

ANTICORPOS EVI E NP NA INFECÇÃO CHAGÁSICA CRÔNICA ESTUDO EM PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS

J. M. PERALTA (1), D. A. MANIGOT (2), E. O. A. MUSCELLI (2), T. C. R. MAGALHAES (1),
E. A. ALMEIDA (2) e A. BASTOS (2)

RESUMO

Para verificar se existe correlação entre os anticorpos EVI e NP e a infecção chagásica crônica, foram estudados 56 pacientes sorologicamente positivos para o *T. cruzi*, que apresentavam diferentes formas clínicas desta infecção. Foram também estudados 75 soros com reações negativas para *T. cruzi*, para determinar os títulos de EVI e NP que não pertencem a esta população. Os resultados demonstram que título $\geq 1:32$ podem ser tomados como positivos tanto para EVI quanto para NP. Considerando este título, verificamos que 69,6% e 70,1% dos pacientes chagásicos apresentam anticorpos EVI e NP respectivamente, e somente 3% dos indivíduos não infectados apresentavam títulos de 1:32. Estes dados mostram a estreita relação existente entre EVI, NP, e a infecção chagásica. Porém, quando se analisou a presença desses anticorpos em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos estudados.

INTRODUÇÃO

O mecanismo de ação patogênica do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro ainda não está suficientemente esclarecido. Desde TORRES¹⁶, vem se tentando explicar, por fenômenos de hipersensibilidade, a discordância existente entre a intensidade da miocardite e a escassez de ninhos parasitários na fase crônica da doença de Chagas. Vários trabalhos seguiram a este^{9,11,12,14,15}, mas houve sempre uma preocupação dos Autores de estudarem especialmente o envolvimento da imunidade celular, ignorando a participação dos anticorpos nesse processo.

Recentemente, começou-se a estudar a possível participação dos anticorpos no desenvolvimento da cardiopatia e destruição neuronal na

doença de Chagas. COSSIO & col.⁴ descreveram um anticorpo circulante fixador de complemento, que reage com a membrana plasmática de músculo esquelético e endotélio vascular (EVI), sendo encontrado em 95% dos indivíduos com sorologia positiva para o *T. cruzi* e comprometimento cardíaco, e somente em 45% dos indivíduos positivos sem cardiopatia⁵.

Um outro anticorpo, contra nervo periférico (NP), foi encontrado em indivíduos com infecção chagásica, parecendo estar associado ao anticorpo EVI⁸.

Estes achados levam-nos a supor que exista estreita relação entre a presença do parasita e dos anticorpos EVI e NP, mas sua distribuição

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) UNDF/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. (Grant to Dr. A. Szarfman). Coordenação de Ensino para Graduados (CEPG — UFRJ)

(1) Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia da UFRJ, Rio de Janeiro

(2) Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina UNICAMP, Campinas, Brasil

Endereço para correspondência: Dr. Daniel A. Manigot, Departamento de Clínica Médica, Hospital das Clínicas da UNICAMP, Cidade Universitária — Barão Geraldo, CEP 13100 — Campinas — SP — Brasil

entre os indivíduos com as diferentes formas clínicas da doença necessita de melhor estudo.

O propósito deste trabalho é verificar: a) se existe associação entre a presença dos anticorpos EVI e NP, e as diferentes formas clínicas que caracterizam a fase crônica da doença de Chagas, em indivíduos atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade de Campinas, São Paulo e b) o grau e associação entre os anticorpos EVI e NP e a sorologia específica para o *T. cruzi*.

MATERIAL E MÉTODO

Foram estudadas ao todo 131 amostras de soro, sendo 56 de pacientes sabidamente chagásicos e o resto tomadas ao acaso no laboratório central do hospital. A idade dos pacientes oscilou entre 21 e 60 anos, sendo 26 mulheres e 30 homens.

A determinação dos títulos de anticorpos contra o *T. cruzi*, foi realizada através de imunofluorescência indireta (IFI), segundo método descrito por CAMARGO², hemaglutinação indireta (HAI), conforme descrição de CERISOLA & col.³ e aglutinação direta com tratamento prévio do soro pelo 2-Mercaptoetanol (AD-2ME), segundo método de VATTUONE & YANOVSKY¹⁷. Para a reação de IFI foi utilizada anti-Ig humana marcada com fluoresceína (Instituto Pasteur), sendo a leitura realizada em microscópio Zeiss Universal com epi-iluminação e lampada de mercúrio HBO-50, utilizando-se um campo microscópico de 400 X. A reação foi feita quantitativamente sendo considerados como positivos títulos $\geq 1:32$ ¹³. A HAI e AD-2ME foram realizadas em microplacas com fundo em U, diluindo-se os soros desde 1:2 até 1:4096, sendo considerado como positivos títulos $\geq 1:16$, para as duas reações¹³.

Em todos os testes foram utilizados, como antígeno, epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Y, obtidos a partir de meio LIT modificado¹.

A pesquisa dos anticorpos EVI e NP foi feita através de imunofluorescência indireta, segundo técnica descrita respectivamente por COSSIO & col.⁴ e KHOURY & col.⁸. Utilizaram-se como antígenos cortes de coração, músculo esquelético e nervo ciático de camundongos normais. Os cortes foram realizados em criostato com 2 μ de espessura. Foram utilizados o mes-

mo conjugado e microscópio anteriormente citados.

Todos os pacientes com sorologia positiva possuíam história clínica padronizada, eletrocardiograma convencional (12 derivações) e tele-radiografia do tórax. Nos casos que apresentaram qualquer grau de disfagia e/ou constipação, realizou-se radiografia contrastada de esôfago com fluoroscopia, e/ou enema opaco.

De acordo com os achados da história clínica e dos exames assinalados, os pacientes foram divididos em primeira instância em 4 grupos: I — pacientes assintomáticos do ponto de vista cardíaco e digestivo, com ECG normal e coração de tamanho normal ao Raio X (média de idade = 37 anos). II — pacientes assintomáticos ou só com sintomas atribuíveis a arritmia, sem insuficiência cardíaca, com coração de tamanho normal ao Raio X e com ECG apresentando alterações da condução (hemibloqueio anterior esquerdo; bloqueio completo de ramo direito; bloqueio atrio-ventricular de qualquer grau; bloqueio completo de ramo esquerdo) e/ou extrassístoles ventriculares ou supraventriculares freqüentes. (Média de idade = 43 anos). III — pacientes com insuficiência cardíaca e/ou cardiomegalia ao Raio X (índice cárdio-torácico superior a 0,5); com ou sem as alterações descritas para o grupo II no ECG. (Média de idade = 47 anos). IV — pacientes com sintomas e Raio X de megacolon e/ou megaesôfago, com ou sem alterações cardíacas. (Média de idade = 49 anos).

Numa segunda avaliação, os pacientes foram reagrupados, tendo em conta **apenas seu estado cardíaco** segundo o seguinte critério: **Ib** — Pacientes sem sintomas cardiovasculares, com ou sem megavisceras, com eletrocardiograma em repouso normal e coração de tamanho normal ao Raio X (idade média = 39 anos). **Iib** — Pacientes sem sintomas ou sinais de insuficiência cardíaca, com ou sem megavisceras, coração de tamanho normal ao Raio X e eletrocardiograma com transtornos de condução e/ou extrassístoles (idade média = 45 anos). **IIib** — Pacientes com insuficiência cardíaca, e/ou cardiomegalia ao Raio X, com ou sem megavisceras (idade média = 49 anos).

RESULTADOS

Dos 131 soros estudados, foram considerados como positivos todos aqueles que apresentaram mais de dois testes sorológicos positivos para a infecção chagásica.

A análise dos títulos de EVI e NP, nos soros obtidos de indivíduos sorologicamente negativos para o *T. cruzi*, demonstrou que títulos $\geq 1:32$ tem pouca probabilidade de pertencerem ao grupo de indivíduos não chagásicos (teste *t* Student, $p < 0,001$).

Na Tabela I pode ser observado que, dos 56 indivíduos com sorologia positiva, 39 (69,6%) foram positivos para EVI e 40 (70,1%) para NP. Entretanto, somente 2 (3%) dos indivíduos sorologicamente negativos apresentaram títulos de 1:32 para estes anticorpos. Estes dados mos-

tram uma significativa correlação entre a presença dos anticorpos EVI e a presença da infecção chagásica ($p < 0,001$). Por outro lado, quando se analisou a presença desses anticorpos nos pacientes chagásicos assintomáticos e naqueles com as diferentes formas clínicas da fase crônica da doença foi verificado, conforme mostrado na Tabela II, que não houve diferença significativa entre os grupos estudados (Grupos I a IV).

Reagrupados os pacientes apenas do ponto de vista cardiovascular (grupos **Ib** a **IIIb**), também não houve diferenças significativas quanto ao título da distribuição do Fator EVI e NP.

Em ambos os casos foram feitas análises de variância dos logaritmos dos inversos dos títulos $y = f(x) - \ln 1/\text{título}$.

TABELA I

Frequência dos títulos de anticorpos EVI e NP nas 131 amostras com sorologia anti — *T. cruzi* negativa e positiva

| Testes | Sorologia anti- <i>T. cruzi</i> | Títulos | | | | | | | Total |
|--------|---------------------------------|---------|----|----|----|----|-----|-----|-------|
| | | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | |
| EVI | Positiva | 5 | 8 | 4 | 12 | 17 | 9 | 1 | 56 |
| | Negativa | 61 | 10 | 2 | 2 | | | | 75 |
| NP | Positiva | 5 | 7 | 4 | 13 | 17 | 9 | 1 | 56 |
| | Negativa | 61 | 10 | 2 | 2 | | | | 75 |

TABELA II

Frequência dos títulos de anticorpos EVI e NP, nas diferentes formas clínicas da infecção chagásica crônica, em 59 pacientes com sorologia positiva para o *T. cruzi*

| Grupos | | Títulos | | | | | | | Total | % de indivíduos com título ≥ 32 |
|-----------|-----------------------------------|---------|---|----|----|----|-----|-----|-------|--------------------------------------|
| | | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | | |
| Grupo I | Forma inaparente | | | | | | | | | |
| | EVI | 1 | 1 | 2 | 4 | 3 | 4 | 1 | 16 | 75 |
| | NP | 1 | 1 | 2 | 4 | 3 | 4 | 1 | 16 | 75 |
| Grupo II | Transtorno de condução sem ICC(*) | | | | | | | | | |
| | EVI | 0 | 4 | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 11 | 45 |
| | NP | 0 | 3 | 2 | 3 | 2 | 1 | 0 | 11 | 55 |
| Grupo III | ICC e/ou cardiomegalia | | | | | | | | | |
| | EVI | 3 | 3 | 0 | 2 | 7 | 1 | 0 | 16 | 65 |
| | NP | 3 | 3 | 0 | 3 | 6 | 1 | 0 | 16 | 65 |
| Grupo IV | Megas com ou sem cardiopatia | | | | | | | | | |
| | EVI | 1 | 1 | 0 | 4 | 4 | 3 | 0 | 13 | 84 |
| | NP | 1 | 1 | 0 | 4 | 4 | 3 | 0 | 13 | 84 |

(*) ICC — insuficiência cardíaca congestiva

T A B E L A III

Frequência dos títulos de anticorpos EVI e NP em pacientes chagásicos crônicos classificados segundo o seu estado cardíaco

| Grupos | | Títulos | | | | | | Total | % de indivíduos com título \geq 32 | |
|--|-----|---------|---|----|----|----|-----|-------|--------------------------------------|-----|
| | | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | | | 256 |
| Ib (inaparentes) | EVI | 1 | 1 | 2 | 4 | 5 | 6 | 1 | 20 | 80 |
| | NP | 1 | 1 | 2 | 4 | 5 | 6 | 1 | 20 | 80 |
| IIb (transtorno de condução sem insuficiência cardíaca) | EVI | 0 | 5 | 2 | 3 | 2 | 2 | 0 | 14 | 50 |
| | NP | 0 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 0 | 14 | 57 |
| IIIb (insuficiência cardíaca) | EVI | 4 | 2 | 0 | 5 | 10 | 1 | 0 | 22 | 73 |
| | NP | 4 | 2 | 0 | 5 | 10 | 1 | 0 | 22 | 73 |

DISCUSSÃO

Este trabalho demonstra a estreita correlação que existe entre os anticorpos EVI e NP e a infecção chagásica. Entretanto, não foi encontrada diferença significativa no título e distribuição destes anticorpos nas diferentes formas clínicas e graus de comprometimento cardíaco da doença de Chagas crônica. Estes resultados discordam dos encontrados por COSSIO & col.⁵, que estudando pacientes chagásicos argentinos encontraram maior frequência de anticorpos EVI em pacientes com cardiopatia. A diferença na ocorrência do fator EVI em diferentes áreas já foi relatada por HUBSH & col.⁷, que observaram este anticorpo em 44% de 25 pacientes chagásicos chilenos e em 46% de 29 pacientes brasileiros. Acreditamos que a explicação dada por aqueles Autores, como sendo uma diferença de virulência de cepas, possa ser real. Entretanto, devemos ressaltar que os Autores não levaram em consideração a forma clínica da doença nas áreas estudadas.

Desde que os fatores EVI e NP foram descritos, diversos Autores^{5,6,7,8} tem considerado títulos a partir de 1:10 como positivos, não tendo sido ainda realizado estudo que compare populações sorologicamente negativas com positivas para o *T. cruzi*, a fim de determinar quais seriam os títulos a serem considerados como específicos para estes anticorpos. Este fato é muito importante já que indivíduos não infectados podem apresentar anticorpos contra vários tecidos¹⁰, podendo levar a conclusões divergentes quanto a presença de EVI e NP em indivíduos infectados e não infectados.

Estudando uma população sorologicamente negativa para o *T. cruzi*, nós podemos concluir,

através do teste t de Student que títulos \geq 1:32, pelo menos na área estudada, tem pouca probabilidade de pertencerem a população negativa, e podem ser considerados como títulos específicos tanto para EVI quanto NP.

SUMMARY

EVI and NP antibodies in chronic Chagas infection: A report in patients with different clinical forms

Sixty patients, serologically positive to *Trypanosoma cruzi* with four different clinical stages of the disease were studied to verify the relationship between EVI and NP antibodies and chronic infection. Seventy-five individuals with negative serology were studied to determine the specific EVI and NP titers.

When titers \geq 1:32 were considered positive, 69.6 and 70.1% of the chagasic patients have EVI and NP antibodies respectively. Conversely only 3% from the non infected individuals have titers of 1:32. This data showed a significant ($p < 0.001$) correlation between EVI, NP and chronic infection. However, when we analysed these antibodies in patients with different clinical stages of chronic Chagas' disease, no differences were found among the four groups studied.

AGRADECIMENTOS

Os Autores agradecem a orientação estatística do Dr. Djalma de Carvalho Moreira Filho, do Departamento de Medicina Preventiva — UNICAMP e a Marco Araujo Fernandes e Carlos Ausberto B. de Souza pelo auxílio técnico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMARGO, E. P. — Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic tripanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6: 93-100, 1964.
2. CAMARGO, M. E. — Fluorescent antibody for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in slide test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8: 227-234, 1966.
3. CERISOLA, J. A.; FATALA-CHABEN, M. & LAZZARI, J. O. — Teste de hemaglutinação para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Prensa Med. Arg.* 49: 1761-1767, 1962.
4. COSSIO, P. M.; DIEZ, C.; SZARFMAN, A.; KREUTZER, E.; CANDIOLO, B. & ARANA, R. H. — Chagasic Cardiopathy. I. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation* 49: 13-21, 1974.
5. COSSIO, P. M.; LAGUENS, R. P.; DIEZ, C.; SZARFMAN, A.; SEGAL, A. & ARANA, R. H. — Chagasic Cardiopathy: Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation* 50: 1252-1259, 1974.
6. HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M. E.; CORREIA, M. S. & PRATA, A. — Anticorpos anti-coração (EVI) no soro de residentes de região endêmica para a infecção chagásica (Mambai, GO). Brasília, *Resumos do XIII Congresso Soc. Brasil. Med. Trop.*, 1977, p. 54.
7. HUBSCH, R. M.; SULZER, A. J. & KAGAN, I. G. — Evaluation of an autoimmune type antibody in the sera of patients with Chagas' disease. *J. Parasitol.* 62: 523-527, 1976.
8. KHOURY, E. L.; RITACCO, V.; COSSIO, P. M.; LAGUENS, R. P.; SZARFMAN, A.; DIEZ, C. & ARANA, R. H. — Circulating antibodies to peripheral nerve in American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. Exp. Immunol.* 36: 8-15, 1979.
9. KOZMA, C.; JAFFE, R. & JAFFE, W. — Estudo experimental sobre a patogenia das miocardites. *Arq. Brasil. Cardiol.* 13: 155-161, 1960.
10. MICHAEL, J. C. — Natural antibodies. *Current Trop. Microbiol. Immunol.* 49: 43-62, 1969.
11. MUNIZ, J. — Contribuição para melhor conhecimento da ação patogênica do *T. cruzi* no organismo humano. *Hospital (Rio)* 72: 675-700, 1967.
12. MUNIZ, J. & AZEVEDO, A. P. — Novo conceito da doença de Chagas (Trypanosomiasis americana). *Hospital (Rio)* 32: 165-183, 1947.
13. SCHMUNIS, G. A.; SZARFMAN, A.; COARASA, L.; GUILLERON, C. & PERALTA, J. M. — Anti-*Trypanosoma cruzi* agglutinins in acute human Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 170-178, 1980.
14. TEIXEIRA, A. R. L. & SANTOS BUCH — The immunology of experimental Chagas' disease. I. Preparation of *Trypanosoma cruzi* antigens and humoral antibody response to these antigens. *J. Immunol.* 113: 859-869, 1974.
15. TEIXEIRA, A. R. L.; TEIXEIRA, G.; MACEDO, V. & PRATA, A. — *Trypanosoma cruzi* — sensitized T-lymphocyte mediated ⁵¹Cr release from human heart cells in Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 1097-1107, 1978.
16. TORRES, C. M. — Patogenia de la miocardite crónica en la enfermedad de Chagas. *Quinta Ren. Soc. Arg. Pat. Reg. Norte* 2: 902-916, 1930.
17. VATTUONE, N. H. & YANOVSKY, J. F. — *Trypanosoma cruzi*: agglutination activity of enzyme-treated epimastigotes. *Exp. Parasitol.* 30: 349-355, 1971.

Recebido para publicação em 13/2/1981.