as dificuldades apresentadas na padronização dessas reações.

De acôrdo com o enunciado do tema que nos foi proposto, em nossa exposição procuraremos abordar fundamentalmente os aspectos ligados à padronização dos métodos sorológicos para avaliação dos efeitos da terapêutica na doença de Chagas. Isso porque somente uma compreensão mais exata dêsses métodos, de suas possibilidades e limitações, poderá permitir formar-se um juízo sôbre os resultados que se poderá obter com a sorologia no mesmo indivíduo em épocas diferentes, submetido ou não à ação de agentes terapêuticos.

Por outro lado, para analisar os resultados fornecidos pela sorologia na moléstia de

Chagas, principalmente do ponto de vista de "sorologia quantitativa", será necessário considerar alguns problemas da sorologia quantitativa em geral, ao lado de peculiaridades ligadas à evolução da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro vertebrado.

No caso particular da moléstia de Chagas, os métodos sorológicos têm importância diversa quando aplicados para se avaliar o resultado de uma terapêutica instituída na fase aguda ou na fase crônica.

Na fase aguda, a influência de um medicamento sôbre as perturbações do estado geral, a febre e, principalmente, sôbre a pa-

Comunicação à Reunião de Debates sôbre Doença de Chagas, realizada no Rio de Janeiro, GB, de 19 a 21 de março de 1962. Exposição baseada em trabalhos realizados com auxílio do Convênio celebrado entre o Ministério da Saúde (D.N.E.Ru.) e a Secretaria da Saúde Pública e Assistência Social do Estado de São Paulo.

(1) Professor de Higiene e Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

rasitemia, permitem em geral apreciar o seu efeito imediato. O dado mais objetivo é a diminuição ou desaparecimento dos tripanosomas no sangue periférico pelo exame direto, o que deverá sempre ser completado pelo xenodiagnóstico feito com repetição.

Reações de precipitação positivas intensas têm sido obtidas precocemente em alta porcentagem na fase aguda usando-se a fração extraída do *T. cruzi* pelo método descrito por Füller para o *Streptococcus haemolyticus* por MUNIZ & FREITAS<sup>26</sup>. Contudo, independentemente de qualquer terapêutica instituída, a intensidade dessas reações de precipitação cai rapidamente, obtendo-se não mais do que cerca de 20% de resultados positivos na fase crônica da moléstia de Chagas, conforme demonstraram MUNIZ & FREITAS<sup>27</sup>.

O mesmo se dá com as reações de aglutinação de culturas vivas do *T. cruzi* porquanto embora elas se mostrem intensas mesmo em elevadas diluições de soro nas fases iniciais da doença de Chagas segundo MUNIZ & FREITAS<sup>25</sup>, conforme tivemos ocasião de analisar em trabalho anterior<sup>15</sup>, à medida que evolui a doença essas aglutinações passam a se apresentar de intensidade fraca, tornando particularmente difícil a leitura dos resultados.

Com relação à reação de fixação do complemento, embora MUNIZ & FREITAS<sup>27</sup> tenham obtido reações de fixação do complemento positivas já no período pré-patente em macacos *rhesus* (*Macaca mulatta*) inoculados experimentalmente, no homem a reação é freqüentemente negativa ou de pequena intensidade na fase aguda conforme PEDREIRA DE FREITAS<sup>17</sup> e PELLEGRINO & BRENNER<sup>31</sup>. AMATO NETO<sup>6</sup> assinalou certa variabilidade nos resultados da reação nos casos agudos que observou. Ao considerarmos os resultados da reação de fixação do complemento na fase crônica, voltaremos a comentar o valor que pode ser atribuído a essas variações na intensidade da reação.

O fato de que a maioria dos pacientes, cerca de 90%, mesmo sem nenhum tratamento específico consegue superar a forma aguda ou inicial passando para uma longa fase crônica aparentemente assintomática, denominada forma indeterminada por VILLELA<sup>39</sup>, dificulta muito a avaliação do efeito

terapêutico de qualquer droga mesmo sobre a fase aguda. Formas particularmente graves, com manifestações meningo-encefálicas, poderiam ter o prognóstico muito melhorado através de terapêutica específica, porém a raridade desses casos e, por outro lado sua gravidade, não permitem levar-se a efeito observações controladas que possibilitem tirar-se conclusões a respeito do resultado de uma terapêutica instituída.

Em infecções experimentais, quer usando-se cepas de animais altamente suscetíveis ao *T. cruzi* como a cepa C<sub>3</sub>H segundo PIZZI & col.<sup>32</sup>, quer cepas de *T. cruzi* com virulência exaltada por passagens rápidas e sucessivas em animais da mesma espécie conforme SILVA & NUSSENZWEIG<sup>36</sup>, pela simples diminuição acentuada da letalidade se pode apreciar o efeito terapêutico de uma droga. Nesse caso não existem ainda observações a respeito do comportamento das reações sorológicas entre os animais sobreviventes.

A intensidade do parasitismo na fase aguda da moléstia de Chagas faz com que nesse período já se constitua a maior parte das graves lesões do sistema nervoso responsáveis pelas principais manifestações da moléstia na fase crônica como demonstrou ALCANTARA<sup>1</sup>. Isso faz com que, para grande número de casos, se possa aceitar que "o destino do chagásico decide-se na fase aguda da doença" como afirmou KÖBERLE<sup>23</sup>. Por outro lado, não se demonstrou ainda o papel que poderiam desempenhar, no agravamento dos pacientes, os sucessivos surtos endógenos de parasitemia pela ruptura dos ninhos de tripanosomas ou repetidas reinfecções exógenas quando o indivíduo continua exposto à contaminação por triatomíneos, embora desde BRUMPT<sup>10</sup> se conheça certo grau de imunidade contra a superinfecção nas infecções pelo *T. cruzi*.

A apreciação do efeito terapêutico de substâncias usadas na fase crônica da moléstia de Chagas se torna particularmente difícil devido a várias peculiaridades que oferece essa moléstia em sua evolução:

1<sup>a</sup>) sua longa duração, quer sob forma aparentemente assintomática, quer com sintomas discretos ou bem estabelecidos nas formas cardíaca ou digestiva;

2ª) o fato de ser moléstia com caráter evolutivo porém nem sempre com agravação progressiva aparente, tendo mesmo BRASIL<sup>9</sup> chamado a atenção para certas peculiaridades dessa doença, como a mutabilidade electrocardiográfica;

3ª) conforme vem sendo documentado amplamente nesses últimos anos, principalmente através dos trabalhos de KÖBERLE & col., por ser moléstia em que a lesão fundamental se assenta na célula nervosa, por um lado incapaz de regeneração, por outro levando a conseqüências tardias sob a forma de alterações dos órgãos parcialmente dener- vados;

4ª) por não ter sido ainda provada a cura espontânea nessa moléstia, o que se pode supor deva acontecer baseado na evolução de outras moléstias como a sífilis, na qual cêrca de 25% dos casos têm cura espontânea segundo ROSAHN<sup>35</sup>. Por outro lado, mesmo se houver cura parasitológica na moléstia de Chagas, permanecerão e tenderão a se agravar as alterações conseqüentes às lesões do sistema nervoso.

Com relação à sorologia, levando-se em conta o que acontece em outras protozooses, a persistência de anticorpos na infecção pelo *T. cruzi* deve traduzir a presença do parasito, estabelecendo-se um estado de pre- munição. Isso de acôrdo com o que demonstrou GOGESHALL<sup>19</sup> em infecções em macacos pelo *Plasmodium knowlesi* ou CRAIG<sup>23</sup> em infecções humanas pela *Entamoeba histolytica*, em ambos os casos o anticorpo somente se mantendo em presença do parasito.

As peculiaridades acima enumeradas, entre outras, fazem com que devam ser “melhoradas as técnicas sorológicas quantitativas para avaliação dos resultados” dos tratamentos usados na moléstia de Chagas, conforme recomendou o Grupo de Estudo da Moléstia de Chagas reunido pela Organização Mundial da Saúde<sup>28</sup>.

Ao se considerar o valor das técnicas sorológicas quantitativas para avaliação de resultados terapêuticos na moléstia de Chagas, vários fatores têm que ser levados em conta, entre os quais:

1.º) o teor relativamente baixo de anticorpos nas infecções pelo *T. cruzi*;

2.º) a possível combinação desses anticorpos com antígeno “in vivo”, o que foi demonstrado ocorrer na fase inicial da imunização com alguns agentes por STERNBERGER & col.<sup>37</sup> e se pode supor ocorra mesmo na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* devido aos repetidos surtos endógenos de parasitemia;

3.º) o fato de não se ter conseguido preparar, a partir do *T. cruzi*, um antígeno que possa ser dosado diretamente por precipitação e indiretamente por fixação do complemento. Com efeito, a fração extraída pelo método de Füller do *T. cruzi* por Muniz e Freitas tem composição complexa e faltam informações mais minuciosas a respeito do comportamento sorológico do complexo polissacarídeo-poli-peptídeo isolado por GONÇALVES & YAMAHA<sup>20</sup>.

A obtenção desse antígeno seria mais um passo na sorologia quantitativa na moléstia de Chagas, porquanto poderia permitir a sua precipitação sob a forma de complexo e dosagem direta. Com efeito, trabalhando com sôro hiperimune e polissacarídeo do pneumococo S III, RICE & SICKLES<sup>34</sup> demonstraram que entre 142 misturas de soros estudadas, na grande maioria delas havia paralelismo entre os títulos determinados pela reação de fixação do complemento e o nitrogênio dosado no precipitado.

Por outro lado, WALLACE & col.<sup>41</sup> produzindo anticorpos contra soroalbumina de boi em coelhos, demonstraram que êsse paralelismo, verificado em animais submetidos a uma única série de imunizações, não se mantinha após uma segunda série. Êsse fato da influência da repetição das doses antigênicas pode ter muita importância no caso da moléstia de Chagas por causa das reinfeções exógenas ou endógenas a que ficam sujeitos os pacientes.

Outro fator a se considerar é que os antígenos usados para reações de fixação do complemento em moléstia de Chagas são ou extratos totais de culturas do *T. cruzi* como o de Kelser ou de Davis, ou extratos de culturas das quais apenas se retirou algumas substâncias que poderiam condicionar reações inespecíficas, como o antígeno benzeno-cloroformado de PEDREIRA DE FREITAS & AL-

MEIDA. Por isso nesses antígenos podem estar presentes, além da parte capaz de formar complexos fixadores do complemento, outras frações que podem se ligar ao anticorpo, porém não fixadoras do complemento. Embora esse fato não tenha sido demonstrado para o *T. cruzi*, foi bem caracterizado para outros antígenos como aquele preparado a partir de bacilos da tuberculose por PANGBORN<sup>29</sup>.

A tentativa de dosar a quantidade de anticorpo por reações de fixação do complemento remonta a CALMETTE & MASSOL<sup>11</sup> que chamaram a atenção para a proporcionalidade entre complemento fixado e complexo antígeno-anticorpo formado. Wadsworth, Maltaner e Maltaner, em uma série de trabalhos publicados a partir de 1931, procuraram estabelecer as condições em que a reação deveria ser feita para medir a quantidade de complexo imune formado, descrevendo a técnica quantitativa apresentada por WADSWORTH<sup>40</sup> e que foi aplicada para moléstia de Chagas por PEDREIRA DE FREITAS & ALMEIDA<sup>18</sup>.

Diversas técnicas de reação de fixação do complemento têm sido desenvolvidas, denominadas “quantitativas” porque procuram avaliar a quantidade de anticorpos presentes no soro em exame.

Um grupo dessas técnicas segue, em linhas gerais, o critério da reação de Kolmer quantitativa, na qual se procura determinar o “título” de anticorpos colocando-se diluições sucessivas de soro em presença de quantidades constantes de antígeno e complemento. Reações desse tipo foram praticadas para moléstia de Chagas por MUNIZ & FREITAS<sup>25</sup> e por PEDREIRA DE FREITAS<sup>15</sup>, entre outros. CHAFFEE & col.<sup>12</sup> descreveram uma técnica desse tipo adotando a unidade 50% de hemólise, o que fez também KNIERIM<sup>21, 22</sup> seguindo a técnica de Bozicevich & col.

Embora a maneira de expressar os títulos obtidos difira entre esses autores, fundamentalmente todos eles o fazem levando somente em conta a diluição de soro. À primeira vista, esse método parece adequado para revelar a quantidade de anticorpo presente, porém tem sido verificado que não existe proporcionalidade direta, no sentido de relação linear, entre quantidade de soro (anti-

corpo) e complemento fixado, isto é, projetando-se em um sistema de ordenadas cartesianas esses valores, a linha soro-complemento não parte do zero.

Do mesmo tipo dessas reações quantitativas anteriormente referidas é a reação praticada segundo Wadsworth & col. quando o título é definido por

$$T = D \cdot K'_{S,A}$$

Ao se ler o resultado da reação de fixação do complemento obtida em presença de um soro ele traduz, ao lado da fixação específica com o antígeno usado, também o consumo de complemento pela atividade anticomplementar desse soro. Por isso, de acordo com Wadsworth & col. o título é expresso pela relação

$$T = \frac{D \cdot K'_{S,A}}{K'_S}$$

que exprime quantas vezes o soro em presença do antígeno fixa complemento mais do que o soro somente. Esse fator  $K'_S$ , que tem pouca importância no caso de soros com teor elevado de anticorpos, no caso da moléstia de Chagas assume importância especial porque o fator diluição (D) tem quase sempre valor muito pequeno conforme demonstramos<sup>17</sup>. Por outro lado temos verificado que, da mesma maneira que na sífilis “os soros de pacientes têm tendência a serem intrinsecamente um pouco anticomplementares” segundo BOYD<sup>8</sup>, esse fato se observa também com os soros de chagásicos.

Uma vez que, como referimos anteriormente, em geral não há proporcionalidade direta entre soro (anticorpo) presente e complemento fixado, o teor de anticorpos de um soro será melhor expresso pela relação

$$T_s = \frac{\Delta K'_{S,A}}{\Delta S}$$

isto é, pelo quociente do acréscimo de fixação do complemento em presença de um conhecido acréscimo de soro, como preconizou

RICE<sup>33</sup>. Esse resultado pode ser obtido, conforme Wadsworth & col., colocando-se sôro, diluído ou não, em presença de diferentes quantidades de complemento ajustadas de modo a se obter hemólise em tórno de 50%.

Na determinação desse ponto 50% temos verificado que com freqüência soros de pacientes chagásicos dão reações atípicas no conceito de WADSWORTH<sup>40</sup>, isto é, reações nas quais a inclinação da linha sôro-complemento difere sensivelmente daquela da linha de regressão obtida por dosagem do complemento. Por isso sugerimos a determinação do ponto 50% diretamente por projeção gráfica, ao invés de pelo uso de tabelas de fatores de conversão (ALMEIDA & PEDREIRA DE FREITAS<sup>3</sup>).

Examinando misturas de soros reagentes com diversos antígenos e diferentes partidas de complemento verificamos, em trabalho de colaboração com ALMEIDA<sup>4</sup>, que mesmo títulos determinados por acréscimo, de acôrdo com a definição acima sofriam variação, para o mesmo sôro, quando dosados em presença de diferentes antígenos ou complementos (Quadro I). Igualmente variável era o

título de diferentes antígenos mesmo quando determinados com a mesma mistura de soros, definido o título do antígeno por:

$$T_A = \frac{\Delta K'_{A,S}}{\Delta A}$$

Porém, pudemos verificar que quando determinávamos, para o mesmo sôro, a relação

$$R = \frac{T_A}{T_S}$$

houve grande constância nos resultados obtidos com a mesma mistura, traduzindo esse valor R o que denominamos "capacidade reativa específica" dos soros.

Não tivemos ainda ocasião de observar se essa constância se mantém quando o sôro é colhido do mesmo paciente em épocas diferentes. Diante das observações de WALLACE & col.<sup>41</sup> anteriormente comentadas, essa verificação pode se tornar muito importante ao se tentar avaliar, por método sorológico,

#### QUADRO

Capacidade de reação entre um determinado sôro chagásico e antígenos de três partidas, tendo variado o diluente e o complemento

Data	Sôro reagente	Diluente	Antígeno nº	Complemento nº	Títulos		Quociente $T_A / T_S$
					Do sôro	Do antígeno	
11-11-55	81155	Salina	R-7	34	84	3700	44,0
13- 1-56	81155	Salina	BT	36	114	4700	41,2
16- 2-56	81155	Salina	BT	37	100	4130	41,3
5- 4-56	81155	SF1771*	BT	38	118	4850	41,1
5- 6-56	81155	21556*	6	40	100	4250	42,5
Média .....							42,05

\* Mistura de soros não reagentes (segundo ALMEIDA, FREITAS & SIQUEIRA<sup>4</sup>).

o efeito de agentes terapêuticos no decurso da infecção pelo *T. cruzi*.

Ao se determinar os títulos por acréscimo, será necessário estabelecer o ajuste das diluições de antígeno às quantidades de complemento usadas, porquanto a concentração de antígeno que dá fixação ótima pode variar de acôrdo com a quantidade de complemento presente. Por outro lado, na dosagem do antígeno ou do sôro devem ser procuradas as condições ótimas para um e outro caso. Fundamentalmente, antígeno deverá ser dosado em presença de excesso de sôro e sôro em presença de excesso de antígeno, de maneira que as variações observadas em cada caso passem a depender sômente de um desses elementos. ALMEIDA<sup>4</sup> estudando diferentes sistemas sob êsse ponto de vista, verificou que êles podem apresentar três tipos diversos de comportamento fundamental, o que caracterizou nas "curvas de isofixação" dos tipos I, II e III. O antígeno de *T. cruzi* (antígeno benzeno-cloroformado de Pedreira de Freitas & Almeida) segue fundamentalmente o tipo I de isofixação, isto é, o ramo horizontal da curva sôro-antígeno é sensivelmente paralelo à linha do antígeno, mostrando que um excesso desse não interfere no grau de fixação (Fig. 1). Por outro lado SIQUEIRA (comunicação

pessoal) verificou que com alguns soros a curva observada podia apresentar um ponto de inflexão, mostrando que havia uma quantidade de antígeno para a qual era ótima ou máxima a fixação do complemento. A existência desse ótimo, se por um lado permitiu a SIQUEIRA obter linearidade mais perfeita na projeção dos valores de complemento fixado sôbre sôro, por outro lado dificulta a padronização da reação, porquanto êle varia para os diferentes soros. A determinação desse ótimo é importante quando se tenta obter uma reação de sensibilidade máxima, porquanto nesse ponto poderão ser reveladas quantidades mínimas de anticorpo.

Qualquer que seja o método que se use para reação de fixação do complemento, além daqueles fatores já analisados que poderão influir sôbre os resultados como antígeno, anticorpo ou complemento, é necessário conhecer os erros introduzidos na reação por motivos de ordem técnica, tais como imprecisão na distribuição dos reagentes ou na leitura dos resultados. Êsse aspecto do problema foi estudado para a reação de Machado-Guerreiro pela técnica de Wadsworth & col. por ALMEIDA & SIQUEIRA<sup>5</sup>. Pela análise estatística de séries de reações feitas em duplicata, êsses autores concluíram que com antígeno benzeno-cloroformado as discrepân-

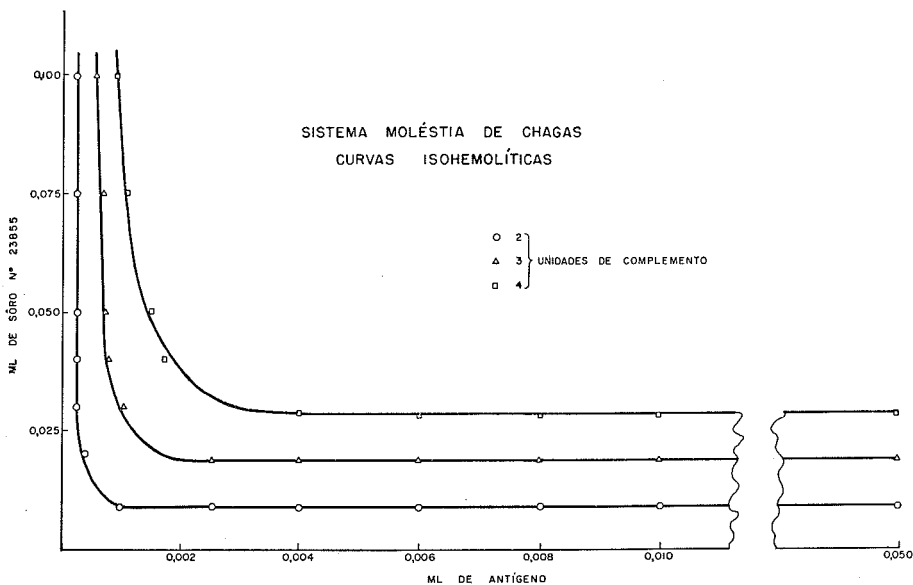


Fig. 1

cias não foram maiores do que aquelas aceitas para as reações feitas com antígeno de cardiolipina e soros de sífilíticos de títulos elevados, conforme fôra estabelecido por Thompson & col.

A medida da discrepância relativa entre pares de reações simultâneas constitui passo preliminar importante para o estudo de métodos de comparação de antígenos. Isto se torna necessário porque embora tenha sido possível demonstrar que o antígeno benzeno-cloroformado representou real progresso com relação, por exemplo, ao de Davis do ponto de vista da estabilidade (PEDREIRA DE FREITAS<sup>16</sup>; PELLEGRINO & BRENER<sup>30</sup>), faltam ainda critérios seguros para estudar essa propriedade e, principalmente, para permitir a substituição de antígenos, assunto que está sendo estudado por SIQUEIRA por método de comparação através de análise seqüencial.

A análise das reações de Machado-Guerreiro como um ensaio biológico poderia permitir estabelecer comparações numéricas entre resultados obtidos em circunstâncias diversas. Isso tem sido dificultado pela pequena reatividade dos soros de chagásicos, o que obriga ao uso de complemento em concentrações muito baixas, as quais durante o período de incubação sofrem deterioração, não se podendo obter a linearidade indispensável para êsse tipo de ensaio segundo SIQUEIRA.

Ao se considerar a avaliação de efeitos terapêuticos na moléstia de Chagas através de reações sorológicas, convém analisar ainda alguns fatores que poderão ter influência sobre êsses resultados.

Em pacientes com diversas enfermidades tem sido verificado que a administração de cortisona produz uma diminuição de anticorpos (FISCHEL & col.<sup>14</sup>). No caso particular da infecção pelo *T. cruzi*, essa substância pode determinar, além disso, sensível agravamento da infecção (WOLF & col.<sup>42</sup>).

Embora os trabalhos clássicos de Cannon & col. tenham levado à conclusão de que animais (coelhos e ratos) em dietas com baixo teor protéico tinham pequena capacidade de formar anticorpos, BALCH<sup>7</sup> medindo a capacidade de pacientes desnutridos de responder à injeção de toxóide diftérico,

concluiu que êles apresentavam resposta tão intensa quanto o grupo contrôle. De outra parte, YAEGER & MILLER<sup>43</sup> verificaram que em ratos submetidos a dieta pobre em tiamina a infecção pelo *T. cruzi* era particularmente intensa. Êsses autores não estudaram, contudo, o comportamento dos anticorpos nos animais observados.

A aparente relação entre positividade da proteína C reativa no sôro e agravamento do quadro clínico, observada em casos crônicos da moléstia de Chagas por VEIGA & FIORILLO<sup>38</sup>, sugere a investigação do comportamento dos anticorpos específicos paralelamente à pesquisa da proteína C reativa.

MARTINS<sup>24</sup>, inoculando pacientes chagásicos endovenosamente com grandes doses de iodeto de sódio e colhendo sangue logo após a injeção, referiu queda de intensidade de reações de Machado-Guerreiro em seus pacientes. Conclui que “se ficar provado que o iodeto de sódio em doses suficientes é capaz de negativar a reação de fixação do complemento, não será uma heresia admitir-se que êsse sal possa ser experimentado... para a cura da tripanossomíase americana”. Além do pequeno valor que se pode atribuir às diferenças observadas por êsse autor nos resultados das reações, pode-se supor que doses tão elevadas de iodeto de sódio tenham tido ação sobre a reação antígeno-anticorpo “in vitro”.

#### SUMMARY

*Standardization of methods with the purpose of estimating therapeutic effects in Chagas disease.*

The use of serological methods in the evaluation of therapeutic agents against Chagas' disease must be considered separately for the acute and for the chronic forms.

In the acute forms serological tests, like precipitin reactions, have been obtained in the presence of heavy dilutions of sera, but there is a rapid drop of the titer regardless of any therapeutic agent.

During the chronic form of this disease, it is very difficult to appreciate the value of any therapeutic agent because this infection is a very long lasting one, the pro-

gression of its severity cannot be predicted and the damage to the cells of the nervous system is not reversible. On the serological point of view, a low level antibody titer is present in this infection, perhaps because part of this antibody is combined with the antigen present in the blood. An analysis is performed of the results that have been obtained with the serological methods in the chronic forms of this disease and of the factors involved in the standardization of these methods.

#### REFERÊNCIAS

1. ALCANTARA, F. G. — Estudo quantitativo dos neurônios cardíacos no rato normal e no infectado experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi*, 1959. Tese. Fac. Med. Ribeirão Preto. (Texto mimeogr.)
2. ALMEIDA, J. O. — Isofixation curves as a method of standardization of quantitative complement fixation test. J. Immunol. 76: 259-263, 1956.
3. ALMEIDA, J. O. & FREITAS, J. L. P. de — Reações atípicas em fixação do complemento nos sistemas sífilis e doença de Chagas, pelo método quantitativo: interpretação e determinação de títulos. Rev. brasil. Biol. 13:1-2, 1953.
4. ALMEIDA, J. O.; FREITAS, J. L. P. de & SIQUEIRA, A. F. — Capacidade reativa específica do antígeno com anticorpo em reações de fixação do complemento para moléstia de Chagas. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 1:266-272, 1959.
5. ALMEIDA, J. O. & SIQUEIRA, A. F. — Estudo da discrepância relativa entre pares de reações simultâneas de fixação do complemento no sistema moléstia de Chagas. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 2:204-212, 1960.
6. AMATO Neto, V. — Contribuição ao conhecimento da forma aguda da doença de Chagas. São Paulo, 1958. Tese Fac. Med. Univ. São Paulo.
7. BALCH, H. H. — Relation of nutritional deficiency in man to antibody production. J. Immunol. 64:397-401, 1950.
8. BOYD, W. C. — Fundamentals of immunology. 3rd. ed. New York, Interscience, 1956.
9. BRASIL, A. — A mutabilidade eletrocardiográfica na cardiopatia crônica chagásica. Rev. Assoc. méd. Minas Gerais 4:149-152, 1953.
10. BRUMPT, E. — Immunité partielle dans les infections à *Trypanosoma cruzi*, transmission de ce trypanosome par *Cimex rotundatus*. Rôle régulateur des hôtes intermédiaires. Passage à travers la peau. Bull. Soc. Pathol. éxot. 6:172-176, 1913.
11. CALMETTE, A. & MASSOL, L. — Sur les conditions d'obtention de la réaction de déviation de l'alexine (Bordet-Gengou) avec les antigènes et les anticorps tuberculeux. Compt. rend. Soc. Biol. 67:528-531, 1909.
12. CHAFFEE, E. F.; FIFE jr., E. E. & KENT, J. F. — Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection by complement fixation. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 5:763-771, 1956.
13. CRAIG, C. F. — The etiology, diagnosis and treatment of amebiasis. Baltimore, Williams & Wilkins, 1944.
14. FISCHER, E. E. — Adrenal hormones and the development of antibody and hypersensitivity. (In The effect of ACTH and cortisone upon infection and resistance. New York, Columbia Univ. press, 1953.)
15. FREITAS, J. L. P. de — Contribuição para o estudo do diagnóstico da moléstia de Chagas por processos de laboratório. São Paulo, 1947. Tese Fac. Med. Univ. São Paulo.
16. FREITAS, J. L. P. de — Observações sobre a estabilidade de antígenos de cultura de *Trypanosoma cruzi* para reações de fixação do complemento. Hospital, Rio de Janeiro 38:513-519, 1950.
17. FREITAS, J. L. P. de — Reação de fixação do complemento para diagnóstico da moléstia de Chagas pela técnica quantitativa. Arq. Hig. 16:55-94, 1951.
18. FREITAS, J. L. P. de & ALMEIDA, J. O. — Nova técnica de fixação do complemento para moléstia de Chagas: reação quantitativa com antígeno gelificado de culturas de *Trypanosoma cruzi*. Hospital, Rio de Janeiro 35:787-800, 1949.
19. GOGGESHALL, L. T. — Immunity in malaria. Medicine 22:87-102, 1943.
20. GONÇALVES, J. M. & YAMAHA, T. — Immunochemical polysaccharide from *Trypanosoma cruzi*. Com. ao Congr. internac. Doença de Chagas, Rio de Janeiro, 4-11 de julho de 1959.
21. KNIERIM, F. — Resultados obtenidos con la reacción de fijación del complemento según el 50% de hemólisis en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. chil. Parasitol. 14:5-6, 1959.
22. KNIERIM, F. — Técnica de la reacción de fijación del complemento según el método del 50% de hemólisis de Bozicevich aplicada al diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. chil. Parasitol. 13:75-78, 1958.



23. KÖBERLE, F. — Patogenia da doença de Chagas: estudo dos órgãos musculares ócos. Rev. goiana Med. 3:155-180, 1957.
24. MARTINS, F. — Modificações verificadas em sorodiagnósticos da doença de Chagas com o iodeto de sódio. Med. Cir. Farm. (163):645-659, 1949.
25. MUNIZ, J. & FREITAS, G. — Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 41:303-333, 1944.
26. MUNIZ, J. & FREITAS, J. — Contribuição para o diagnóstico da moléstia de Chagas pelas reações de imunidade. II. Isolamento de poli-sacarídeos de *Schizotrypanum cruzi* e de outros tripanosomídeos, seu comportamento nas reações de precipitação, de fixação do complemento e de hipersensibilidade: os tests de floculação (sublimado e formol-gel). Rev. brasil. Biol. 4:421-438, 1944.
27. MUNIZ, J. & FREITAS, G. — Estudos sobre a imunidade humoral na doença de Chagas. Brasil-méd. 60:337-341, 1946.
28. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD — Enfermedad de Chagas: informe de un grupo de estudio. Org. mund. Salud, Ser. Inf. técn. (202), 1960.
29. PANGBORN, M. C. — Studies of tuberculosis: antigens of the tubercle bacillus. Ann. Rep. Div. Laborat. Res. New York State Dept. Health, 1956. p. 11-12.
30. PELLEGRINO, J. & BRENER, Z. — A reação de fixação do complemento na doença de Chagas. II. Observações sobre o antígeno de Davis. Hospital, Rio de Janeiro 42:423-434, 1952.
31. PELLEGRINO, J. & BRENER, Z. — A reação de fixação do complemento na doença de Chagas. IV. Observações feitas em casos agudos de esquizotripanose. Hospital, Rio de Janeiro 42:755-761, 1952.
32. PIZZI, T.; AGOSIN, M.; CHRISTEN, R.; HOECKER, G. & NEGhme, A. — Estudios sobre inmunobiología de las enfermedades parasitarias. I. Influencia de la constitución genética en la resistencia de las lauchas a la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. Rev. Soc. mex. Hist. nat. 10:113-119, 1949.
33. RICE, C. E. — Studies of antipneumococcal serum. II. Complement-fixing activity of antipneumococcal rabbit-serum with homologous type-specific carbohydrate. Technic of test. General quantitative relationships among reagents. J. Immunol. 43:129-148, 1942.
34. RICE, C. E. & SICKLES, G. R. — Studies of antipneumococcal serum. III. The relation of complement-fixation titers to antibody-nitrogen values. J. Immunol. 43:319-325, 1942.
35. ROSAHN, P. D. — Studies in syphilis. VII. The end results of untreated syphilis. J. vener. Dis. Inf. 27:293-301, 1946.
36. SILVA, L. H. P. da & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia clin. & biol. 20:191-208, 1953.
37. STERNBERGER, L. A.; MALTANER, F. & DE WEERDT, J. — The estimation of circulating antibody-antigen complex. J. exper. Med. 98:451-460, 1953.
38. VEIGA, A. A. & FIORILLO, A. M. — A proteína C-reativa na forma crônica da moléstia de Chagas. Hospital, Rio de Janeiro 53:545-551, 1958.
39. VILLELA, E. — Moléstia de Chagas: descrição clínica. Folha méd. 4:33-63, 1923.
40. WADSWORTH, A. B. — Standard methods of the Division of laboratories and research of the New York State Department of Health. Baltimore, Williams & Wilkins, 1947. Cap. 30:361-465.
41. WALLACE, A. L.; OSLER, A. G. & MAYER, M. — Quantitative studies on complement fixation. V. Estimation of complement-fixing potency of immune sera and its relation to antibody-nitrogen content. J. Immunol. 1947. Cap. 30:361-465.
42. WOLF, A.; KABAT, E. A.; BEZER, A. E. & FONSECA, J. R. C. — The effect of cortisone in activating latent trypanosomiasis in rhesus monkeys. (In The effect of ACTH and cortisone upon infection and resistance. New York, Columbia Univ. press, 1953.)
43. YAEGER, R. & MILLER, O. N. — Effect of malnutrition on susceptibility of rats to *Trypanosoma cruzi*. II. Riboflavin deficiency. Exper. Parasitol. 10:227-231, 1960.

Recebido para publicação em 7 março 1963.