

IMUNIDADE NA DOENÇA DE CHAGAS (*Trypanosomiasis Americana*) *

JÚLIO MUNIZ

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara

Decorridos 50 anos da data de 9 de abril de 1909 em que CHAGAS descreve uma nova espécie de *Trypanosoma*, encontrada no sangue de uma criança em estado febril vivendo no interior do Estado de Minas Gerais, e para o qual, propõe o nome de *T. cruzi*, em homenagem ao seu mestre, Dr. Oswaldo Cruz, pode-se avaliar quão fundamentais foram suas contribuições para melhor conhecimento da nova *Trypanosomíasis*, quer nos setores da Parasitologia, como nos da Patologia, da Clínica e da Epidemiologia.

Embora os trabalhos, não só de seus colaboradores como também de pesquisadores de outros países, tenham sido valiosos para melhor conhecimento dessa entidade mórbida, nenhum sobreleva ao que nos deixou.

A parte referente à Imunologia, entretanto, foi aquela em que as investigações menos se aprofundaram, quer em relação à sua base celular, como também, em relação ao comportamento humoral.

Até sua morte, ocorrida em 1934, os dois fatos marcantes em relação a êsse assunto foram: a introdução de reação de Bordet e Gengou, por GUERREIRO & MACHADO em 1913 para o diagnóstico da *Trypanosomíasis*, e o conceito de alergia introduzido por TORRES em 1929, na patogenia dessa doença.

O desenvolvimento de melhores técnicas para obtenção de massas de cultivo do *S. cruzi* e o melhor conhecimento da base celular da imunidade, não só sob o ponto de vista geral, como relativo a outras protozooses, permitiram, após a sua morte, até a presente data, a aquisição de novos conhecimentos.

Apesar disso, muitos problemas estão por ser resolvidos dentro desse setor, mas, tal tarefa já foge ao domínio dos parasitologistas cabendo

* Recebido para publicação a 9 de maio de 1961.

Trabalho do Instituto Oswaldo Cruz (Divisão de Estudos de Endemias), apresentado ao Congresso Internacional sobre a Doença de Chagas realizado de 5 a 11 de julho de 1959, na cidade do Rio de Janeiro.

aos fracionadores, aos imuno-químicos e aos patologistas, trazer a almejada solução para eles.

* * *

Como é de conhecimento geral, a infecção determinada pelo *S. cruzi*, no homem, é de evolução lenta permanecendo o indivíduo infectado pelo resto de sua vida.

Essa evolução é caracterizada por um período agudo em que predominam fenômenos ditos toxêmicos, representados principalmente por um estado febril, que pode ser: contínuo, irregular ou intermitente.

Nesta fase ocorre, geralmente, aumento do fígado, do baço, e dos gânglios periféricos e profundos. O coração pode ser a sede de miocardite extensa e difusa e, também, fenômenos meningo-encefálicos podem ocorrer, tais distúrbios, ocasionando muitas vezes a morte.

Essa fase, que segue à formação de um foco inflamatório inicial, indicativo do ponto de penetração do parasita, tem a duração de cerca de 30 a 60 dias em média.

Como seqüência, toda essa sintomatologia tende a se amainar até completo desaparecimento, representando esse período, a *fase sub-aguda* que precede o estabelecimento da fase crônica, no decorrer da qual, após longo espaço de tempo, 10 a 12 anos, em cerca de 50 a 60% dos casos, começam a se manifestar sintomas diversos dependentes da localização do parasita neste ou naquele órgão e tecido, constituindo os distúrbios cardíacos e os megas, os que com mais freqüência são observados.

Segundo relata EVANDRO CHAGAS (1935), em experiências "in anima nobile" o tempo de incubação, isto é, entre a inoculação e o aparecimento do foco inflamatório primário, decorre um período de 12 dias.

Nesse quadro evolutivo ocorrem variações, principalmente quanto à intensidade das manifestações, podendo a infecção evoluir, muitas vezes, quase sem nenhuma sintomatologia. Tal fato, explica a desproporção numérica entre casos diagnosticados na fase aguda e os casos crônicos diagnosticados sorològicamente em zonas endêmicas da doença.

* * *

Quanto aos dados parasitológicos sabe-se que, ao contrário da maioria dos tripanosomas patogênicos, que vivem e se multiplicam no sangue do vertebrado, por divisão binária e sempre sob a forma de tripanosoma, o *S. cruzi* é um parasita tissular, vivendo e multiplicando-se na intimidade dos tecidos, sob a forma de leishmania.

As infecções por ele determinadas evoluem sempre com baixa parasitemia, apresentando-se ele no sangue sob a forma típica de um tripanosoma.

Infecções naturais com parasitemia elevada constituem raridade, quer no homem quer em animais. Entretanto, isso pode ser observado em infecções experimentais quando se trabalha com cães de baixa idade ou em macacos do gênero *Callitrix*, estando tal fato, condicionado à viru-

lência da amostra. O emprêgo de drogas que exercem ação inibidora sobre os meios de defesa do organismo, como a cortisona, podem determinar o aumento da parasitemia.

O *S. cruzi* faz parte do grupo de tripanosomas de evolução posterior e a transmissão se processa por contaminação. No homem, ela se inicia pela penetração das chamadas formas metacíclicas, através da pele ou da conjuntiva, formas essas que representam a fase final do ciclo evolutivo, no invertebrado.

No ponto de penetração, ocorre sempre um processo inflamatório do tipo normérgico, mais ou menos intenso, em tôrno dos aglomerados parasitários, constituídos já, por elementos leishmanióides em fase de intensa multiplicação e oriundos da transformação das formas metacíclicas infectantes.

Com a posterior evolução daqueles elementos para as formas de tripanosoma metabólico e a passagem dêste para as vias linfáticas e sangüíneas, temos a generalização do processo infeccioso, com a constituição de novos focos em diferentes órgãos e tecidos.

Quanto aos períodos parasitológicos sabe-se que o patente, no qual o parasita pode ser encontrado no sangue com relativa facilidade, pelo exame direto, corresponde justamente à fase aguda da doença; enquanto que os pré-patente e sub-patente nos quais, êle só pode ser evidenciado por métodos indiretos, correspondem ao período de incubação e à fase crônica.

Em relação à evolução por que passa o parasita no invertebrado, sabe-se que o elemento leishmanióide, oriundo das transformações das formas metabólicas ingeridas com o sangue e, por ação de fatores metamorfoseantes (MUNIZ & FREITAS, 1945), se transforma em critídias, formas essas que vão dar origem aos metacíclicos, já nas últimas porções do intestino.

Uma evolução semelhante pode ser observada quando semeia-se o sangue contendo tripanosomas de tipo metabólico em meios de cultivo artificiais com hemoglobina. Essa evolução, quer no inseto transmissor, como nos meios de cultivo, decorre dentro de 10 a 12 dias.

Igualmente pode-se obter "in vitro", conforme demonstraram MUNIZ & FREITAS (1946), sem necessidade de culturas em tecidos, tôdas as fases por que passa o parasita no organismo do vertebrado, semeando os metacíclicos obtidos de cultivo em exudato peritonial de cobaio e mantendo as culturas a 37°C.

Com essa simples técnica, observa-se a sua transformação em elementos leishmanióides dentro das primeiras 24-48 horas; e dêstes, em tripanosoma metabólico, do segundo para o terceiro dia.

* * *

Alguns fatos relacionados com o comportamento apresentado pelo parasita, quer em relação aos hospedadores vertebrado e invertebrado, devem ser levados em conta, quando se investiga os processos de defesa

opostos pelo organismo do agente parasitário e deste em relação ao hospedador. Assim:

a) Tôdas as vêzes em que êle sofre modificação em seu "habitat", como a passagem do hospedador invertebrado para o vertebrado e vice-versa, e também, quando submetido a cultivos em meios artificiais, êle se transforma inicialmente em elemento leishmanióide.

b) É sob essa forma que o parasita se perpetua no organismo, apesar de submetido a fatôres adversos, representados pelos meios de defesa que lhe são opostos.

c) O elemento leishmanióide, comparado com as outras formas pelas quais passa o parasita em seu ciclo evolutivo, apresenta certas diferenças, além daquelas referentes à estrutura, como sejam: plasma mais condensado e membrana mais resistente.

d) O elemento leishmanióide pode evoluir para tripanosoma de tipo metabólico fora de qualquer elemento celular, bem como, sendo fagocitado por elementos heterófilos e macrófagos inflamatórios, pode transformar-se dentro dêsses elementos (MUNIZ & FREITAS, 1946).

e) O elemento leishmanióide pode vir a constituir novos focos parasitários, sem prévia transformação em tripanosoma metabólico.

f) Desconhece-se no organismo a ocorrência de fatôres que condicionem a transformação de elemento leishmanióide em tripanosoma, quer favorecendo ou inibindo.

g) Nos cultivos em líquido peritonial de cobaio, tal transformação está na dependência de fatôres ligados à presença de células migradoras (MUNIZ & FREITAS, 1946).

h) Nos cistos parasitários quando essa transformação ocorre, atinge simultâneamente quase a totalidade das formas que os constituem e o arredondamento do cinetoplasto é o primeiro sinal dessa transformação. Êsse fato é seguido da rarefação do plasma que se propaga à periferia do corpo, junto a qual, se encontra aquêle componente. Ocorre, então, o rompimento da massa de plasma nesse ponto, o que determina o desdobramento do corpo do parasita, que assume então, a forma alongada. A formação do flagelo e de uma membrana ondulante rudimentar inicia-se após o aparecimento da zona de rarefação e é revelada por um espessamento do bordo do corpo do parasita, a partir do ponto junto ao qual se encontra o cinetoplasto. Outras formas dão a impressão de que certos elementos leishmanióides possam se transformar em tripanosomas, por meio de um simples alongamento do corpo (MUNIZ & FREITAS, 1946).

i) Embora a libertação das formas de tripanosoma recém-formadas, ocorra por destruição da fibra cardíaca parasitada, fato êsse atribuído por CHAGAS e outros pesquisadores a uma simples ação mecânica decorrente do desenvolvimento dos cistos parasitários, pode, entretanto, ser interpretada como resultante do desencadeamento de uma reação de tipo alérgico na intimidade da fibra, trazendo modificação à sua estrutura e, dessa maneira, facilitando indiretamente a libertação dos parasitas (MUNIZ & AZEVEDO, 1947).

j) Nenhuma dúvida existe de que as formas finas de tripanosoma que ocorrem no sangue, dotadas de intenso movimento, representem as formas jovens recém-formadas, e, não, elementos diferenciados sexualmente.

k) O metacíclico como elemento altamente diferenciado é dotado de um grande poder de transformação. Quando inoculado no vertebrado evolui dentro das 24 horas para o elemento leishmanióide, como demonstram o exame de cortes histológicos de biópsias, do ponto de inoculação (MUNIZ & FREITAS, 1946).

l) "In vitro", tal fato pode ser observado por meio de cultivo em exudato peritonial de cobaio, como demonstraram MUNIZ & FREITAS. Essa é uma das características, se não a principal, que o diferencia do tripanosoma metabólico.

m) Quanto a êste, a evolução para o elemento leishmanióide se processa mais demoradamente, no decorrer da qual, êle vai lentamente perdendo seus movimentos e apresentando uma grande tendência à adesão, permitindo tal fato, ser prêsã fácil de elementos fagocitários (MUNIZ & FREITAS, 1946). É conhecida a importância do papel que representam as colisões no mecanismo da fagocitose.

* * *

Em relação ao comportamento dessas diferentes formas, quando em presença de sôros normais, temos de assinalar a elevada sensibilidade que demonstram as formas de critídia à ação lítica de tais sôros (homem, cobaio, etc.).

Êsse fato foi demonstrado por MUNIZ & BORRIELLO (1945) e está relacionado com a presença do complemento e de lisinas naturais (*properdina?*, PILLEMER et al., 1954).

Ao contrário das formas de critídia, os elementos leishmanióides e os tripanosomas metacíclicos se mostram insensíveis a esta ação, isto podendo ser comprovado pelo exame, não só à fresco, como também, em preparações coradas de formas de cultivo submetidas à ação do sôro normal inativado e de sôro não inativado. Êsses fatos demonstram a impossibilidade das formas de critídias desempenharem qualquer papel na infecção do vertebrado.

Idêntico fenômeno observa-se quando suspensão de formas de cultivo do *S. cruzi* é inoculada no peritônio de um animal como o cobaio. Examinando-se no fim de 30 a 50 minutos o exudato formado na cavidade peritonial dêsse animal, pode-se constatar a destruição maciça das formas de critídia, devido a uma ação lítica determinada pelo exudato, acompanhada de intensa fagocitose exercida por macrófagos e outros elementos migradores sôbre os detritos, constituídos pelas formas de critídia profundamente alteradas.

Tal maneira de se comportar deve ser levada em conta quando as formas de cultivo são utilizadas em investigações sôbre os meios de defesa opostos pelo organismo ao parasita e, também, quando se investiga o comportamento de antígenos com elas preparados.

Assim é que a ação anti-complementar dêse componente na reação de fixação, assinalada por diferentes autores, decorre da capacidade que possuem as formas de criticidia, constituindo cêrca de 80% dos elementos que se desenvolvem no cultivo, de fixarem o complemento após a ação do amboceptor lítico natural (properdina ?).

Uma simples prova de absorção evidencia êsse fato, desde que se tenha o cuidado de determinar, antes e depois da prova, as unidades de complemento contidas no sôro em experiência (MUNIZ & SOUZA 1959).

Nenhuma ação exercem as formas de cultivo, sôbre a coagulação do plasma, sendo elas desprovidas de qualquer atividade tromboplástica, fato fácil de ser verificado por provas laboratoriais (MUNIZ & SOUZA, 1959).

* * *

Quanto ao tropismo que possa apresentar o parasita, sabe-se que o *S. cruzi* é um parasita tissular vivendo e multiplicando-se na intimidade dos tecidos. O sangue e as vias linfáticas constituem os meios pelos quais êle se transporta, com o fim de se localizar, neste ou naquele órgão ou tecido do organismo em que vive.

CHAGAS & VIANA foram os primeiros a demonstrar o acentuado miotropismo apresentado pelo parasita. A fibra cardíaca é a sede preferencial de sua localização. Não querendo isto dizer, entretanto, que os outros órgãos ou tecidos não possam constituir pontos de fixação para êle.

Conforme a maior tendência a se localizar neste ou naquele tecido, têm sido caracterizadas, sem grande fundamento, diferenças raciais. É assim que VILLELA (1925) e VILLELA & TORRES (1925, 1926) assinalam um acentuado *neurotropismo* das amostras isoladas do tatu. SOUZA CAMPOS (1927) obtém paralisia em cães com amostra isolada do homem. BADINEZ (1945) classifica como retículo trópica a amostra *Tulahuen*, isolada por PIZZI, pelo seu acentuado tropismo para as células do S.R.E.

A penetração do parasita no interior de elementos que não exerçam atividade fagocitária é ainda um ponto a esclarecer. A penetração ativa do parasita no interior da fibra cardíaca, referida por CHAGAS e outros pesquisadores é um fato passível de discussão.

Basta uma simples observação dos movimentos que apresentam as formas de tripanosoma metabólico mais evoluídas, quando na corrente circulatória, para se convencer da impossibilidade de tais formas conseguirem por meio dêsses movimentos, romper a membrana da fibra que constitui o sincício cardíaco, para se localizar no seu interior.

Mesmo as formas recém-formadas, mais finas, dotadas de movimento ditos em flexa, pela sua própria constituição dificilmente poderiam realizar tal desiderato. O mecanismo deve ser outro.

ROMAÑA & MAYER (1942), entretanto, acreditam que a penetração da forma flagelada na célula possa ser de maneira ativa e dizem ter

observado em culturas de tecidos a sua penetração no protoplasma de fibroblastos e monócitos; embora não descrevam o fenômeno. MUNIZ & FREITAS (1946) afirmam não ter podido observar tal fato.

* * *

Quanto à virulência sabe-se que, de regra, as amostras do *S. cruzi* isoladas de casos humanos, quando inoculadas em animais de laboratório (cobaio, camundongo, etc.) determinam infecções de evolução longa vindo, muitas vezes, os animais a morrer de infecção intercurrente. Esse comportamento é que caracteriza o *S. cruzi*.

As passagens repetidas em um mesmo animal, quase nenhuma modificação trazem a esse comportamento. É o que demonstram as 28 amostras isoladas de casos humanos e mantidas por J. MUNIZ em seu departamento, no Instituto Oswaldo Cruz, a maioria delas, há mais de 10 anos, por passagens sucessivas em camundongo branco (*Mus musculus*) e cobaio separadamente.

EVANDRO CHAGAS atribuiu à repetidas passagens no organismo humano a redução da virulência apresentada pelas amostras isoladas de casos da *Trypanosomíasis* americana, em contraposição com a virulência apresentada por algumas amostras isoladas de animais silvestres (tatu).

Entretanto PIZZI (1949) e HAUSCHKA (1949), referem a obtenção de cêpa de virulência estável por passagem sucessiva em camundongos da mesma constituição genética.

A raça *Tulahuen*, isolada do *Triatoma infestans* por PIZZI e mantida por passagem em camundongos homozigotos da raça C3H, mata êsses animais regularmente dentro de 10 a 12 dias.

Convém assinalar, entretanto, que certas amostras ditas estáveis e matando camundongos com regularidade em prazos relativamente curtos, tem sido verificado, estarem associados à bactérias.

A passagem do *S. cruzi* em meios artificiais de cultivo (Noguchi, N.N.N., Noeller, etc.), ocasiona uma perda da virulência da amostra, fato que não ocorre no organismo do hospedador invertebrado.

No fim de uns poucos cultivos (10-20 repiques) as amostras perdem o poder de infectar o vertebrado. Tal fato não está em absoluto ligado a uma hipotética diminuição das formas metacíclicas (tripanosomas), ocasionada pelos sucessivos repiques, como pensa PIZZI (1957), pois tal prática nenhuma interferência exerce sobre a formação e o número dessas formas que ocorrem nos cultivos. Elas continuam a se formar da mesma maneira após 100-200 ou mais repiques. A maior ou menor riqueza de metacíclicos nos cultivos está na dependência, não só da constituição do meio de cultivo, como constitui uma característica peculiar de cada amostra. As culturas em meio sólido favorecem uma maior formação de metacíclicos.

Em regra, o poder invasor demonstrado pelo *S. cruzi* em relação ao homem é baixo. A infecção decorre, mesmo na fase aguda, com um número relativamente pequeno do parasita, a não ser num ou noutro caso, principalmente em criança de baixa idade, em que os cistos para-

sitários são encontrados em casos de autópsias, com relativa facilidade em diferentes órgãos ou tecidos. Na fase crônica, tal verificação torna-se extremamente difícil.

* * *

Quanto ao poder toxígeno do *S. cruzi*, inicialmente referido por CHAGAS como um dos atributos da virulência apresentada pelo parasita, e do qual decorre, ao lado da ação mecânica, grande parte da sua patogenicidade, foi pôsto em ordem do dia mais recentemente por KOEBERLE (1958), de Ribeirão Preto, que já atribui a existência de uma toxina secretada pelo parasita com afinidades de fixar-se na célula nervosa, isto é, uma neurotoxina, responsável pela destruição por êle constatada, do sistema neuro-vegetativo periférico, ao que se deve, na sua opinião, tôda a sintomatologia da doença.

Antes do professor KOEBERLE, já os pesquisadores russos KLYUEVA & ROSKIN (1946) tinham atribuído a uma toxina a ação destruidora demonstrada pelas suspensões de *S. cruzi* sôbre certos tumores, mas já agora, tal fato é atribuído à ação enzimática do parasita.

Apesar de tôdas essas afirmativas, até hoje não existe nenhuma prova da existência de uma toxina secretada pelo *S. cruzi*, no exato sentido que exprime êste termo, isto é, substância tóxica dotada de poder antigênico.

O que chama a atenção de todos que, no decurso da experiência tenham tido ocasião de inocular por via venosa, seja em coelho, cão ou cavalo, suspensões de parasita representadas por formas de cultivo, é a tolerância absoluta que êsses animais apresentam a essas inoculações, por mais espessas que sejam as suspensões. MUNIZ e SÉRGIO DE AZEVEDO tiveram ocasião de inocular por via venosa, suspensão de *S. cruzi* mortos, em indivíduos portadores de tumores, sem observar nenhuma reação.

No entanto, é de conhecimento geral o choque que provoca a simples inoculação por via venosa de mínima dose, de proteínas bacterianas (tífica, gonocócica, etc.).

* * *

Segundo EVANDRO CHAGAS, a patogenicidade do *S. cruzi* estaria na dependência de infecções sucessivas, as quais determinariam num indivíduo adulto, a sintomatologia característica da doença.

Tal ponto de vista está em contraposição ao de CARLOS CHAGAS que acha não serem necessárias reinoculações, para que ocorram os processos patogênicos de maior intensidade. Segundo êle, os próprios tripanosomas, transportados de um a outro território orgânico pelas correntes sangüínea e linfática, seriam suficientes para determinar tais processos. Não existiam no organismo, em tempo algum, elementos de defesa suficientemente intensos para atenuação da infecção.

O ponto de vista defendido por CARLOS CHAGAS coincide com a observação segura de pessoas, contaminadas no laboratório e vivendo fora de

qualquer possibilidade de contaminação exógena, apresentarem após longo período toda a sintomatologia clássica da doença, bem como, com o conceito de alergia admitido hoje como fator importante na sua patogenia.

O que chama atenção nos portadores de infecção chagásica, em fase crônica, é a desproporção entre a intensidade das lesões apresentadas e a raridade dos cistos parasitários.

Conforme foi referido anteriormente, deve-se a MAGARINOS TORRES, em 1929, a introdução desse conceito, na patogenia da *trypanosomíasis americana*.

Estudando a miocardite intersticial crônica, nessa doença, TORRES mostrou que tal processo não representava a evolução tardia ou positiva da miocardite aguda difusa inicial, mas, sim, uma miocardite em franca evolução contínua e progressiva, atribuindo tal fato, não só à ação repetida do parasita, mas também, à constituição de um estado alérgico. E mais tarde, a estabelecer um novo conceito de que lesões vasculares precoces condicionam a reação inflamatória nas infecções do *S. cruzi*, voltou a afirmar: "as reações alérgicas, ou sejam processos patológicos modificados em virtude da infecção primária anterior, desempenham papel importante".

Seguiram-se os trabalhos de MAZZA e colaboradores (1941) sobre certas manifestações para o lado da pele e que êle as classificou como alergides, dando-lhes um nome genérico de esquizotripanides.

MAZZA & JÖRG (1936), dividem sob o ponto de vista patogênico, a evolução da enfermidade de Chagas em três períodos:

1) *Período primário*, compreendendo o período de invasão com a disseminação pelas vias linfáticas e sangüínea do agente infeccioso, no qual as respostas dos tecidos são do tipo normérgico.

2) *Período secundário*, representado pelas sucessivas infecções endógenas e na qual as reações dos tecidos são em grande parte alérgicas.

3) *Período terciário*, representando a fase de reparação na qual predominam os fenômenos de fibrose.

Em 1947, MUNIZ & AZEVEDO, com o fim de esclarecer o modo pelo qual age no organismo o *S. cruzi*, verificaram a possibilidade de ser determinado um estado alérgico, em animais, pela inoculação de lisados e suspensões de formas mortas desse parasita e isentos de qualquer proteína estranha.

Como animal de experiência usaram o *rhesus* (*Macaca mulata*), por apresentar esse animal, quando infectado pelo *S. cruzi*, um quadro imunológico muito semelhante ao observado nos portadores de doença de Chagas.

Para êsses estudos, inocularam inicialmente 2 *rhesus* por via venosa, com 5 doses de antígeno dadas com 3 dias de intervalo. Tal tratamento tinha por fim determinar, nesses animais, um estado de sensibilidade para as proteínas do parasita.

Decorridos 13 dias da ministração da última dose foi introduzida, nesses animais, a dose desencadeante.

Com o fim de observar as alterações que pudessem ocorrer no organismo desses animais, após o desencadeamento da reação, foram os mesmos sacrificados em períodos diferentes. Um deles recebeu, ainda, 3 doses do antígeno no decorrer desse período, para melhor poder ser estudada a evolução das lesões acaso provocadas pelo desencadeamento da reação.

O soro desses *rhesus*, obtido antes de serem sacrificados, reagiu fortemente na reação de precipitina.

Nesses animais, as lesões observadas foram de 2 tipos diferentes: lesões de natureza hiperérgica, para o lado da plêura, traduzidas por processo inflamatório e formação de granuloma, e lesões inflamatórias do coração, reproduzindo com exatidão, a miocardite encontrada na doença de Chagas.

Posteriormente, com o fim de eliminar a hipótese de que as alterações observadas no miocárdio pudessem ser atribuídas a uma ação tóxica ligada ao corpo do parasita, inocularam dois outros *rhesus*.

Um recebeu diretamente no músculo cardíaco 0,005 g, e pela veia 0,015 g, de massa dessecada de parasita, injeções essas que foram feitas no mesmo dia.

Outro recebeu, por via venosa, 5 injeções de antígeno, dadas com 3 dias de intervalo, totalizado em 0,312 g de massa úmida (lisados) e 0,042 g de massa dessecada, representando uma dose bem maior que as injetadas nos dois primeiros *rhesus*.

Esses animais apresentaram grande tolerância à tão elevada dose de antígeno. Apesar de administrado por via venosa, êle não determinou reação ou choque algum, demonstrando tal fato, a pouca toxidez das formas de cultivo.

Nestes *rhesus*, o exame histopatológico não revelou a existência, quer das lesões alérgicas da pleura, quer da reação inflamatória do miocárdio, que se mostravam absolutamente íntegros.

Esses autores concluíram dessas experiências que as formas mortas de cultivo do *S. cruzi*, se comportam da mesma maneira que uma albumina heteróloga dotada de elevado poder sensibilizador, e que as lesões observadas, não só as da pleura como as do miocárdio, decorriam do particular estado criado pela sensibilização. Que o intenso processo de miocardite encontrado nos dois primeiros *rhesus*, demonstra uma maior sensibilidade do coração em relação a qualquer outra víscera ou tecido, em reagir após estabelecido esse particular estado quando em presença do antígeno do *S. cruzi*, constituindo-se por isso, num verdadeiro "órgão de choque" e que tal fato poderá encontrar explicação, se fôr levada em conta a grande predileção demonstrada pelo parasita em localizar-se nesse órgão, no decorrer do processo infeccioso.

A identidade do quadro histopatológico observado no miocárdio desses dois *rhesus*, com o encontrado nos portadores da doença de Cha-

gas, vem modificar segundo MUNIZ & PENA DE AZEVEDO o conceito admitido pela maioria dos pesquisadores que se ocuparam do assunto, de que a patogenia dessa doença decorre de uma ação puramente mecânica ou tóxica exercido pelo parasita nos tecidos ou nos órgãos nos quais se localizam.

A hipótese aventada por TORRES, em 1929, encontrou nessas pesquisas a confirmação experimental.

Prosseguindo nessa série de experiências, MUNIZ & PENA DE AZEVEDO (1949), verificaram a possibilidade de transmitir passivamente, à semelhança das provas de Prausnitz-Künstner, de Loveless, etc., o estado alérgico assim obtido, inoculando por via intrapleural em *rhesus* normais, sôro de animais da mesma espécie previamente sensibilizados para proteínas do *S. cruzi*, e reagindo à prova de precipitina.

Foram os seguintes os resultados a que êles chegaram dessas experiências e de outras complementares realizadas com o mesmo fim:

a) O sôro de *rhesus* sensibilizados por meio de injeções repetidas de antígeno de *S. cruzi*, é capaz de, quando injetado na pleura de animais da mesma espécie, porém normais, condicionar os tecidos dessa região, a reagir de maneira especial, quando em contacto com o antígeno específico.

b) Êste modo de reagir das células de tecido pleural em presença do antígeno específico está condicionado a um contacto prévio dessas células com sôro de animal sensibilizado pelo mesmo antígeno, demonstrando assim estar o mesmo na dependência de uma reação de tipo antígeno-anticorpo. Êste ponto de vista é reforçado pelos resultados negativos obtidos em experiências para reproduzir tais aspectos, em pleuras de *rhesus* normais com simples injeções de antígeno ou da mistura antígeno — tinta da China.

c) O anticorpo responsável possui capacidade de fixar no tecido da pleura e condicionar êsse tecido a reagir de maneira especial, quando em contacto com o antígeno específico.

d) A ausência de lesões da pleura direita do animal em experimentação, que, embora sensibilizado pelo sôro, não recebeu diretamente a dose de antígeno, demonstra a necessidade de um íntimo e demorado contacto entre o tecido sensibilizado e o antígeno, como ocorreu na pleura esquerda do mesmo animal.

e) A constituição das lesões encontradas em consequência dessa reação, exige um prazo de tempo mais ou menos prolongado em vista do seu caráter inflamatório produtivo.

f) As lesões encontradas são comparáveis às que por êles foram anteriormente descritas na pleura de *rhesus* previamente sensibilizados por via venosa, com antígeno de *S. cruzi*, nos quais a dose desencadeante do antígeno, injetada por via pleural, foi feita com um intervalo mínimo de 13 dias, após o animal ter recebido a última dose sensibilizante.

Diante do que foi exposto, a patogenicidade do *S. cruzi* pode ser expressa pelo fórmula de Rich: $D = \frac{NVA}{R}$, em que N = n.º de germes ou parasitas; V = virulência; A = alergia infecciosa; R = Resistência.

* * *

Sob o ponto de vista da imunidade, o *S. cruzi*, caracteriza-se por uma elevada antigenicidade. Nenhum dos protozoários patogênicos apresenta essa característica de maneira tão acentuada.

Utilizando a via venosa, pode-se obter sôros com elevado teor de anticorpos. Títulos aglutinantes de 1:50.000 e de 1:100.000 podem ser obtidos imunizando coelhos ou cavalos com formas de cultivo do parasita.

Uma análise mais aprofundada da constituição antigênica do *S. cruzi*, ainda está para ser feita. Entretanto, componentes somáticos e flagelar, componentes de grupo, polioside e componentes capazes de reagir com anticorpos do tipo heterófilo já foram assinalados na estrutura antigênica desse parasita.

SENEKJIE (1943) foi o primeiro a evidenciar, por meio de imune-sôros preparados em coelhos, componentes somáticos (O) e flagelar (H).

MUNIZ & FREITAS (1944), trabalhando em sôros de indivíduos portadores da *Trypanosomíasis americana*, quer na fase aguda como na fase crônica da doença, evidenciaram igual fato.

Componentes relacionados com outros tripanosomídeos, isto é, componentes de grupo, foram demonstrados por meio das reações de aglutinação, precipitação e fixação de complemento.

É assim que imune-sôros *anti-Leishmania*, *anti-Endotrypanum schaudinni* aglutinam as formas de cultivo do *S. cruzi*, o mesmo acontecendo em relação ao imune-sôro *anti-S. cruzi* que aglutina suspensões de cultivo do *Endotrypanum schaudinni* e de parasitas do gênero *Leishmania* (MARQUES DA CUNHA & MUNIZ, 1944).

Sôro de portadores de *Trypanosomíasis americana*, em fase aguda, aglutina formas de cultivo da *L. brasiliensis*, enquanto que sôros de portadores de leishmaniose cutânea americana, sendo dotados de baixo poder aglutinante, para a espécie homóloga, são praticamente desprovidos de poder aglutinante para as formas de cultivo do *S. cruzi* (MUNIZ & FREITAS, 1944).

Imune-sôros *anti-cruzi* e sôros de portadores da *Trypanosomíasis americana* fixam o complemento quando em presença de suspensões do *Trypanosoma equiperdum* e *equinum* e da *Leishmania brasiliensis* (MUNIZ & FREITAS, 1944).

Sôros de portadores da *Leishmaniose tegumentar americana*, podem fixar o complemento quando em presença do antígeno do *S. cruzi*, e idêntico fato pode ser observado em relação aos sôros de portadores de *Trypanosomíasis americana* quando em presença de antígenos de *Leishmania brasiliensis* (MUNIZ & FREITAS, 1944; CHAFFEE *et alii*, 1956).

MUNIZ & FREITAS (1944) foram os primeiros a isolar uma fração contendo poliósido das formas de cultivo de *S. cruzi*, e utilizar essa fração como precipitinogênio na reação de precipitina, com fins de diagnóstico.

Já SENEKJIE (1941) havia isolado um poliósido da *Leishmania tropica*, tendo estudado o seu emprêgo no diagnóstico do botão do Oriente, por meio do teste cutâneo de hipersensibilidade.

Conhecendo os resultados obtidos por diferentes autores com o emprêgo do método de Fuller, na extração do poliósido, não só dos estreptococos, como dos componentes do grupo das *Shigelas*, e o comportamento dessa fração nas reações de precipitina, permitindo a separação dos diferentes representantes desses agrupamentos bacterianos, MUNIZ & FREITAS resolveram utilizar êsse método com a finalidade que tinham em vista.

Êsses autores utilizaram diversos tripanosomídeos além do *S. cruzi* (amostra recentemente isolada e amostras mantidas em meio de cultivo, vários anos), tais como: *L. brasiliensis*, *L. donovani*; *Endotrypanum schaudinni*; *Leptomonas oncopelti*; *Leptomonas culicidarum*.

Dêsses diferentes parasitas extraíram frações contendo poliósido e estudaram, utilizando da técnica do anel, o comportamento dessas diferentes frações quando em presença de imune-sôros específicos, preparados em coelhos, contra êsses parasitas, verificando os seguintes fatos:

1) Essas diferentes frações eram capazes de reagir intensamente quando em presença dos respectivos imune-sôros.

2) Davam reações de grupo com exceção das frações extraídas das duas *Leptomonas* de insetos, que demonstraram comportamento diferente, pois não reagiram com nenhum anti-sôro das espécies parasitas de vertebrados com que trabalharam.

3) Sôros *anti-Leishmania*, davam reações positivas com a fração do *Endotrypanum schaudinni*.

4) Imune-sôro *anti-Endotrypanum schaudinni* embora reagindo fortemente com a fração homóloga, se mostrou incapaz de reagir com as frações das duas espécies de *Leishmania* com que trabalharam.

5) O fato dos imune-sôros *anti-Leishmania* reagirem com a fração *Endotrypanum schaudinni*, revela menor especificidade dessa reação, comparada com o aglutinogênio do mesmo parasita que, de acôrdo com a verificação de MARQUES DA CUNHA & MUNIZ (1944), não reagem em presença de aglutininas específicas para os parasitas do gênero *Leishmania*.

6) A maneira idêntica de se comportarem nas provas de precipitinas das frações extraídas, quer de amostras do *S. cruzi*, recentemente isoladas, como de outras, mantidas há vários anos, em meios artificiais de cultivo, demonstra que tal fato não interfere no comportamento dessa fração.

Êsses resultados vieram demonstrar que a fração poliósido dêsses tripanosomídeos apresenta certa comunidade antigênica, ao contrário do que ocorre com poliósido de certas bactérias, que são absolutamente

específicas. LAZLO (1950), que teve ocasião de estudar, sob o ponto de vista químico, a fração extraída do *S. cruzi*, concluiu conter ela glicídios sob a forma de poliósido.

Sob o ponto de vista imunológico, o poliósido extraído das formas de cultivo do *S. cruzi*, comporta-se como um hápteno, apesar de quando inoculado em coelhos determinar a formação de anticorpo, embora em baixa concentração, fato explicável por não representar um poliósido em estado de pureza, mas, ligado a outros componentes, provavelmente a um suporte protéico.

A massa de precipitado formada após ação da acetona, quando suspensa em soluto fisiológico revelou-se dotada de poder fixador, quando em presença de sôros específicos.

Mais tarde, tendo por fim obter um componente mais puro e livre de suporte protéico, MUNIZ passou a extrair do precipitado, obtido pela ação da acetona e após prévio dessecação, a fração ativa por difusão em soluto fisiológico ou solução fisiológica tamponada.

Quanto ao comportamento dessa fração como precipitinogênio, nas provas de precipitina com finalidade de diagnóstico, será referida posteriormente.

Quanto à componente (s) capaz de reagir com anticorpos heterófilos, foi evidenciada na estrutura antigênica do *S. cruzi*, por MUNIZ & SANTOS (1950) por meio da hemólise condicionada (MUNIZ, 1950). Esses autores verificaram que a fração poliósido, quando absorvida por hemátias de indivíduos possuindo no sôro anticorpos heterófilos, reagia quando em presença dos respectivos sôros, embora não fôsem portadores de esquizotripanosomose.

A prova de absorção demonstrou, que podiam ser de dois tipos esses anticorpos que assim reagiam, um relacionado com o anticorpo F (absorvido 100% com rim de cobaio), e o outro, relacionado com o anticorpo da mononucleose (parcialmente absorvido com rim de cobaio e praticamente com 100% de absorção com glóbulos de carneiro).

Esse fato levou MUNIZ & SANTOS a concluir da existência, nessa fração, de componentes com propriedades heterófilas, confirmando o que haviam, em 1944, MUNIZ & FREITAS demonstrado, isto é, que o desaparecimento após absorção por rim de cobaio do poder aglutinante apresentado para o *S. cruzi*, por certos sôros normais com anticorpos heterófilos, falava a favor da existência de componente (s) heterogênico (s), na estrutura antigênica do *S. cruzi*.

De todos os anticorpos, o amboceptor específico, foi o primeiro a ser evidenciado nas infecções humanas pelo *S. cruzi* e tem sido o mais investigado no decorrer da infecção, principalmente, com finalidades de diagnóstico. Conforme foi assinalado anteriormente, GUERREIRO & MACHADO, em 1913, foram os primeiros a demonstrar a sua presença em sôros de portadores de *Trypanosomíasis americana*, utilizando antígenos constituídos por tripanosomas obtidos de cãesinhos muito infectados, bem como, extrato aquoso glicerinado dos órgãos desse animal, de preferência baço.

Posteriormente, outros tipos de antígeno foram empregados, tais como: antígeno de Watson (MUNIZ, 1930), *Trypanosoma equinum* e formas de cultivo de *L. brasiliensis* (MUNIZ & FREITAS, 1944), baseados na existência de uma reação de grupo com êsse componente.

Deve-se a KELSER (1936) a introdução, na técnica de fixação, de antígenos constituídos por formas de cultivo do parasita suspenso em soluto glicerinado.

No decorrer dos últimos 15 anos, o seu emprêgo generalizou-se embora diferentes modificações quanto ao preparo tenham sido propostas. É assim que LIEM & VAN THIEL (1941) utilizam formas de cultivo lavadas e dessecadas a 37°; DAVIS (1943) formas de cultivo suspensas em mertiolato a 1:10 000; MUNIZ (1948) formas de cultivo lavadas e liofilizadas; FREITAS & ALMEIDA (1949) formas de cultivo tratadas pelo método de BOER & COX (1947); ESPAÑA & HAMMON (1948); CHAFFEE *et alii* (1956), formas de cultivo dessecadas a — 55° tratadas pelo éter sulfúrico a — 15°-18°; depois a massa residual é extraída com uma solução tamponada com pH 8.6-8.7, que após centrifugação é dessecada e mantida em baixa temperatura.

Entretanto, até a presente data nenhum dos antígenos propostos supera aquêle constituído por formas de cultivo, obtidas em condições ótimas de desenvolvimento, e que após lavagem são liofilizadas e mantidas no frigorífico a — 30°, em ampôlas fechadas até o momento de emprêgo, quando são suspensas em soluto fisiológico ou solução tamponada de Veronal. Êsse tipo de antígeno possui a grande vantagem de mostrar-se inalterável e poder ser empregado dentro de uma concentração exata, após pesada.

Na execução da reação de fixação, a técnica geralmente empregada pela maioria dos autores que dela se tem ocupado é a clássica, que utiliza a unidade de complemento expressa em 100% de hemólise. Mais recentemente, FREITAS & ALMEIDA (1949) propuzeram o emprêgo da técnica quantitativa de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER (1938) utilizada no diagnóstico da Sífilis, técnica essa já introduzida por BOZICEVICH, HOYEM & WALSTON (1946) no diagnóstico de algumas parasitoses, com pequena modificação quanto à maneira de avaliar os resultados visando simplificar a execução. Na técnica de WADSWORTH *et alii* o grau de fixação é medido quantitativamente em termos de porcentagem de hemólise e envolve o uso de um quociente que exprime a relação entre a quantidade de complemento necessária a determinar 50% de hemólise, quando em presença do sôro mais o antígeno e, a quantidade de complemento necessária a determinar 50% de hemólise, quando em presença sòmente do sôro. WADSWORTH *et alii* (1938) consideram êsse quociente o índice da potência do sôro a examinar, e quocientes maiores que a unidade evidenciam, segundo êles, uma reação de imunidade.

Sôbre o valor da pesquisa do amboceptor específico pela reação de fixação do complemento no diagnóstico da *Trypanosomíasis americana*, a quase totalidade dos autores, que dela se tem ocupado, são acordes em reconhecê-la como o meio mais seguro para evidenciação dos casos

crônicos, não sendo superada nesse particular por nenhuma outra reação de tipo imunológico. Entretanto, quanto ao seu comportamento em relação a casos agudos e subagudos, divergências fundamentais existem.

Sem pretender fazer uma exaustiva citação bibliográfica sobre o assunto, focalizaremos apenas os pontos de vista extremos, de pesquisadores brasileiros.

É assim que MUNIZ obtém 100% de reações positivas nos 67 casos de forma aguda, que teve ocasião de estudar no decorrer dos últimos 15 anos, casos êsses oriundos, a maioria dêles de Bambuí, Estado de Minas Gerais, e internados no Hospital Evandro Chagas (Instituto Oswaldo Cruz). Os sôros oriundos dêsses casos reagiram de igual maneira à prova de precipitina (técnica de MUNIZ & FREITAS, 1944).

Inicialmente MUNIZ (1944-1947) trabalhou com o antígeno de Davis, mas posteriormente (1947 a 1959) passou a usar formas de cultivo liofilizadas suspensas no momento do emprêgo em soluto fisiológico ou solução tamponada de Veronal. A técnica utilizada, a princípio, na execução de reação foi a clássica, em que a unidade de complemento expressa em 100% de hemólise é determinada em presença do antígeno, sendo na reação empregada a unidade retificada com 0,1 ml.

Posteriormente, passou a usar a mesma técnica com algumas modificações cujos detalhes constam do final dêste trabalho.

PELLEGRINO & BRENER (1952) praticando a reação de fixação no sôro de 14 pacientes na fase aguda, verificaram que ela resultou positiva em 6 casos, duvidosa em 1 e negativa em 7. Entretanto, êsses mesmos autores, estudando o comportamento na reação de precipitina (técnica de MUNIZ & FREITAS) do sôro de 39 crianças na fase aguda da doença, verificam que 38 delas dão uma reação positiva e somente em um ela se mostrou negativa. Todos os casos em que os sôros reagiram, apresentaram tripanosoma no sangue, enquanto que no caso negativo o parasita só pôde ser revelado por meio de xeno-diagnóstico.

PEDREIRA DE FREITAS (1951), usando técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner e um antígeno constituído por formas de cultivo dessecadas e tratadas pelo benzeno, depois suspensas em água destilada acrescida de clorofórmio com o fim de geleificar a massa de tripanosomas, obteve o seguinte resultado, em 14 sôros de casos agudos e subagudos estudados: 7 não reagiram; em 2, o título foi menos que 2,0; e em apenas 5, maior que 2,0.

RASSI *et alii* (1958) estudam 18 casos agudos, cujos sôros foram enviados ao Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, serviço do Prof. Mauro Pereira Barreto, e as reações praticadas pelo Dr. Astolfo Ferraz de Siqueira usando a técnica de Wadsworth *et al.* e possivelmente o mesmo antígeno de P. Freitas, com os seguintes resultados: dos 18 casos, a reação foi positiva em 16, nos quais o tempo da doença variou entre 13 e 31 dias; nos dois restantes, em um, o sôro se mostrou anticomplementar e no outro a reação foi duvidosa, nas amostras de sôro colhidas no 18.^o e 27.^o dia da doença (título 1,5).

DIAS (1955) refere, em trabalho estatístico, que em 131 casos observados pelo pôsto de Bambuí e apresentando tripanosoma no sangue ao exame direto, a reação de fixação com antígeno de Davis foi positiva em 124 (94,6%), negativa em 4 (3,1%) e duvidosa em 3 (2,3%).

Difícil se torna a interpretação de resultados tão discordantes principalmente se levarmos em conta que foram obtidos alguns deles utilizando-se antígenos preparados por métodos diferentes e as reações não foram conduzidas dentro da mesma técnica.

Entretanto os resultados relatados por RASSI *et al.*, obtidos empregando técnica igual a usada por P. Freitas, e com maior casuística que êsse autor, confirma os resultados obtidos por MUNIZ e os referidos por DIAS, os quais demonstram não assistir nenhuma razão a FREITAS (1951) quando procura assemelhar o quadro sorológico observado na *Trypanosomíasis americana* como o observado na sífilis, na qual usando suas próprias expressões “depois de um período pré-sorológico em que não há anticorpos (ou reaginas) fixadores de complemento no sangue, êstes vão aumentando progressivamente para só mais tarde, no secundarismo, atingirem altos valores”.

CHAFFEE *et alii* (1956) comentando os resultados obtidos por FREITAS & ALMEIDA (1949) atribuem os índices baixos por êles obtidos (1,7 — 4,6), talvez, a alteração das formas de cultivo no decorrer do preparo do antígeno, como também ao curto espaço de tempo por êles utilizado para a fixação em baixa temperatura (4 horas 3°-6°).

Na reação de fixação, CHAFFEE *et al.* utilizam 5 unidades de complemento C'H₅₀; 0,1 ml de sôro não diluído, ou em diferentes diluições quando o método é quantitativo, e a fixação é realizada pelo espaço de 16 a 18 horas a 3°-6°.

E. CHAGAS (1934) em experiência *in anima nobile* refere que a reação de fixação mostrou-se positiva já no 10.º dia após inoculação do parasita e que, embora o sangue retirado no 8.º dia se mostrasse capaz de infectar cobaios, o tripanosoma só foi encontrado pelo exame direto no 37.º.

LIEM & VAN THIEL (1941) trabalhando com cães assinalam que as reações de fixação se tornam mais intensas com o aparecimento de tripanosomas no sangue periférico.

MUNIZ & FREITAS (1946) infectando 4 *rhesus* pela conjuntiva, verificaram que a reação de fixação mostrou-se positiva já no 5.º dia do período pré-patente, cuja duração variou entre 8 e 10 dias. Em 12 cães infectados experimentalmente com amostras obtidas de casos humanos e nos quais os períodos pré-patentes variaram entre 9 e 14 dias, a reação de fixação se mostrou positiva em 6 animais entre o 6.º e o 8.º dia; em 4 entre o 9.º e o 10.º dia; permanecendo negativa em 2, que só vieram a positivar no período patente (MUNIZ *et al.*, 1953).

Embora possam ocorrer variações quanto à sua intensidade, ela permanece positiva no decorrer da fase crônica, mesmo sem nenhuma sintomatologia como demonstram casos estudados desde a fase aguda

e que voltaram a ser observados 6, 8 e até 30 anos depois. As variações observadas quanto à intensidade da reação parecem indicar uma maior atividade do parasita no organismo.

Fora dos casos em que reações de grupo podem ocorrer (*Leishmaniose tegumentar americana*), (MUNIZ & FREITAS, 1944; CHAFFEE *et al.*, 1956), conforme foi assinalado anteriormente, a reação de fixação é específica, como demonstram as estatísticas de LIEM & VAN THIEL (1941) na Holanda, de DAVIS & SULLIVAN (1946) obtida nos Estados Unidos, países em que a *Trypanosomíasis*, não ocorre ou não é endêmica.

LIEM & VAN THIEL referem, entretanto, que sôros de 4 casos de *ulcus molle*, de 6 examinados deram resultados positivos com o antígeno de *S. cruzi* o mesmo ocorrendo com o sôro de coelho imunizado com a vacina *Dmelcos*; e que de 146 sôros Wassermann positivos, 4 foram capazes de reagir com o antígeno de *S. cruzi*.

CHAFFEE *et al.* (1956) referem que, extraíndo pelo éter a massa previamente dessecada das formas de cultivo do *S. cruzi*, com a qual preparam o antígeno por eles utilizado, puderam reduzir consideravelmente a frequência de falsas reações sorológicas, e que êsse fato sugere a possibilidade de ocorrerem lipídios semelhantes aos que reagem com sôros sífilíticos, na estrutura antigênica do *S. cruzi*.

* * *

Quanto às lisinas temos os trabalhos de DENISON (1943), que estudando o poder lítico de sôros de ratos infectados com *S. cruzi*, verificou que lisavam as formas de cultura, ocorrendo tal fenômeno em menos de duas horas, quando os sôros em questão eram empregados em natureza e num maior espaço de tempo, quando diluído a 1/5. Nos animais infectados, mas que tinham sido previamente bloqueados, o poder lítico mostrava-se diminuído.

Retomando êsses estudos em 1945, MUNIZ & BORRIELLO verificaram que sôros normais, quer do homem, como do cobaio, lisavam as formas de crídiás, elementos que constituem cerca de 80% do cultivo, enquanto as formas de leishmania, as crídiás evoluindo para metacíclicos e, êstes últimos, não se mostravam sensíveis a essa ação e que esta ocorria por conta de lisinas naturais ligadas à atividade do complemento e que a sensibilidade demonstrada por elas invalidava o seu emprêgo em ensaios, com o fim de verificar a presença de imunolisinas no sangue de animais infectados.

Trabalhando com suspensões puras de metacíclicos obtidos de cultura e com suspensões de tripanosomas metabólicos, obtidos de animais infectados, MUNIZ & BORRIELLO constataram os seguintes fatos:

Que os metacíclicos eram mais sensíveis à ação lítica de sôros quer imunes, como de portadores da *Trypanosomíasis*, que as formas metabólicas.

Que essas, embora lisadas quando em presença de imune-sôros se mostravam menos sensíveis a essa ação quando em presença de sôro

chagásico, embora um certo número de formas viessem a sofrer a lise. Ao contrário dos metacíclicos, que apresentavam grande tendência a se aglutinarem em presença desses sôros, os metabólicos opunham u'a maior resistência.

Que de 10 sôros de portadores da doença de Chagas só 2 dêles provindos de casos recentes, se mostraram dotados de poder lítico.

Quanto à transformação dos tripanosomas metabólicos em elementos leishmanióides, MUNIZ & BORRIELLO verificaram o seguinte:

Que essa transformação era mais intensa quando em presença de imune-sôros e de sôros de portadores da infecção, que de indivíduos normais.

A relação entre o número de formas de tripanosomas e de elementos leishmanióides encontradas nas diferentes misturas ensaiadas, foi acima de 26,6 para os sôros normais, e não ultrapassou 1,31 para os sôro-ímmunes e de portadores de *Trypanosomíasis*. O índice mais baixo, 0,05, foi obtido com sôro de chagásico.

Essa observação levou MUNIZ & BORRIELLO a admitirem representar essa transformação em formas de leishmania, não só como uma necessidade biológica com fins de multiplicação, mas também, como um ato de defesa do próprio parasita. E que, possivelmente, o determinismo que preside a transformação das formas de leishmania em tripanosoma, no organismo do vertebrado esteja condicionado em grande parte a um aumento da diminuição do poder destrutivo exercido pelo organismo sôbre o parasita.

* * *

Quanto às aglutininas, apesar das referências da ação de imune-sôros, bem como a constatação do poder aglutinante de sôro de cobaio, quando infectado pelo *S. cruzi* (PACKCHANIAN, 1935; SENEKJIE, 1943), nenhuma demonstração havia sôbre o comportamento dos sôros de portadores da infecção chagásica em relação a êsse anticorpo. O primeiro estudo relacionado com êste assunto, consta do trabalho publicado em 1944 por MUNIZ & FREITAS no qual demonstram que, em 6 casos agudos estudados, os títulos aglutinantes variavam entre 1/2560 a 1/10240 enquanto que, em 24 casos crônicos, os títulos observados variaram entre 1/160 e 1/2560.

Posteriormente, numa casuística de cêrca de 211 casos crônicos diagnosticados pela reação de fixação do complemento, puderam MUNIZ & FREITAS (1946), constatar que títulos mais baixos que 1/160 podiam ser obtidos tais como 1/80, 1/40 (15%), tornando-se difícil, nesses casos, decidir sôbre a positividade da reação, em vista de sôros de indivíduos não portadores da infecção poderem aglutinar formas de cultivo do *S. cruzi* nessas diluições.

Estudando a evolução dos títulos aglutinantes em sôros obtidos de 4 doentes desde a fase aguda, puderam êsses autores verificar variações, conforme se pode ver no quadro abaixo:

PACIENTES	M.L.					J.A.				I.G.				H.C.		
	15	45	85	115	145	18	48	116	600	20	50	83	113	27	57	88
Dias de infecção.....																
Títulos aglutinantes...	10 240	2 560	1 280	1 280	1 280	12 800	2 560	1 280	320	10 240	2 560	640	320	2 560	640	160

E num doente cuja infecção datava de 30 anos, o título aglutinante verificado foi de 1/640. HAUSCHKA *et al.* (1950) constatam o que MUNIZ & FREITAS haviam assinalado em trabalho anterior, isto é, que sôros crônicos podem exercer atividade aglutinante sobre as formas de cultivo do *S. cruzi*; que a atividade do fenômeno variava com a amostra utilizada; que em 4 sôros de moléstia de Chagas em que trabalharam obtiveram aglutinação intensa e uniforme em tôdas as cêpas estudadas.

Quanto ao poder aglutinante de sôro de animais quando infectados com *S. cruzi*, MUNIZ *et al.* (1952) puderam constatar de início que nesses animais, mesmo quando não infectados, o sôro era capaz de aglutinar as formas de cultura do *S. cruzi*, em títulos bem elevados (1/160 a 1/1 200) e que tal fato não decorria da existência de anticorpos naturais, pois êsses sôros, após a absorção com as formas de cultivo do parasita, não apresentaram praticamente nenhuma variação em relação ao título primitivo. Quando infectados, pequenas variações puderam ser observadas nesses títulos no decorrer do período pré-patente, mas já no período patente constataram que os títulos iniciais apresentavam-se bem mais elevados (1/640 e 1/2 560), para caírem de maneira acentuada no período pós-patente.

Nessas experiências trabalharam em 12 animais, todos adultos, que foram infectados por via peritonal com sangue de cobaio, contendo o parasita (amostra humana).

GOBLE (1952) constatou, também, que as amostras de cultivo do *S. cruzi* com que trabalhou, aglutinavam em presença de sôros de cães normais (título 1/200), embora títulos um pouco maiores fôssem obtidos no período patente em alguns dêles depois de infectados. Concluiu êsse autor, ser de pouco valor êsse teste nos animais com que trabalhava.

MUNIZ & FREITAS (1946) puderam verificar, em *rhesus* (4) infectados experimentalmente, que no 2.^o dia do período patente os sôros já apresentavam títulos variando de 1/160 a 1/320 os quais rapidamente subiram, para no 10.^o dia do período patente, oscilarem entre 1/1 280 a 1/2 560, conservando-se alto até a morte. Num dos *rhesus* que permaneceu infectado por 20 meses, o título aglutinante verificado após êsse período foi de 1/1 280, embora não apresentasse parasita no sangue pelo exame direto.

O emprêgo, na técnica de aglutinação de suspensões mortas do parasita (ácido fênico, formol, etc.) em vez de suspensões vivas, diminui

de muito a sensibilidade do teste, principalmente quando se trabalha não com imune-sôro de elevado poder aglutinante, mas com sôros de indivíduos ou animais portadores de infecção. A técnica de lâmina com leitura após 3 a 5 minutos proposta por СЕНЕКЈИЕ é despida de qualquer valor, principalmente nesses casos.

Uma das dificuldades na prova da aglutinação é que nem tôdas as amostras do *S. cruzi* se prestam a ser utilizadas, por apresentarem aglutinação espontânea, quando suspensas em soluto contendo eletrolito (NaCl), sendo que as culturas em meios líquidos são as que mostram maior tendência a apresentarem êsse fenômeno. A leitura, após 24 horas, a 37°, é a que melhor resultado fornece.

Recentemente NUSSENZWEIG & FARIA (1955), com o fim de melhorar a técnica de aglutinação, procuraram introduzir a prova de anti-globulina (Prova de Coombs indireta). Controlando pela reação de fixação do complemento, verificaram que em 61 sôros positivos para a reação de fixação, 60 apresentaram a prova de Coombs positiva. De 97 sôros com a reação de fixação negativa para doença de Chagas, somente 2 foram Coombs positivos.

Contudo, segundo êles, o emprêgo da prova de Coombs rotineiramente é dificultado pela necessidade de ser usado como antígeno o flagelado vivo, porque as suspensões mortas são pouco aglutináveis.

* * *

O isolamento da fração poliósíde das formas de cultivo do *S. cruzi*, por MUNIZ & FREITAS em 1944 e o seu emprêgo como precipitinogênio na reação de precipitação permitiu a introdução de um método valioso, quer no estudo da imunidade, como na evidenciação de casos da *Trypanosomíasis americana*.

Embora utilizando a técnica menos sensível nesse tipo de reação, como seja a técnica do anel, aquêles autores, em 20 sôros de portadores de infecção, puderam verificar que todos aquêles oriundos de casos agudos deram reações positivas, sendo que 5 reagindo fortemente dentro dos primeiros 10 minutos, e 1, menos intensamente, entre 10 a 20 minutos. Dos 14 sôros oriundos de casos crônicos, 6 foram capazes de reagir, sendo 4 com média intensidade e 2, fracamente.

Dois dos sôros de casos agudos, que reagiram intensamente, foram obtidos vinte poucos dias após o aparecimento dos primeiros sintomas da doença (manifestações oculares).

Em relação a um dos doentes que forneceu material para êsses estudos, constataram que no decorrer de 6 meses o respectivo sôro permaneceu dotado de elevado poder aglutinante para as formas de cultivo do parasita, bem como, precipitava fortemente a fração poliósíde.

Um dos sôros no qual a reação de precipitina foi positiva, que mostrou-se capaz de aglutinar o *S. cruzi*, no título de 1/2 560 e fixar fortemente o complemento em presença do antígeno específico, provinha de um auxiliar do Instituto Oswaldo Cruz nascido em Lassance (zona em que grassa endêmicamente o *Trypanosomíasis americana*), mas há

muitos anos residente na Capital do país. Sua atividade no Instituto Oswaldo Cruz consistia em examinar exemplares de triatomídeos utilizados na prova do xeno-diagnóstico. Nêle, não só o exame direto do sangue, como numerosos xenos realizados em diferentes épocas haviam dado resultados negativos. Esse funcionário, cêrca de 15 anos depois de realizados êsses exames, veio a falecer de morte súbita.

Nesse trabalho os autores assinalam uma estreita relação entre o teor de aglutininas e a intensidade da reação de precipitina.

MUNIZ (1947) em outro trabalho no qual estuda o comportamento na reação de precipitação e aglutinação de sôros de 21 novos casos, obtidos não só em plena fase aguda como em diferentes períodos da evolução da doença, obteve resultados iguais aos relatados anteriormente por MUNIZ & FREITAS (1944-1946), isto é, um elevado teor de imune-sôros (aglutinina e precipitina) no período inicial (fase aguda), seguida de uma queda progressiva dêsses títulos, com a passagem da infecção para a fase crônica. As menores concentrações verificadas foram em 2 doentes com baixa idade (1-2 anos) cujos sôros aglutinavam em títulos de 1/1 280. A prova de precipitina se mostrou positiva em todos os casos agudos e, em alguns, mesmo depois de decorrido um período de 3 a 4 meses após o início dos primeiros sintomas.

Nesse trabalho MUNIZ, mostrando as vantagens da técnica de precipitina como método de diagnóstico, assinala os seguintes pontos:

- a) Técnica de reação extremamente simples.
- b) Precipitinogênio estável e de duração longa desde que seja guardado livre de contaminação.
- c) Quantidade mínima de sôro para reação (0,2 ml).
- d) Resultado imediato, pois a maioria dos sôros em casos agudos, reagem nos primeiros minutos.
- e) Absolutamente específica, pois apesar do precipitinogênio do *S. cruzi* reagir em presença de imune-sôros preparados em coelhos com amostras de diversas espécies de *Leishmania* (MUNIZ & FREITAS, 1944), tal fato não ocorre em presença de sôros de indivíduos portadores da Leishmaniose tegumentar americana e da Leishmaniose visceral americana, devida a baixa concentração de anticorpos que êles possuem.
- f) Ela pode constituir um índice do grau de imunidade humoral, pois geralmente ocorre, quando o poder aglutinante do sôro se apresenta em títulos, em tórno de 1/500.
- g) Como a imunidade humoral está quase sempre ligada à maior ou menor atividade do parasita no organismo, ela poderá constituir, também, um índice dessa atividade, como ocorre nas formas agudas e subagudas da doença.

h) De grande utilidade nos inquéritos epidemiológicos para evidenciação de novos casos (agudos e subagudos).

Quanto ao valor no diagnóstico dos casos crônicos, assinala êsse autor, que êle decai muito, como teve ocasião de assinalar em 1946 (MUNIZ & FREITAS), estudando o sôro de 211 casos nessa fase, nos quais observaram sômente em 18%, resultados nítidos.

Nesse mesmo trabalho MUNIZ refere que adsorvendo a fração poliósíde (precipitinogênio) a partículas de colóide ou de carmim, conseguiu resultados animadores no diagnóstico dos casos crônicos apesar das desvantagens do método, por ser de técnica extremamente delicada, podendo conduzir a falsos resultados quando não manejados com grande controle.

PELEGRINO & BRENER (1952) em 14 casos agudos obtêm 100% de reações de precipitina positivas (técnica de MUNIZ & FREITAS, 1944), inclusive em 2 casos quando repetida 3 meses após o início da infecção.

MUNIZ & FREITAS (1946) assinalam que em 4 *rhesus* infectados experimentalmente, a reação de precipitina tornou-se positiva entre o 4.º e o 5.º dia do período patente, permanecendo assim até a morte dos animais.

MUNIZ *et al.* (1952) em 12 cães infectados experimentalmente, puderam observar que a reação mostrou-se positiva, já no período pré-patente em 10 dos animais inoculados, sendo que em 1, no 6.º dia, em 4 entre o 8.º e o 10.º dia e em 5 entre o 11.º e o 14.º dia, permanecendo negativo em 2. No período patente, todos eles deram resultados positivos e no período pós-patente, a reação veio a se negativar num dos animais, 5 dias antes de sua morte, e num outro, após 10 meses de infecção. Nos demais, ela permaneceu positiva com intensidade variável, sendo que após 3 meses de infecção, os soros de 3 dos animais reagiram ainda fortemente, enquanto que de um outro em média intensidade; e de 2, fracamente.

PELEGRINO & BRENER (1953), em 12 cães infectados experimentalmente, usando a técnica de MUNIZ & FREITAS, constataram a presença de anticorpos precipitantes em sôro de 11 desses animais, coincidindo tal fato com o aparecimento de tripanosomas no sangue circulante, 15 a 25 dias após a inoculação. Só em um único animal o resultado foi negativo.

* * *

A adsorção à hemátias da poliósíde do *S. cruzi*, com o fim de estudar o comportamento desses elementos assim sensibilizados quando em presença de sôros de indivíduos portadores da *Trypanosomíasis americana*, isto é, na prova da hemo-aglutinação, levou MUNIZ (1949) a observar a ocorrência de hemólise mesmo quando trabalhava com hemátias do próprio doente, postas em presença do respectivo sôro não inativado.

Diferentes ensaios permitiram que MUNIZ caracterizasse o fenômeno observado com uma reação antígeno-anticorpo, representados pela fração adsorvida e o anticorpo específico, e com isso acarretando o *complemento*. Como a especificidade das hemátias não intervesse no fenômeno, MUNIZ (1949) deu-lhe o nome de "hemólise condicionada".

De início, êle pensou constituir tal fato um caso particular relacionado com a fração do *S. cruzi* em estudo, mas logo após a publicação desse trabalho aparece um outro de FISHER & KEOGH (fevereiro, 1950), constatando o mesmo fenômeno com polissacarídios bacterianos (*Hae-mophilus pertussis*). MIDDLEBROOK, pôsto a par desse trabalho, verifica

na tuberculose, e propõe (agosto, 1950) como havia sido sugerida anteriormente por MUNIZ (1949) o emprêgo de hemátias do próprio doente ou do grupo O, na técnica da hemoaglutinação e na “modificação hemolítica do teste da hemoaglutinação”, como passou a denominar o fenômeno da “hemólise condicionada”, descrita por MUNIZ.

THOMAS & MENNIE (dezembro, 1950) constataram idêntico fato em relação à *Salmonella typhi*, no *Proteus*, na *Neisseria gonorrhoeae* e o denominaram de “Polysaccharide lysis test”.

Uma série de trabalhos saíram posteriormente, mostrando que o fenômeno da “hemólise condicionada” é um fenômeno de caráter geral.

ALMEIDA & AZEVEDO (1952) estudando comparativamente a “hemólise condicionada” e a “hemólise específica” demonstram a sua semelhança, em vista de seguirem as mesmas leis e apresentarem idênticas relações entre os elementos da reação.

Em 1950, MUNIZ demonstrou a possibilidade do seu emprêgo no diagnóstico da doença de Chagas.

Como havia sido demonstrado, pela própria reação da “hemólise condicionada”, que a fração poliósida do *S. cruzi* reagia com antígenos heterófilos do tipo F, e da mononucleose, tornou-se necessária a absorção prévia com rim de cobaio, glóbulos de carneiro de boi, dos sôros a serem investigados, com o fim de retirar os anticorpos não específicos.

Embora a técnica da “hemólise condicionada” seja extremamente simples, pois pode-se nela utilizar as hemátias do próprio doente ou do tipo O, assim como, hemátias de carneiro ou de cobaio, as operações de absorção tornam muitas vezes o sôro altamente impediante, interferindo dessa maneira nos resultados.

O isolamento e o emprêgo de uma fração não reagindo com anticorpos heterófilos poderá transformar a “hemólise condicionada”, num valioso reativo na pesquisa dos portadores da infecção chagásica.

* * *

Conforme foi assinalado anteriormente, as primeiras referências à presença de componentes heterogênicos na estrutura antigênica do *S. cruzi*, são devidas a MUNIZ & FREITAS (1944) e GRAÑA (1944).

HENDERSON-BEGG (1946) demonstra a existência de aglutininas do tipo heterófilo em títulos bastante elevados na *Trypanosomíasis africana* (doença do sono) e verifica que elas são absorvidas parcialmente por glóbulos de boi e com polpa de rim de cobaio, concluindo serem diferentes das observadas na doença do sono e na mononucleose.

GOES (1947) e GOES & BRUNO LOBO (1950-1951), praticando o teste de Paul-Bunnell-Davidsohn em sôro de 5 pacientes com doença de Chagas, encontraram títulos aglutinantes variáveis de 1/112 a 1/224 e concluem serem aglutininas do tipo Forssmann, por serem absorvidas em percentagens de 86% a 100% pela suspensão de rim de cobaio.

MUNIZ & SANTOS (1950) investigam, sob diversos aspectos, a questão da presença de hemolisinas e aglutininas para glóbulos de carneiro em

sôros de indivíduos portadores da *Trypanosomíasis americana* — tanto na fase aguda da doença (15 casos), quer na fase crônica (50 casos), encontrando os seguintes títulos:

		AGLUTININAS PARA HEMÁTIAS DE CARNEIRO						
CASOS AGUDOS.....	N.º de casos...	5		6		4		
	Títulos.....	1/640		1/1280		1/2560		
			HEMOLISINAS PARA HEMÁTIAS DE CARNEIRO					
	N.º de casos...	1	4	6	4			
Títulos.....	1/640	1/1280	1/2560	1/5120				
		AGLUTININAS PARA HEMÁTIAS DE CARNEIRO						
CASOS CRÔNICOS.....	N.º de casos...	2	2	6	18	17	5	
	Títulos.....	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	
			HEMOLISINAS PARA HEMÁTIAS DE CARNEIRO					
	N.º de casos...	1	2	2	4	14	21	6
Títulos.....	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	

Baseado nos resultados obtidos em uma série de ensaios, êsses autores concluem:

a) Que aglutininas e hemolisinas de tipo heterófilo ocorrem no sôro de indivíduos portadores da *Trypanosomíasis americana*.

b) Que o título hemolítico encontrado se mostrou muitas vezes superior ao título aglutinante.

c) Que na fase aguda da doença os títulos encontrados, quer de hemolisinas como de aglutininas heterófilas, são mais elevados que na fase crônica.

d) Que existe uma relação mais estreita entre aglutinação específica e poder hemolítico do que entre a aglutinação específica e a aglutinação de tipo heterófilo.

e) Que a queda do poder aglutinante específico é seguida de uma baixa nos títulos dos anticorpos heterófilos.

f) Que as hemolisinas e aglutininas heterófilas, presentes no sôro dos indivíduos portadores da *Trypanosomíasis americana*, são absorvidas intensamente com polpa de rim de cobaio e com menor intensidade com glóbulos de boi (50 a 80%).

g) Que êste comportamento difere daquele apresentado pelas aglutininas heterófilas encontradas nos portadores da “doença do sono”.

h) A absorção com o antígeno específico (formas de cultivo do *S. cruzi*), embora retire as aglutininas específicas para o parasita, causa

sòmente uma pequena diminuição no teor de anticorpos de tipo heterófilo (aglutininas e hemolisinas) e que a absorção com polpa de rim de cobaio, embora elimine os anticorpos de tipo heterófilo, determina sòmente uma pequena variação no título aglutinante específico (formas de cultura).

j) A inoculação de antígeno do *S. cruzi* (formas de cultura mortas pelo formol e formas vivas) na veia de coelhos, determina um aumento do poder hemolítico do sôro dêsses animais para hematias de carneiro. Fato semelhante é obtido inoculando formas de cultivo aquecidas pelo espaço de 1 hora à 100C (teor hemolítico observado inicialmente, 1/10 — 1/20; após imunização, 1/320 e 1/640).

k) Aglutininas heterófilas não ocorrem no sôro de coelhos imunizados com *S. cruzi*.

l) Que presença de hemolisinas naturais, embora em títulos baixos (1/10 e 1/20) no sôro de coelhos antes de serem submetidos à imunização com formas de cultura do *S. cruzi*, não permite que se conclua que o aumento de teor verificado corra por conta de imunolisinas recém-formadas ou apenas por aumento das lisinas naturais, provocado pelo processo de imunização.

m) Os imune-sôros *anticruzi* preparados em coelho, ao lado de um poder aglutinante específico (formas de cultivo), apresentam uma atividade hemolítica acentuada para hematias de carneiro, como demonstram os seguintes ensaios:

Imune-sôro I	—	Título aglutinante para o <i>S. cruzi</i>	1/240
		Hemolisinas anticarneiro	1/640
Imune-sôro II	—	Aglutininas para o <i>S. cruzi</i>	1/1 200
		Hemolisinas anticarneiro	1/320
Imune-sôro III	—	Aglutininas para o <i>S. cruzi</i>	1/1 200
		Hemolisinas anticarneiro	1/320

n) Hemolisinas heterófilas presentes nos imune-sôros *anticruzi* são absorvidas totalmente pela polpa de rim de cobaio, mas não pelas hematias de boi.

o) Nenhuma relação existe entre uma maior ou menor concentração de anticorpos heterófilos e os vários tipos sangüíneos.

p) Que pela reação da “hemólise condicionada”, ficou demonstrado que anticorpos heterófilos do tipo F (100% absorvido com polpa de rim de cobaio) e do tipo da mononucleose (absorvido parcialmente com rim de cobaio e 100% com hematias de carneiro) existentes em sôros de indivíduos não portadores da *Trypanosomíasis americana*, eram capazes de reagir com a fração poliósida extraída das formas de cultivo do *S. cruzi*. Esse fato evidencia a existência na estrutura antigênica dêsse parasita, de componentes capazes de reagir com êsses tipos de anticorpos.

q) Que levando em consideração que os anticorpos de tipo heterófilo são capazes de reagir na reação de fixação do complemento com antígenos dêsse grupo, invalida o emprêgo nesse tipo de reação de anti-

genos preparados com órgãos de animais pertencentes ao *grupo cobaio*, com finalidades de diagnóstico, em doenças parasitárias nas quais ocorrem muitas vezes anticorpos heterófilos em elevada concentração.

* * *

Como evolue a imunidade humoral nos portadores da *Trypanosomíasis americana*?

Confrontando os dados obtidos com as diversas reações sorológicas (aglutinação, precipitação e fixação do complemento) nas três fases da infecção com a evolução da parasitemia nesses períodos, constata-se que a ascensão do teor em anticorpos no sangue, corresponde justamente a passagem crescente de unidades parasitárias para a corrente circulatória, oriundos não só do foco inicial de infecção, como de novos focos formados pela disseminação do parasita no organismo à custa das vias linfáticas e sangüíneas, fato que caracteriza o início do período patente.

Essa elevação, que se processa rapidamente e que resulta de um maior estímulo exercido pelos parasitas sobre os elementos, que distribuídos pelo organismo atuam na gênese dos anticorpos, vem se estabilizar, após alguns dias, permanecendo então em níveis bem altos (títulos aglutinantes variando de 1/800 até 1/20 000) por um período que pode oscilar entre 15 a 60 dias aproximadamente, e na dependência de uma maior ou menor concentração de parasitas no sangue.

Com a diminuição crescente do número de parasitas na corrente circulatória, fase que se inicia geralmente 30 a 40 dias após o início da infecção e que corresponde ao fim do período patente, ocorre uma queda do teor de anticorpos no sangue. Essa queda, que se processa na maioria dos casos gradativamente e mais raramente de maneira abrupta, traz em consequência um abaixamento sensível da primitiva concentração, vindo êle a se fixar posteriormente e após um período muito variável em níveis bem inferiores (títulos aglutinantes 1/640 e 1/40), caracterizando tal quadro imunológico a fase crônica da doença.

* * *

Em relação ao papel desempenhado pelos fagócitos no decorrer das infecções pelo *S. cruzi*, temos o trabalho de Pizzi (1957) visando esclarecer o mecanismo defensivo que ocorre nas fases iniciais da infecção.

Nesse trabalho, Pizzi utiliza uma amostra de *S. cruzi* com virulência estável, matando camundongo (*Mus musculus*) da raça C3H regularmente em 12 dias. Além desse animal êle serve-se de ratos (*Rattus norvegicus*) por apresentarem uma certa resistência às infecções pelo *S. cruzi*. Por meios diversos, como sejam o emprêgo da "Primaquina", de formas de cultivo do parasita com virulência atenuada e da Cortisona, consegue conforme a finalidade desejada, não só o contrôle da infecção, como o aumento da resistência do animal e inibição dos elementos de defesa.

Jogando com êsses diferentes componentes e com aquêles animais, êle procura demonstrar que o mecanismo imunológico que atua nas infecções do *S. cruzi* apresenta caracteres que o diferenciam dos observados em outras tripanosomoses, não só pela ausência de lisina típica, como por sofrerem os parasitas destruição em sua fase de vida no tecido e constituir, a fagocitose, um importante papel na defesa do organismo.

No decorrer dêsse trabalho, êle pôde constatar que as células macrofágicas apresentam um comportamento diferente em relação ao parasita, pois, enquanto num animal não imune, elas servem de sede predileta para multiplicação dos tripanosomas, estas mesmas células são capazes de destruí-los quando o animal adquire imunidade; e que os tecidos derivados do mesênquima são capazes de reagir determinando essa transformação funcional nas células macrofágicas.

Tais fatos levam-no a admitir “que o mecanismo defensivo é essencialmente celular, sem que isso signifique negar a intervenção dos anticorpos, pois é provável que os macrófagos adquiram esta capacidade de fagocitar ao parasita, em virtude da ação fundamental ou coadjuvante dos anticorpos. O que parece indubitável é que os anticorpos não intervenham diretamente na destruição dos parasitas. Convêm frisar que não se pode encontrar lisinas contra o *Trypanosoma cruzi* apesar dos anticorpos dessa classe constituir um mecanismo defensivo básico nas infecções produzidas por outros tripanosomas.

“A defesa permanece assim limitada à atividade direta de algumas células do tecido conjuntivo, a qual se adapta à infecção sofrendo importantes modificações”.

Recentemente, MORAIS REGO (1959), numa das conclusões apresentadas, diz o seguinte:

“8 —Aspecto histológico compatível com formação de anticorpos, observado no baço e no fígado de camundongos naturalmente resistentes, e associação, a êsse aspecto histológico, de teor elevado de gama globulinas, no sôro de camundongos com resistência induzida experimentalmente, sugerem que, na defesa do organismo à infecção experimental pelo *T. cruzi*, entra em jôgo também, mecanismo de natureza humoral.

As experiências de PIZZI não permitem, entretanto, que se conclua de um modo geral, que na defesa oposta pelo organismo nas infecções pelo *S. cruzi* não possam intervir anticorpos líticos, embora se tenha de reconhecer que o seu papel não seja preponderante como ocorre em infecções provocadas por certos tripanosomas sangüícolas.

Em experiências “in vitro” MUNIZ & BORRIELLO (1945), trabalhando com formas metabólicas do *S. cruzi*, imune-sôros anti-*cruzi* e sôros de indivíduos portadores da *Trypanosomíasis americana*, puderam constatar o fenômeno de lise com intensidade variável.

É verdade que PIZZI, nesse mesmo trabalho, diz textualmente: — “Sin embargo, las consideraciones anteriores no permiten desconocer la posibilidad de que en la destrucción de los *T. cruzi* intervengan también anticuerpos. Como han pensado Cannon Y Pacheco (1930 y Taliaferro

(1940), cuando se sostiene que en los mecanismos de inmunidad no intervienen anticuerpos, se entiende que se trata de anticuerpos del suero y no de opsoninas o de lisinas que siendo producidas localmente ejercen su acción en los tejidos, pero su presencia en el suero no logra ser demostrada debido a que al diluirse en el plasma circulante no alcanzan una concentración suficiente (Gay, 1935 y Taliaferro, 1934 y 1940)".

No estado atual dos nossos conhecimentos em relação à fagocitose, não é possível relegar para um segundo plano a importância que exercem os anticorpos no desenrolar do fenômeno, pois ela é fundamental. O exemplo disso encontramos nas observações de Pizzi quanto ao comportamento dos macrófagos em animais não imunes desprovidos de anticorpos no sangue, e naqueles dotados de certo grau de imunidade, nos quais a presença de anticorpos contra o parasita pôde ser evidenciada.

Dentro do conceito unitário geralmente admitido para os anticorpos, acredita-se hoje que as *tropinas*, anticorpos incrementadores da fagocitose, sejam idênticas às aglutininas. Que as alterações da superfície do agente infeccioso, provocada pelo anticorpo, favoreçam tanto a aglutinação como a fagocitose.

As modificações por que passa a parasitemia no decorrer dos períodos agudos, subagudos e crônicos da *Trypanosomíasis americana* e o quadro imunológico observado nesses mesmos períodos, refletem bem a importância desempenhada pelos anticorpos no processo de defesa do organismo.

O mecanismo de defesa devido a estreita interdependência que existe entre os elementos que nêle atuam, não pode ser mais atribuído com exclusividade a êste ou aquêle fator como pretendiam de início os defensores das teorias celular e humoral.

É preciso notar que as observações de Pizzi se baseiam em infecções, cuja evolução se afasta por completo do quadro observado, quer no homem, quer na maioria dos animais, quando infectados em condições naturais ou mesmo experimentalmente.

O quadro infeccioso por êle obtido, empregando uma raça de camundongo altamente sensível para uma determinada amostra do *S. cruzi*, como demonstra a morte do animal ocorrendo com regularidade no fim do 12.º dia, não pode constituir fundamento para conclusão de caráter geral.

Diz Pizzi em seu trabalho "del conjunto de nuestras observaciones se deduce que la destrucción del *T. cruzi* se realiza mediante la fase de multiplicación del parasito en los tejidos".

MUNIZ & FREITAS (1946) assinalam, entretanto, que a fagocitose do parasita ocorre principalmente durante a fase de sua transformação para o elemento leishmanióide, na qual êle perde grande parte de sua mobilidade e apresenta uma grande tendência à adesão. Nesta fase êle torna-se mais vulnerável aos meios de destruição opostos pelo orga-

nismo, conforme puderam observar "in vitro". Esse período representa, segundo eles, a fase crítica do parasita no organismo.

Se êle consegue completar a transformação para o elemento leishmanióide antes de sofrer a ação lítica dos anticorpos ou ser englobado por elementos fagocitários e destruídos, a resistência, que êle (elemento leishmanióide) passa a opor aos fatores destrutivos de que lança mão o organismo, é muito maior. Este fato é evidenciado pela capacidade que possuem os elementos leishmanióides de multiplicarem-se no interior de células fagocitárias.

A transformação em elemento leishmanióide não traduz somente uma necessidade biológica com finalidade de multiplicação, mas representa também uma forma de defesa do parasita (MUNIZ & FREITAS, 1946).

Êsses autores acham que o estado de imunidade que se estabelece no organismo age, não só de forma destrutiva, mas que pode também interferir, direta ou indiretamente, na transformação do elemento leishmanióide em tripanosoma por meio de uma ação inibitiva.

Tal ponto de vista encontra apóio na dificuldade de serem encontrados quistos em evolução para tripanosomas em portadores de infecção crônica e na observação de MUNIZ & FREITAS (1946) de que, a simples adição de sôros, oriundos de casos agudos e dotados de poder aglutinante à água de condensação dos tubos de cultivos, exerce uma ação inibidora sobre a evolução dos elementos leishmanióides oriundos da transformação dos tripanosomas metabólicos neles semeados.

Essas formas continuam a se multiplicar, formando grandes massas aglutinadas, sem entretanto prosseguirem na evolução.

Tal fato pode ser interpretado, segundo êsses autores, como um simples processo de defesa do próprio parasita ou devido a ação de fatores presentes no sôro que inibam essa transformação.

* * *

O estado de imunidade que se estabelece no organismo, decorrente da infecção pelo *S. cruzi*, é devido não só à ação dos anticorpos, como, de elementos que intervêm na fagocitose.

Êsses fatores embora ocasionem uma acentuada diminuição da atividade parasitária, que pode chegar a um verdadeiro estado de latência, mostram-se, entretanto, incapazes de exterminar de vez, do organismo, o agente infeccioso (tipo premunição).

É o que demonstram observações seguras de indivíduos, comprovadamente infectados pela verificação do parasita no sangue, virem a morrer 10-20 anos depois, ainda portadores da infecção, evidenciada pelo encontro do parasita nos órgãos, após necrópsia.

Tal fato parece encontrar explicação, não só na tendência que tem o parasita de localizar-se em pontos onde mais dificilmente os meios de defesa do organismo possam atuar, como, também, na sua capacidade de resistir, seja através de um processo seletivo do qual surjam

elementos menos vulneráveis (o que resta provar), como também por representarem os elementos leishmanióides, por sua estrutura, uma forma mais resistente, não só à ação de anticorpos líticos como a ação destruidora dos fagócitos (MUNIZ & BORRIELLO, 1946).

Esse estado de imunidade é o responsável pelo "modus vivendi" que passa a vigorar entre o organismo e o agente infeccioso, dando a falsa impressão de ser êle mais um comensal do que pròpriamente um parasita.

Tal situação é que proporciona mais tarde o desencadeamento de reações de tipo alérgico, nos pontos em que o parasita vem a se implantar, constituindo, uma das manifestações mais importantes na patogenia dessa parasitose.

Sabemos hoje que as diferenças entre o estado de hipersensibilidade e de imunidade são mais quantitativas do que qualitativas e decorrem do desequilíbrio entre a quantidade de anticorpos livres em circulação e aquêles fixos à célula.

O desencadeamento dessas reações, no caso da "Doença de Chagas" é facilitado pelo íntimo contacto do parasita com a célula ou tecido, estando também, na dependência do fator individual.

Tomando em consideração os períodos evolutivos da infecção, como a parasitemia, o comportamento humoral e os tipos de reações inflamatórias que nesses períodos ocorrem, segundo MAZZA & JÖRG, pode-se esquematizar o mecanismo patogênico que ocorre na *Trypanosomíasis americana*, como segue:

FASE AGUDA — PERÍODO PRIMÁRIO DE MAZZA E JÖRG — Disseminação parasitária pelas vias sangüíneas e linfáticas — Parasitemia presente e constante — Concentração elevada de anticorpos circulantes — Reação antígeno-anticorpo processando-se fora da célula, à custa dos anticorpos em circulação — *Predominância de reações de tipo normérgico*.

FASE CRÔNICA — PERÍODO SECUNDÁRIO DE MAZZA E JÖRG — Ocorrência de reinfeções endógenas — Parasitemia excessivamente baixa e irregular — Baixa concentração de anticorpos no sangue circulante — Reação antígeno-anticorpo, processando-se grande parte à custa de anticorpos prêsos às células — *Reações em grande parte alérgicas*.

PERÍODO TERCIÁRIO DE MAZZA E JÖRG — Fase de reparação — Predominância dos fenômenos de fibrose.

A resistência oposta pelo organismo à superinfecção, é devido ao estado de *premunição* (SERGENT, PARROT, DONATIEN), que nêle se estabelece à custa da permanência controlada do parasita.

O próprio ciclo que êle desenvolve no organismo, como seja, a transformação do elemento leishmanióide em tripanosoma; a passagem dessas formas para a circulação e a localização delas em outros pontos quando não destruídas, constitui um constante estímulo às forças defensivas que lhe são opostas, mesmo quando essa evolução se faz com menor intensidade, como acontece na fase crônica da *Trypanosomíasis americana*.

CARLOS CHAGAS, ao analisar o ponto de vista daqueles que defendem a idéia de que a patogenia do *S. cruzi* estava na dependência de sucessivas reinfecções, mostrou que os próprios tripanosomas transportados de um a outro território orgânico, realizavam tal desiderato.

De um modo geral, novas inoculações em animais já infectados, pouca ação exerce sobre a parasitemia. Modificações nesse comportamento ocorrendo por conta de diferenças raciais ainda não foram seguramente evidenciadas.

BRUMPT (1913) foi um dos primeiros a assinalar que camundongos, que sobrevivem à infecção, resistem a inoculação de uma amostra virulenta e mortal para camundongos normais.

O mesmo fato pôde ser observado por COLLIER (1931) infectando inicialmente êsses animais com uma amostra de *S. cruzi* de baixa virulência, obtida pela ação da tripanflavina.

Outros autores têm assinalado igual comportamento, como PIZZI & KNIERIM (1955) em camundongos infectados com formas de cultivo de virulência atenuada, e PIZZI *et al.* (1954) em camundongos infectados com formas sangüícolas virulentas, controladas pela "Primaquina".

A esplenectomia pouca influência exerce sobre a evolução das infecções do *S. cruzi*. Ao contrário disso, a cortisona por uma ação inibidora pôde intervir no mecanismo de defesa.

A ação desse hormônio sobre as infecções experimentais do *S. cruzi* tem sido estudada por diferentes autores, entre êles WOLF *et al.* (1951-1953), JARPA *et al.* (1951), NEGhme *et al.* (1951), AGOSIN *et al.* (1951-1952).

PIZZI (1952) pôde constatar, em animais infectados com o *S. cruzi* e tratados pela cortisona, uma maior rapidez no ciclo de multiplicação do parasita. A hipótese aventada por êle, para explicação desse fenômeno, seria a existência de uma substância que atuando, venha a impedir a ação ou a formação de algum fator que normalmente retarda a reprodução do parasita.

Sabe-se que a cortisona administrada em doses elevadas inibe as reações inflamatórias e produz uma diminuição dos anticorpos, fato já evidenciado por diferentes autores em numerosas infecções.

No caso das infecções pelo *S. cruzi* acha PIZZI que "La menor actividad fagocitária que se observa en los animales tratados podria explicarse por la menor producción local de opsoninas o de lisinas".

* * *

Em relação à ação profilática e protetora de imune-sôros, temos os trabalhos de CULBERTSON & KOLODNY (1928) em que estudam a imunidade adquirida apresentada pelos ratos quando infectados pelo *S. cruzi*, verificando que êsses animais, quando restabelecidos de uma infecção, são resistentes a reinfecções e que os seus sôros possuem poder protetor.

MAYER & ROCHA LIMA (1914) assinalam que o sôro de animais (ratos, cobaios e coelhos), ativamente imunizados pelas repetidas ino-

culações do *S. cruzi*, não protege camundongos normais quando inoculados separadamente ou em mistura com formas sangüícolas do *S. cruzi*.

DIAS (1933) em experiências com idênticas finalidades chega às seguintes conclusões:

“O sôro de animais imunes não tem poder protetor, embora seja possível que determine uma atenuação da infecção quando injetado depois de ter estado em contato com os tripanosomas”.

MUNIZ empregando sôros de cavalos hiperimunizados com formas de cultivo do *S. cruzi*, cujo título se mostrou igual de 1/120 000, não conseguiu proteger nem modificar a evolução das infecções em camundongos brancos, embora empregando doses elevadas desse sôro dadas em dias alternados.

Com o fim de verificar se inoculações de formas mortas do cultivo do *S. cruzi* seriam capazes de, estimulando as defesas, trazer modificações na evolução da infecção, ou mesmo, proporcionar ao organismo um grau de imunidade capaz de protegê-lo contra uma infecção, MUNIZ *et al.* (1946), vacinaram *rhesus* com formas de cultivo do *S. cruzi*, suspensas em soluto fisiológico com mertiolato 1/10 000.

Os resultados dessas experiências levaram os autores às seguintes conclusões:

a) Que inoculações prévias dessa suspensão, em doses equivalentes a 24 e 48 miligramas de massa úmida de parasita por animal, não foram suficientes para proteger *rhesus* contra a infecção pelo *S. cruzi*, provocada por deposição na conjuntiva de fezes de *Triatoma* ricas em metacíclicos; operação essa realizada 12 dias depois dos animais terem recebido a última dose vacinante.

b) Que o estado de imunidade, conferido pela vacinação a êsses animais, evidenciado pelo teor de aglutininas no sôro, não modificou o período pré-patente, levando em conta aquêle que foi observado no animal testemunha.

c) Que o tratamento pela vacina realizado em 5 *rhesus*, previamente infectados pela conjuntiva, não impediu que 4 deles viessem a morrer como os outros animais testemunhas, dentro de períodos que variavam entre 29 e 80 dias, com o exame histopatológico positivo para o parasita.

E que o único animal tratado pela vacina que permaneceu vivo, continuou infectado (reações de imunidade e xeno), decorridos 1 ano e 8 meses do início da experiência.

d) Que a inoculação da vacina, no período pré-patente ou logo no início do período “patente”, não teve influência sobre a duração deste último, comparado com aquêle observado na testemunha.

e) Que o emprêgo da vacina no período “subpatente” não demonstrou maiores vantagens.

f) Que as diferentes vias utilizadas para inoculação (intradérmica, subcutânea, muscular e venosa) não interferiram sobre os resultados.

g) Que a inoculação da vacina pode determinar uma fase negativa, revelada por uma mais baixa concentração em aglutinina no sôro de animais em tratamento, que a observada nas testemunhas. Com a suspensão do tratamento o teor de aglutinina tende a subir.

h) Que a inoculação da suspensão, em indivíduos isentos da infecção pelo *S. cruzi*, determina a formação de aglutininas em títulos variáveis na dependência da via de inoculação.

i) Que a vacinoterapia empregada em 2 casos de "Moléstia de Chagas" (casos agudos passando para o estado crônico) não ocasionou a cura, pois um dos doentes (J.P.A.), cêrca de um ano depois do tratamento, apresentava não só o xeno, como as reações de imunidade (fixação e aglutinação) ainda positivos, e o outro (N.L.), observado 3 meses depois do tratamento, continuava infectado.

Pizzi (1957) trabalhando com camundongos C3H assinala que a inoculação de doses, embora altas de cultivos mortos, não consegue produzir imunidade decorrendo as infecções como nos animais testemunhas.

* * *

Em relação a pesquisa de "reaginas" capazes de se fixarem à pele, nos casos de *Trypanosomíasis americana*, todos os testes dão resultados negativos, como assinalaram, inicialmente, MUNIZ e MARQUES DA CUNHA (in MUNIZ & AZEVEDO, 1947).

Entretanto MAYER & PIFANO (1941), dizem ter obtidos ótimos resultados com esta prova, utilizando como alérgeno, suspensões em solução fisiológica fenicada a 0,5% das formas de cultura do *S. cruzi* desenvolvidos em meio de N.N.N.

MAZZA *et al.* (1943), empregando autolisados preparados de acôrdo com técnica especial, obtiveram reações alérgicas cutâneas em doentes da *Trypanosomíasis*.

PESSOA & CARDOSO (1942), assinalam não terem conseguido resultados positivos em dois casos nos quais praticaram o teste.

SENEKJIE (1941), trabalhando com coelhos imunizados contra o *S. cruzi*, obteve reações positivas, após inoculação por via intradérmica de suspensões de culturas dêsse parasita.

MUNIZ & FREITAS (1944), retomando êsses estudos e empregando vários tipos de alérgenos preparados com formas de cultura, tais como: autolisado; suspensão formolada a 0,2%; suspensão fenicada a 0,5%, suspensão em mertiolato a 1/10 000; e a fração polioside, não conseguem obter reações positivas, em 6 casos de forma aguda da *Trypanosomíasis*, nos quais ensaiaram êsses diferentes alérgenos.

Comparando êsses resultados com os obtidos posteriormente por MUNIZ & AZEVEDO (1949), ao conseguirem transmitir passivamente o estado alérgico, injetando por via pleural em *rhesus* normais, sôros de animais da mesma espécie, prèviamente sensibilizados para proteínas do *S. cruzi* e reagindo à prova de precipitação, chega-se a conclusão que

o anticorpo sensibilizante no caso dessas experiências deva ser uma precipitina, isto é, um anticorpo, ordinário, polivalente, e não do tipo "reagina".

À igual conclusão tem-se de chegar, quanto ao principal fator responsável pela ocorrência de lesões de tipo alérgico, observadas nos portadores da *Trypanosomíasis americana*.

CONCLUSÃO FINAL

Diante dos fatos expostos neste trabalho, verifica-se que o *S. cruzi*, devido ao elevado poder antigênico de que é dotado, condiciona no organismo humano um quadro imunológico que é o responsável pela resistência que êle passa a opor ao agente infeccioso (premunição).

Êsse estado de resistência faz com que o parasita permaneça no organismo, na maioria das vezes em um estado quase de latência, após o período de invasão, dando a impressão, embora aparente, de ser êle um simples comensal e não um parasita.

Entretanto, essa resistência, embora valiosa, se mostra incapaz de suplantar todos os meios, de que lança mão o parasita em defesa de sua sobrevivência para com isso proporcionar ao organismo a cura parasitológica.

Diante dêsse fato e pelas próprias condições de seu parasitismo, de viver na intimidade dos tecidos, o parasita proporciona ao organismo, embora na dependência de um fator individual, condições, para desencadeamento de reações anômalas, do tipo de hipersensibilidade, cujo papel na patogenia da "Doença de Chagas" é da mais alta importância.

CONCLUSIONS

In view of the facts related in this report, we verify that *S. cruzi* because of its high antigenic power, rules in the human organism an immunological clinical picture which is responsible for its future resistance against the infectious agent.

This resistance state promotes the parasite's permanency in the human organism after the invasion period, very often in a semilateny, seeming to be at the first sight rather a commensal than a parasite.

But such a resistance, although very valuable, seems to be unable: a) to supplant all the means used by the parasite in protecting its outliving; b) to offer the organism the parasitical cure.

In presence of such a fact and on account of the peculiar condition of its parasitism that makes it living in the intimacy of the tissues, the parasite, depending, however, of an individual factor, offers to the organism the suitable conditions for the sudden appearance of anomalous typical hypersensitive reactions, whose role in the pathogeny of Chagas' disease is of a very considerable importance.

A D E N D O

TÉCNICAS USADAS

Cultivo em massa do S. CRUZI — A técnica a ser empregada é a mesma descrita por MUNIZ & FREITAS (1944). Os cultivos a serem utilizados nas pesquisas imunológicas devem ser obtidos em condições de ótimo desenvolvimento e não devem conter formas mortas nem autolizadas.

Reação de aglutinação — Culturas com 6 a 8 dias de desenvolvimento são lavadas 4 vezes e depois suspensas em solução salina isotônica, de maneira a se conseguir uma turvação equivalente àquela que se obtém adicionando 0,5 de uma solução BaCl₂ a 1% à q.s. de um soluto de H₂SO₄ a 1%. Em tubos de aglutinação contendo 0,5 ml de diluições crescentes do sôro a examinar previamente inativado, junta-se 0,5 ml da suspensão viva do cultivo, tendo-se o cuidado de fazer um tubo testemunho, contendo somente suspensão de cultivo e solução salina em vez da diluição do sôro. A mistura é agitada e, em seguida, levada ao banho-maria a 37°, onde deve permanecer pelo espaço de 24 horas. Proceder à leitura no fim de 2 horas e no final da prova. Os resultados são expressos da seguinte maneira: **** aglutinação total com formação de grandes flocos (tipo flagelar); *** aglutinação total com formação de flocos finos (tipo somático); ** aglutinação parcial; O ausência de aglutinação.

Suspensões mais concentradas do que a indicada não devem ser usadas porque podem mascarar o resultado da reação. É necessário observar após o preparo da suspensão, se ocorre uma aglutinação espontânea do parasita, fato êste que pode ser logo observado e que invalida o emprêgo da mesma na reação.

Suspensos mortos (ácido fênico, formol, mertiolato) tornam a prova menos sensível e os títulos obtidos são bem mais baixos que os observados com suspensões vivas. A chamada *técnica em lâmina*, com leitura após 5 minutos à temperatura ambiente, proposta por SENEKJIE (1943), é desprovida de qualquer valor, principalmente quando se trabalha com sôros de doentes ou de animais infectados.

Reação de fixação de complemento:

ANTÍGENO — formas de cultivo de *Schizotrypanum cruzi*, lavadas, liofilizadas e mantidas em ampôlas fechadas a — 30°C. No dia do emprêgo a massa sêca, após pesagem, é suspensa em solução tamponada de Veronal com Ca e Mg. O emprêgo do triturador de vidro facilita a obtenção de uma suspensão homogênea.

O poder fixador e o impediante do antígeno são determinados de uma só vez para cada lote. Por êsses testes ficam estabelecidas a concentração a ser usada e a quantidade a ser empregada na reação. Em regra, êsse tipo de antígeno na concentração de 0,001 de massa sêca para 1,5 ml da solução tamponada e na dose de 0,2 ml, apresenta um poder fixador alto e baixo poder impediante. A suspensão do antígeno deve ser preparada e utilizada no mesmo dia.

COMPLEMENTO — Mistura de sôro fresco de 3 cobaios diluído a 1:20 em solução tamponada e mantido em baixa temperatura (5°C) no decorrer da operação.

HEMATIAS — de carneiro lavadas e suspensas na solução tamponada, de maneira a ser obtida uma concentração de 100 000 000 de hemátias em cada 0,1 ml da suspensão. Essa standardização pode ser feita por contagem com o emprêgo do hematímetro ou pelo método colorimétrico.

HEMOLISINAS — anticarneiro — Cada 0,1 ml da diluição do sôro hemolítico em solução tamponada deve conter 4 unidades hemolíticas. Só devem ser empregado sôros com teor em hemolisinas de 1 500 unidades. Na diluição empregada os glóbulos não devem sofrer aglutinação.

SISTEMA HEMOLÍTICO — Resulta da mistura em partes iguais da suspensão de hemátias e hemolisinas anticarneiro nas concentrações acima indicadas. Feita a mistura ela deve ser levada ao banho-maria a 37° pelo espaço de 15

minutos a fim de apressar a sensibilização das hemátias. Decorrido êsse tempo, as hemátias não devem apresentar-se aglutinadas devendo a mistura ser mandada hemátias, estará pronto para ser usado na reação.

SÔRO DO PACIENTE — O sôro deve ser inativado a 56° durante 20 minutos. Após essa operação êle deve ser absorvido com hemátias de carneiro previamente lavadas, permanecendo a mistura 15 minutos a 37°. Essa operação deve ser repetida uma segunda vez, finda a qual o sôro, após centrifugação para libertá-lo das hemátias, estará pronto para ser usado na reação.

OPERAÇÃO INICIAL

Determinação da unidade 100% de C' em presença da suspensão de antígeno a ser utilizado na reação

Complemento de cobaio a 1/20.....	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50
Antígeno do <i>S. cruzi</i>	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Solução tamponada com Mg e Ca.....	0.5	0.45	0.4	0.35	0.3	0.25	0.2	0.15	0.10

40 minutos a 37°

Sistema hemolítico.....	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
-------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

30 minutos a 37° — Leitura

A unidade C' é representada pela menor dose da diluição do complemento capaz de determinar 100% de hemólise. Percentagem de lise acima de 90% de hemólise deve ser considerada como hemólise total.

O valor em unidades por ml de sôro é obtido, dividindo o fator diluição (20) pelo volume que produziu completa lise.

Se a unidade de complemento obtida foi 0,3, para se ter em cada 0,1 ml uma unidade, 3 ml de sôro puro de cobaio deverão ser diluídos em 17 ml da solução tampão.

A adição de substância como citrato com fim de facilitar a colheita do sangue de pequenos animais, como camundongos e ratos (PIZZI, 1957), deve ser evitada, porque torna o sôro anticomplementar devido fixar o Mg** que é essencial para a ação hemolítica do complemento (MAYER, M., 1946 e MAYER M. et al., 1946), a não ser que êsse efeito seja superado pela adição extra do Mg**.

REAÇÃO PRÒPRIAMENTE DITA

TÉCNICA QUALITATIVA

Sôro a examinar inativado e absorvido.....	0.2	0.1	0.05	—	—	0.2	—	—	—	—
Sôro positivo.....	—	—	—	0.2	—	—	0.2	—	—	—
Sôro negativo.....	—	—	—	—	0.2	—	—	0.2	—	—
Antígeno.....	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—	—	—	0.2	0.4

30 minutos à temperatura do laboratório

Complemento — 2 unidades.....	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Solução tamponada com barbiturato de Mg e Ca.....	0.2	0.3	0.35	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2

Técnica de liofilização

A massa humida de cultivo, após lavagem em soluto fisiológico (4 a 5 vezes) e mantida em tubo estéril com o algodão frouxo, é congelada por imersão em uma mistura de álcool e gelo sêco (-70°C).

Em seguida o tubo é colocado em dessecador Hempel previamente resfriado, contendo ácido sulfúrico concentrado no anel.

Proceder o vácuo com bomba "Megavac" por meia hora.

Desligada a bomba, o dessecador é colocado em geladeira a 5°C , onde permanece mais ou menos pelo espaço de 20 horas.

Desfazer o vácuo, fazendo passar ar filtrado, lentamente, através secante químico (Driorite). Aberto o dessecador, selar os tubos no maçarico. O material deve ser guardado no frigor até ser usado.

Reação de precipitação (Método de MUNIZ & FREITAS, 1944)

Preparo do precipitinogênio — Toma-se 0,5 ml de massa úmida constituída por formas de cultivo do *S. cruzi*, com 5 a 8 dias de desenvolvimento, previamente filtrada em algodão de vidro e submetidas a lavagens sucessivas em soluto fisiológico por meio de centrifugação. Adiciona-se 1 ml de formanida (Kalbaun ou Eastman Kodak Cop.). Após agitação e suspensão contida em tubo centrífugo é aquecida a 150° , em banho de glicerina, pelo espaço de 10 a 15 minutos.

A suspensão é resfriada e adicionada de 3 a 5 ml de álcool-clorídrico (95 partes de álcool absoluto e 5 partes de 2NHCl). Essa mistura, é agitada pelo espaço de 15 a 20 minutos várias vezes, e depois submetida a centrifugação com o fim de retirar a parte insolúvel. O líquido sobrenadante é passado para um novo tubo centrífugo e adicionado ao dôbro do volume de acetona pura (Merck).

Após rápida agitação, a mistura é deixada em repouso por 30 a 60 minutos, findos os quais, é submetida a nova centrifugação para separar o precipitado formado pela adição de acetona. Terminada esta operação a parte líquida é desprezada e substituída por nova porção de acetona para lavar o precipitado, que é seguida de nova centrifugação. Esta operação é repetida mais uma vez, sendo então, a porção líquida desprezada e o tubo contendo o precipitado, levado a um cristalizador ligado a uma bomba de vácuo, com o fim de apressar a evaporação completa da acetona.

Com o fim de extrair do precipitado a fração ativa constituída por poliósido, junta-se soluto fisiológico estéril ou uma solução salina tamponada de fosfato disódico pH 7 — esterilizada por passagem em vela, agita-se; deixa-se em contacto durante a noite na geladeira, de maneira que a fração ativa se difunda no meio líquido. No dia seguinte o tubo é centrifugado, e o sobrenadante, recolhido em outros tubos.

Tôdas essas operações deverão ser conduzidas com material esterilizado e técnica bacteriológica, com o fim de evitar contaminação. O pH, deverá ser verificado e mantido entre 7 ou 7,2 com uma solução fraca de carbonato de sódio, no caso da extração ter sido feita com soluto fisiológico. Antes de ser distribuído em ampôlas para ser guardado em baixa temperatura (5°C), o precipitinogênio, assim obtido, deverá ser testado, não só quanto a esterilidade, como em relação à atividade, por meio do sôro imune *anti-cruzi*, preparado em coelho ou cavalo.

Leitura: Os resultados são expressos da seguinte maneira:

- **** — Início da formação do anel nos primeiros 10 minutos
- *** — Início da formação do anel entre 10 a 20 minutos
- ** — Início da formação do anel após 30 minutos.

Técnica do anel — 0,1 ml do sôro a investigar, completamente límpido e não hemolisado, é colocado num pequeno tubo, medindo 3 mm de diâmetro, do tipo comumente usado nas reações de precipitação. Em seguida, quantidade igual do precipitinogênio é deixada escorrer lentamente pela parede do tubo, a fim de fornecer uma camada distinta, acima daquela constituída pelo sôro.

Para cada sôro a estudar é feito na mesma ocasião um tubo testemunha, no qual o precipitinogênio é substituído por simples soluto fisiológico.

O tubo testemunha tem por fim evitar falsos resultados, pois alguns sôros, principalmente aquêles com certo grau de hemólise ou rico em lipídios, são capazes de apresentar uma turvação, quando em contacto com simples soluto fisiológico, perturbando a reação.

Quando o sôro a investigar se apresenta turvo, mesmo após centrifugação demorada, devido a presença de lipídios, deve-se deixá-lo à temperatura de 5°C, durante tôda a noite, e depois submetê-lo enquanto resfriado a nova centrifugação, dessa maneira consegue-se separar grande parte dessa fração que se condensa na superfície, apresentando o resto do sôro já um aspecto límpido.

Os tubos da reação e testemunha são deixados à temperatura ambiente pelo espaço de 2 horas, quando se procede uma primeira leitura, para depois serem levados para geladeira a 5°C, onde permanecem até o dia seguinte, quando é feita a leitura final.

Nos sôros obtidos de alto poder precipitante, como é regra nos casos agudos, a reação se processa rapidamente, já no fim de 1 a 2 minutos com a formação de um anel de aspecto esbranquiçado e formado por um precipitado extremamente fino, na inter-zona. Esse anel com o decorrer do tempo, se acentua cada vez mais, transformando-se no fim de uma a duas horas em uma zona esbranquiçada menos delimitada, constituída por um precipitado com tendência a sedimentar.

Nos sôros de menor atividade, a reação se processa em 10 ou 20 minutos, ou mesmo, após um tempo mais longo, devendo por isso a leitura final ser procedida no fim de 24 horas.

Devido a êsses casos o material a ser empregado na reação deve ser todo esterilizado, e as operações conduzidas com técnica bacteriológica. Isso tem por fim evitar que o desenvolvimento de bactérias no meio venha falsificar os resultados.

BIBLIOGRAFIA

- AGOSIN, M., CHRISTEN, R., JARPA, A. & ATIAS, A. V., 1951, Cortisona y enfermedad de Chagas experimental. *Biologica*, (Chile), 14-15: 29.
- AGOSIN, M., CHRISTEN, R., JARPA, A., ATIAS, A. V. & NEGhme, A., 1952, Cortisona y Enfermedad de Chagas experimental. *Rev. Med. Chile*, 80: 34.
- ALMEIDA, J. O. & AZEVEDO, M. P., 1952, Estudos sôbre hemólise condicionada. I. Relações quantitativas entre os elementos da reação de hemólise condicionada no sistema tuberculose. *Rev. Brasil. Biol.*, 12(2): 129-150.
- BADINEZ, O. S., 1945, Contribución a la anatomia patológica de la enfermedad de Chagas experimental. *Biologica*, 3: 3-52.
- BIER, O., 1957, *Bacteriologia e Imunologia*, 8.^a ed., 914 pp., Edições Melhoramentos, São Paulo.
- BOYD, W. C., 1943, *Fundamentals of Immunology*, 446 pp., Interscience Publishers, Inc., New York.
- BOZICEVICH, J., HOYEM, H. M. & WALSTON, V. M., 1946, A method of conducting the 50 per cent hemolysis end point complement fixation test for parasitic diseases. *Public Health Rep.*, 61: 529-539.
- BRUMPT, E., 1913, 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. Exot.*, 6: 172-176.
- CANNON, P. R. & PACHECO, G. A., 1930, Studies in tissue — immunity. Cellular reactions of the skin of the guinea pig as influenced by local active immunization. *Amer. J. Pathol.*, 6: 749.
- CHAFFEE, E. F. *et alii*, 1956, Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection by complement fixation. *Amer. J. Med. Hyg.*, 5 (5): 763-771.

- CHAGAS, C., 1909, Neue Trypanosomen: *T. minasense* n. sp., *T. Cruzi* n. sp. Verläufige Mitteilung. *Arch. Schiffs. Tropenhyg.*, 13 (4): 120-122.
- CHAGAS, C., 1909, Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morphologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiologico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1 (2): 159-218.
- CHAGAS, C., 1911, Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiologicos e clinicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 3 (2): 219-275.
- CHAGAS, C., 1911, Le cycle de *Schizotrypanum cruzi* chez l'homme et les animaux de laboratoire. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 4 (7): 467-471.
- CHAGAS, E., 1935, Infection expérimentale de l'homme par le *Schizotrypanum cruzi*. *C. R. Soc. Biol.*, 118: 290-292.
- CHAGAS, E., 1935, Sumula dos conhecimentos actuaes sobre a Trypanosomiasis americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 30 (3): 387-416.
- CHANG, SHIH LU & NEGHERBON, W. O., 1947, Studies on haemoflagelates: III. The specificity of serological reactions of *Leishmania donovani*, *L. brasiliensis*, *L. tropica*, and *Trypanosoma cruzi*. *J. infect. Dis.*, 81 (3): 209-227.
- COLLIER, W. A., 1931, Über Immunität bei der Chagas Krankheit der Weissen Maus. *Z. Hyg. Infekt Krankh.*, 112 (1): 88-92.
- CULBERTSON, J. T. & KOLODNY, M. H., 1938, Acquired immunity in rats against *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.*, 24: 83-90.
- DAVIS, D. J., 1943, An improved antigen for complement fixation in American trypanosomiasis. *Publ. Health Rep.*, 58: 775-777.
- DAVIS, D. J. & SULLIVAN, T. S., 1946, Complement — fixation test for American trypanosomiasis in Texas. *Publ. Health Rep.*, 61 (29): 1083-1084.
- DENISSON, N., 1943, Experimental studies on *Trypanosoma cruzi* infection and reticulo-endothelial blockade in rats. *Amer. J. Hyg.*, 38 (2): 178-184.
- DIAS, E., 1933, Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. 115 pp. Tese de doutoramento Fac. Med., Univ. Rio de Janeiro.
- DIAS, E., 1955, Informações acerca de 300 casos de doença de Chagas com período inicial conhecido, fichados no Centro de Estudos de Bambuí. *Hospital*, 47 (6): 9-17.
- DOERR, R., 1953, *Las investigaciones sobre inmunidad*. Tomo 2.º — El complemento, 92 pp.; Tomo 3.º — Los antigenos, 404 pp.; Tomo 4.º — Los anticuerpos — 1.º fasc., 289pp.; 2.º fasc., 271 pp.; Revista de Occidente, Madrid. Traducion de la edicion aleman por F. Cordon.
- ESPAÑA, C. & HAMMON, W. McD., 1948, An improved benzene extracted complement fixing antigen applied to the diagnosis of the arthropod borne virus encephalitides. *J. Immunol.*, 59: 31-44.
- FISHER, S. & KEOGH, E. V., 1950, Lysis by complement of erythrocytes which have adsorved a bacterial component and its antibody. *Nature*, 165: 248.
- FREITAS, J. L. P., 1951, Reação de fixação do complemento para diagnóstico da moléstia de Chagas pela técnica quantitativa. *Arq. Hig. Saúde Publ.*, 16 (48): 55-94.
- FREITAS, J. L. P. & ALMEIDA, J. O., 1949, Nova técnica de fixação do complemento para moléstia de Chagas. Reação quantitativa com antígeno gelificado de culturas de *Trypanosoma cruzi*, *Hospital*, 35 (6): 787-800; *Rev. Paul. Med.*, 34 (6): 410-411.
- GAY, F. B., 1935, Agents of disease and host resistance, 1581 pp., Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- GOBLE, F. C., 1952, Observations on experimental Chagas'disease in dogs. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1 (2): 189-204.
- GÓES, P., 1947, *Estudos sobre a Imunidade cruzada*. 352 pp., Tese, Fac. Nac. Farm., Univ. Brasil.

- GÓES, P. & LOBO, M. B., 1950-1951, Sôbre o comportamento do anticorpo heterólogo ocorrente da doença de Chagas. *Arq. bras. Med.*, 40: 307-318; *An. Microbiol.*, 1: 69-77.
- GRAÑA, A., 1944, *Anticuerpos heterófilos. Clínica e Immunologia*. 126 pp., Buenos Aires, Espasa — Calpe Argentina S. A.
- GUERREIRO, C. & MACHADO, A., 1913, Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil. Med.*, 27 (23): 225-226.
- HAUSCHKA, T. S., 1947, Sex of host a factor in Chagas'disease. *J. Parasitol.*, 33 (5): 399-404.
- HAUSCHKA, T. S., 1949, Persistence on strainspecific behavior in two strains of *Trypanosoma cruzi* after prolonged transfer through inbred mice. *J. Parasitol.*, 35 (6): 593-599.
- HAUSCHKA, T. S. *et alii*, 1950, Immunological relationship between 7 strains of *Trypanosoma cruzi* and its application in diagnosis of Chagas'disease. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 30 (1): 1-16.
- HENDERSON-BEGG, A., 1946, Heterophile antibodies in Trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 40: 331-339.
- JARPA, A., AGOSIN, M., CHRISTEN, R. & ATIAS, A. V., 1951, Ensayos de quimioterapia de la Enfermedad de Chagas experimental. *Bol. Inf. Parasitol. Chil.*, 6: 25.
- KABAT, E. A. & MAYER, M. M., 1948, *Experimental Immunochemistry*, 567 pp., Thomas, Springfield, Illinois.
- KELSER, R. A., 1936, A complement fixation test for Chagas'disease employing an artificial culture antigen. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 16 (4): 405-416.
- KLYUEVA, N. G. & ROSKIN, G., 1946, Cancerolytic substance of *Schizotrypanum cruzi*. *Amer. Rev. Soviet. Med.*, 4: 127-129; *Vrach. Delo*, 26 (34): 105-106.
- KÖBERLE, F., 1958, Cardiopatia chagásica. *Hospital*, 53: 311-346.
- LAZLO, H. P., 1950, Recherches préliminaires sur la composition chimique de la fraction spécifique soluble obtenue par la méthode de Fuller de *Schizotrypanum cruzi*. *Hospital*, 38 (4): 191-194.
- LIEN, S. D. & VAN THIEL, P. H., 1940-41, The complement fixation test for Chagas'disease employing a dried culture antigen. *Acta Leiden.*, 15-16:259-274.
- MARQUES DA CUNHA, A. & MUNIZ, J., 1944, Pesquisas sôbre o Endotrypanum Schaudinni Mesnil et Brimont, 1908, parasita do *Choloepus didactyls* (L.). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 41 (1): 179-194.
- MAYER, M. & PIFANO, F., 1941, O diagnóstico da moléstia de Chagas por intradermoreação com cultivo de *Schizotrypanum cruzi*. *Brasil Med.*, 55 (18): 317-319.
- MAYER, M. & ROCHA LIMA, H., 1914, Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* im warm Blutern und Arthropoden. *Arch. Schiff. Tropenhyg.*, 18: 101-106.
- MAYER, M. M., 1946, The activating effect of magnesium and other cations on the hemolytic function of complement. *J. Exper. Med.*, 84 (6): 535.
- MAYER, M. M., OSLER, A. G., BIER, O. G. & HEIDELBERGER, M., 1946, *J. Exper. Med.*, 84: 535.
- MAZZA, S. & JÖRG, M. E., 1936, Consideraciones sobre la patogenia de la enfermedad de Chagas; los periodos anatomoclinicos de la Tripanosomiasis. *Soc. Argent. Patol. Reg.*, 9 Reun., 1: 221-231.
- MAZZA, S. & JÖRG, M. E., 1936, Infeccion natural mortal por *S. cruzi* en cachorro de perro "Pila" de Jujuy. *Soc. Argent. Patolog. Reg.*, 9. Reun., 1: 365-411.
- MAZZA, S. & MIYARA, S. 1941, Esquizotripanides (3.^a Nota), Esquizotripanides eritematosas polimorfos. *Mepra*, 53: 3-22.
- MAZZA, S. *et alii*, 1941, Esquizotripanides. Manifestaciones eruptivas agudas en la enfermedad de Chagas (exantemas o roseolos). *Mepra*, 51: 3-74.
- MAZZA, S. *et alii*, 1941, Esquizotripanides (2.^a Nota), Esquizotripanides urticariformes. *Mepra*, 52: 3-31.

- MAZZA, S. *et alii*, 1943, Naturaleza histopatologica de reacciones alérgicas cutáneas provocadas en chagásicos con lisados de cultivos de *S. cruzi*. *Mepra*, 64: 3-143.
- MIDDLEBROOK, G., 1950, A hemolytic modification of the remagglutination test for antibodies against tubercle bacillus antigens. *J. Clin. Invest.*, 29: 1480-1485.
- MORAIS REGO, S. F., 1959, Estudo das lesões provocadas pelo *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, no baço e no fígado do camundongo branco (*Mus musculus*) com diversos graus de resistência. *J. Brasil. Med.*, 1 (5):
- MUNIZ, J., 1930, Del uso del antígeno Watson (*Trypanosoma equiperdum*) en la reacción de desviación del complemento en la enfermedad de Chagas. *Soc. Argent. Patol. Reg. del Norte*, 5.^a Reun., 2: 897-901.
- MUNIZ, J., 1947, Do valor da reação de precipitina no diagnóstico das formas agudas e subagudas da doença de Chagas (*Trypanosomiasis americana*). *Brasil Med.*, 61 (29/30): 261-267.
- MUNIZ, J., 1947, Do valor da reação de precipitina no diagnóstico das formas agudas e subagudas da doença de Chagas (*Trypanosomiasis americana*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 45 (3): 537-549.
- MUNIZ, J., 1949, Conditioned hemolysis as a phenomenon of a more general character. Seção do Rio de Janeiro da "Society of American Bacteriologists, 29 de Novembro, em *News Letter*, 1 Jan.: 9.
- MUNIZ, J., 1950, Conditioned hemolysis as a phenomenon of a more general character, 5.^o Congresso Internacional de Microbiologia, Rio de Janeiro. Abstracts of Papers, (8) 144.
- MUNIZ, J., 1950, On the value of "Conditioned hemolysis" for the diagnosis of American trypanosomiasis. *Hospital*, 38 (5): 685-691.
- MUNIZ, J. & AZEVEDO, A. P., 1947, Novo conceito da patogenia da "Doença de Chagas", *Hospital*, 32 (2): 165-183.
- MUNIZ, J. & BORRIELLO, A., 1945, Estudo sobre a ação lítica de diferentes soros sobre as formas de cultura e sanguícolas do *Schizotrypanum cruzi*. *Rev. brasil. Biol.*, 5 (4): 563-576.
- MUNIZ, J. & FREITAS, G., 1944, Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. II, Isolamento de polisacarídeos de *Schizotrypanum cruzi* e de outros tripanosomídeos, seu comportamento nas reações de precipitação, de fixação de complemento e de hiper-sensibilidade. Os testes de floculação (sublimado e formol-gel). *Rev. brasil. Biol.*, 4 (4): 421-438.
- MUNIZ, J. & FREITAS, G., 1944, Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. I, Estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação do complemento. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 41 (2): 303-333.
- MUNIZ, J. & FREITAS, G., 1945, Estudo sobre o determinismo da transformação das formas sanguícolas do *Schizotrypanum cruzi* em critídias. I, Da existência de um fator responsável por essa metamorfose. *Rev. bras. Med.*, 2 (12): 995-998.
- MUNIZ, J. & FREITAS, G., 1946, Estudos sobre a imunidade humoral na doença de Chagas. *Brasil Med.*, 60 (42-43): 337-341.
- MUNIZ, J. & FREITAS, G., 1946, Realização "in vitro" do ciclo de *S. cruzi* no vertebrado, em meios de caldo — líquido peritonial. *Rev. Brasil. Biol.*, 6 (4): 467-484.
- MUNIZ, J. & GOMES, J. S., 1959, Da ação anticomplementar dos antígenos constituídos por formas de cultivo do *S. cruzi*. Congresso Internacional sobre doença de Chagas, Rio de Janeiro. Resumo dos trabalhos apresentados, pp. 61-63.
- MUNIZ, J. & SANTOS, M. C. F., 1950, Heterophile antibodies in American Trypanosomiasis. The presence of heterogenetic components in the antigenic structure of the *Schizotrypanum cruzi* shown by "conditioned hemolysis" reaction. *Hospital*, 38: 601-616.

- MUNIZ, J., SOARES, R. R. L., BATISTA, S. & QUIROGA, L., 1953, Evolução da imunidade humoral em cães infectados experimentalmente pelo *S. cruzi*. X Congresso Brasileiro de Hygiene. B. H., 1952, *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.*, 5 (2): 197-200.
- MUNIZ, J. *et alii*, 1946, Ensaio de vacinação preventiva e curativa nas infecções pelo *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 44 (3): 529-541.
- NEGHME, A. *et alii*, 1951, Ensayos de quimioterapia de la enfermedad de Chagas experimental. VIII — Accion de la cortisona sola y asociada al fosfato de petaquina o al compuesto de sulfato de quinina — fosfato de petaquina; estudio histopatologico. *Bol. Chil. Parasitol.*, 6 (3): 36.
- NUSSENZWEIG, V. & FARIA, R., 1955, Prova da antiglobulina no diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica. *Hospital*, 47 (6): 81-92.
- PACKCHANIAN, A., 1935, Agglutination and precipitation tests for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas'disease). *J. Immunol.*, 29 (1): 84-85.
- PACKCHANIAN, A., 1952, Purification of serologically active principles, particularly protein and polysaccharides, from *Trypanosoma cruzi*. *Federat. Proc.*, 11 (1): 477-478.
- PELLEGRINO, J. & BRENNER, Z., 1952, A reação de fixação do complemento na doença de Chagas. IV, Observações feitas em casos agudos de esquizotripanose. *Hospital*, 42 (5): 755-761.
- PELLEGRINO, J. & BRENNER, Z., 1953, A reação de precipitina com a fração polissacarídea isolada de formas de cultura do *Schizotrypanum cruzi* na infecção chagásica experimental no cão. *Hospital*, 43 (3): 113-117.
- PESSÔA, S. & CARDOSO, A. F., 1942, Nota sôbre a imunologia cruzada na leishmaniose tegumentar e na moléstia de Chagas. *Hospital*, 21 (2): 187-193.
- PILLEMER, L. *et alii*, 1954, in Bier, O., 1957, *Bacteriologia e Imunologia*, 8.^a ed., Edições Melhoramentos, São Paulo.
- PIZZI, T., 1957, *Imunologia de la enfermedad de Chagas*. Santiago. Universidad de Chile. (Colección de monografias biologicas de la Universidad de Chile), 7.
- PIZZI, T. & KNIERIM, F. M., 1955, Modificaciones del bazo en relación con la tasa de anticuerpos circulantes en ratones experimentalmente infectados com *Trypanosoma cruzi*. *Bol. Chil. Parasitol.*, 10 (3): 42-49.
- PIZZI, T. & PRAGER, R., 1952, Inmunidad a la sobreinfección inducida mediante cultivos de *Trypanosoma cruzi* de virulência atenuada (comunicación preliminar). *Bol. Chil. Parasitol.*, 7 (2): 20-21.
- PIZZI, T. *et alii*, 1949, Estudios sobre imunologia de las enfermedades parasitarias. I, Influencia de la constitucion genetica en la resistencia de las lauchas a la infeccion experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Mexicana Hist. Nat.*, 10: 113-119.
- PIZZI, T. *et alii*, 1954, *Imunologia de la enfermedad de Chagas*. *Bol. Chil. Parasitol.*, 9(2): 35-47.
- PIZZI, T. *et alii*, 1954, Immunology of Chagas'disease. *Riv. Parassitol.*, 15 (4): 577-592.
- ROMAÑA, C. & MAYER, H., 1942, Estudos do ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* em cultura de tecidos de embrião de galinha. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 37 (1): 19-27.
- SENEKJIE, H. A., 1941, On the polysacharide of *Leishmania tropica*. *Amer. J. Hyg.*, 34 (2): 63-66.
- SENEKJIE, H. A., 1943, Biochemical reactions. Cultural characteristics and growth requirements of *Trypanosoma Cruzi*. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 23 (5): 523-531.
- SENEKJIE, H. A., 1943, Immunologic studies in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. 2, Slide agglutination and intradermal tests. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 52 (1): 56-59.

- SOUZA CAMPOS, E., 1927, Estudos sôbre uma raça neurotrópica de *Trypanosoma cruzi*. *An. Fac. Med. Univ. S. Paulo*, 2: 197-201.
- TALIAFERRO, W. H., 1934, Some cellular bases for immune reactions in parasitic infections. *J. Parasitol.*, 20: 149.
- THOMAS, J. C. & MENNIE, A. T., 1950, Bacterial polysacharides in the diagnosis of infections. The polysacharides lysis test. *Lancet*, 209: 745-746.
- THOMAS, J. C. & MENNIE, A. T., 1950, The polysacharides lysis test. A new quantitative test for *Salmonella typhi* antibodies. *South African Med. J.*, 24 (43): 897-898.
- TORRES, C. M., 1929, Patogenia de la miocardite cronica en la enfermedad de Chagas. *Soc. Argent. Pat Reg. Noort, 5.^a Reun.*, 2: 902-916.
- VIANNA G., in Chagas C., 1911, Le Cycle de *Schizotrypanum cruzi* chez l'homme et les animaux de laboratoire. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 4 (7): 467-471.
- VILLELA, E., 1924, Paralyse experimentale chez le chien pour le *Trypanosoma cruzi*. *C. R. Soc. Biol.*, 91: 979.
- VILLELA, E., 1925, Variação do poder patogênico do *Tr. cruzi* (raça neurotropica). *Sci. Med.*, 3 (2): 147-148.
- VILLELA, E. & TORRES, C. M., 1925, Lesions histopatologicas dans la paralyse experimentale a *Schizotrypanum cruzi* chez le chien. Nature des cellules contenant le parasite dans le systeme nerveux central. *C. R. Soc. Biol.*, 93: 133.
- VILLELA, E. & TORRES, C. M., 1926, Estudo histopatológico do sistema nervoso central em paralisia experimental determinada pelo *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 19 (2): 175-219.
- WADSWORTH, A. B., MALTANER, E. & MALTANER F., 1931, The quantitative determination of the fixation of complement by immune serum and antigen. *J. Immunol.*, 21: 313-340.
- WADSWORTH, A. B., MALTANER, E. & MALTANER F., 1948, Quantitative studies of complement fixation with tuberculosis immune serum and Antigen. *J. Immunol.*, 35: 93-103.
- WADSWORTH, A., MALTANER, F. & MALTANER, E., 1948, Quantitative studies of the complement fixation reaction with syphilitic serum an tissue extract; technic of the practical quantitative test. *J. Immunol.*, 35: 217.
- WOLF, A., KABAT, E. A., BEZER, A. E. & FONSECA, J. R. C., 1951, *Fed. Proc.*, 10: 375.
- WOLF, A., KABAT, E. A., BEZER, A. E. & FONSECA, J. R. C., 1953, The effect of cortisone in Rhesus monkeys, in Shwartzman, G.: *The effect of ACTH and cortisone upon infection and resistance*. New York, Columbia University Press.