

## ANTICORPOS A *TRYPANOSOMA CRUZI* NO LÍQUIDO CEFALORRAQUEANO

PESQUISA PELAS REAÇÕES DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO E DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

A. SPINA-FRANÇA \* — J. A. LIVRAMENTO \*\* — L. R. MACHADO \*\* — N. YASUDA \*\*

**RESUMO** — Nas amostras de líquido cefalorraqueano (LCR) de 200 pacientes com afecções do sistema nervoso central (SNC) foi efetuada pesquisa de anticorpos a *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi) mediante: reação de fixação do complemento (RFC) em 69, reação de imunofluorescência (IgG) indireta (RIF) em 118, ambas em 13. Em 50 casos, para a RIF, o LCR foi também previamente concentrado 20 vezes. Os resultados foram avaliados em relação às patologias que acometiam o SNC, ao comportamento das células e proteínas do LCR e ao resultado de investigações imunológicas no LCR para outras infecções do SNC (sífilis, cisticercose, esquistossomíase e toxoplasmose) para as quais técnicas semelhantes foram adotadas. Anticorpos a T. cruzi foram demonstrados em três pacientes: em um com reagudização da moléstia de Chagas na vigência da síndrome de imunodeficiência adquirida; em um paciente com epilepsia e em um paciente com acidente vascular cerebral, ambos com moléstia de Chagas comprovada pela presença de anticorpos a T. cruzi no soro.

**Antibodies to *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid: investigation by complement fixation and immunofluorescence tests.**

**SUMMARY** — Cerebrospinal fluid (CSF) samples of 200 patients who presented central nervous system (CNS) pathologies were evaluated for antibodies to *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi). The evaluation was made through: complement fixation test (CFT) in 69 patients, undirect (IgG) immunofluorescence test (IFT) in 118, and by CFT and IFT in 13. In 50 cases the IFT has been made also in concentrated (20 X) CSF samples. Results were evaluated in report to CNS pathology, CSF cells and proteins, and tests in the CSF for other CNS infections (syphilis, cysticercosis, schistosomiasis, toxoplasmosis). These tests were based on techniques similar to those adopted for the search of antibodies to T. cruzi, and were conducted concomitantly to tests for T. cruzi in the same CSF sample for everyone of the cases. Antibodies to T. cruzi were found in three patients. The first was a patient committed by the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in whom there occurred exacerbation of the acute stage of Chagas' disease. The second is a patient who is committed by epilepsy, and an acute stroke occurred in the third patient; Chagas' disease had been previously diagnosed in them through the demonstration of antibodies to T. cruzi in the blood serum.

Limitam-se as possibilidades diagnósticas de acometimento do sistema nervoso central (SNC) na forma crônica da doença de Chagas, à associação: manifestações clínicas compatíveis ao tipo de lesão encefálica comumente provocado pelo *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi); presença de anticorpos ao parasita no soro do paciente. A vigência desse binômio aventa, assim, a possibilidade de diagnóstico provável.

Trabalho do Centro de Investigações em Neurologia (CIN), do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP): \* Professor Titular; \*\* Médico Assistente. Pesquisa financiada em parte por FINEP, Financiadora de Estudos e Projetos.

Centro de Investigações em Neurologia, FMUSP — C. Postal 5199 - 01051 São Paulo SP - Brasil.

Diagnóstico de segurança resultaria da demonstração de anticorpos a *T. cruzi* no líquido cefalorraqueano (LCR), de modo semelhante ao que ocorre na neurosífilis e na neurocisticercose por exemplo. Todavia, são escassos os relatos de anticorpos a *T. cruzi* na forma crônica da doença de Chagas<sup>16</sup>, ao contrário do que se passa na fase aguda. Nesta, além dos anticorpos, o próprio parasita pode ser demonstrado oferecendo, assim, o diagnóstico de certeza<sup>6</sup>. O problema persiste, apesar da utilização de técnicas mais sensíveis (como ELISA e hemaglutinação) e dos esforços para ampliar a sensibilidade das reações imunológicas empregadas no LCR para esse fim<sup>11</sup>.

É nosso propósito relatar neste artigo o resultado de pesquisa conduzida para avaliar a questão.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foi estudada uma amostra de LCR de cada um de 200 pacientes com: epilepsia, 38; acidente vascular cerebral (AVC), 38; outra evidência de acometimento do SNC, 124. Os casos foram distribuídos em 6 grupos, servindo os 4 primeiros de controle para os restantes (Tabela 1). As características do dual citoproteico das amostras de LCR constam da tabela 2 considerando: número de células normal quando havia até 4 leucócitos/mm<sup>3</sup>; concentração proteica normal quando até 30 mg/dl para LCR da cisterna magna e até 40 para LCR lombar, respectivamente; os aumentos da concentração proteica foram considerados discretos (quando entre o limite superior da normalidade e 50 mg/dl) ou moderados (de 51 a 200 mg/dl). Para efeito desta pesquisa não foram consideradas a intensidade da hiperctose (restrita àquelas com até 200 células/mm<sup>3</sup>) e as características do perfil citomorfológico. Este era de padrão linfomononuclear em todos os casos com hiperctose, em 8 deles células eosinófilas estando presentes. Também não foi considerada a participação

Casos		
Grupo	Características	Número
1	Com anticorpos a <i>T. cruzi</i> não detectados no soro	10
2	Com anticorpos a <i>T. cruzi</i> no soro	10
3	Com anticorpos para outras infecções detectados no LCR	10
4	Com RFC e RIF para <i>T. cruzi</i> não-reagentes no LCR	10
5	Pesquisa de anticorpos a <i>T. cruzi</i> no LCR por RFC ou RIF	110
6	Pesquisa de anticorpos a <i>T. cruzi</i> por RIF em LCR concentrado	50
Total		200

Tabela 1 — Distribuição por grupos dos 200 casos com afecções do SNC nos quais foi pesquisada no LCR a presença de anticorpos.

LCR					
Grupo	C+P	P	P	C+P	Hem
	norm	aum discr	aum mod	aum	
1	5	1	0	4	0
2	7	1	0	2	0
3	1	1	1	7	0
4	6	1	0	3	0
5	70	14	6	16	4
6	35	5	2	8	0

Tabela 2 — Distribuição das 200 amostras de LCR dos 6 grupos segundo o comportamento do respectivo dual citoproteico. C, células (número/mm<sup>3</sup>); P, proteínas totais (mg/dl); Hem, hemorrágico; norm, normal; aum, aumentado; discr, discreto; mod, moderado.

de globulinas gama no perfil proteico do LCR, avaliada em 40 casos e encontrando-se aumentada em 14: o aumento era discreto (até 20%) em 10 e moderado em 4 (máximo registrado 30,9%). Reações imunológicas para sífilis e para cisticercose (de fixação do complemento e/ou de imunofluorescência indireta foram não-reagentes em todas as amostras, exceto nas do grupo 3; neste grupo, reações reagentes para sífilis foram verificadas em três casos e para cisticercose em 4, para toxoplasmose em um e para esquistossomiose em dois.

Pesquisa de anticorpos a *T. cruzi* foi efetuada em todas as amostras mediante: reação de fixação do complemento de Machado-Guerreiro (RFC) em 69; reação de imunofluorescência indireta (RIF) em 118; RFC e RIF em 13 (em três do grupo 2 e nas 10 grupo 4). A RIF, em 50 casos, também foi feita simultaneamente no concentrado (20 vezes) da amostra LCR. Como controle, foram feitas simultaneamente: em relação à RFC, reações de fixação do complemento para sífilis e para cisticercose; em relação à RIF, reações de imunofluorescência indireta para sífilis (FTA e, se necessário, FTA-Abs) e para cisticercose e, no grupo 6, para toxoplasmose. As técnicas utilizadas para RFC (hemólise completa) e para RIF (IgG) seguem as adotadas no CIN, como aquelas para as demais reações imunológicas utilizadas (15). A concentração do LCR foi feita mediante dialise contra solução macromolecular de goma arábica a 50% em solução fisiológica; o concentrado é rediluído com o próprio LCR do paciente, de tal forma que a resultante final seja concentração proteica total 20 vezes maior que a inicialmente registrada (11).

### RESULTADOS

Anticorpos a *T. cruzi* foram evidenciados no LCR de três pacientes (Tabela 3): por RIF em um e por RFC em dois. Dos 10 casos do grupo 2, pacientes sabidamente chagásicos, anticorpos a *T. cruzi* foram detectados no LCR em três. Em um caso, foram demonstrados por RIF até a diluição de 1/64 em paciente com a síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) e reagudização da moléstia de Chagas. Este caso é de observação de outro centro (Hospital Emilio Ribas) e o LCR do paciente foi estudado por nós por solicitação de um dos membros da equipe desse Hospital (Dr. D. Diamant). A amostra de LCR, xantocrômica, apresentava 25 células/mm<sup>3</sup>, 182 mg/dl de proteínas totais, 50 mg/dl de glicose e 28% de globulinas gama no perfil proteico; o perfil citomorfológico era de padrão linfomononuclear, macrófagos (8%), plasmócitos (2%) e polinucleares neutrófilos (1%) também participando; as reações de fixação do complemento para sífilis e para cisticercose eram não-reagentes, bem como as de imunofluorescência para sífilis, cisticercose, toxoplasmose e esquistossomiose. Em dois casos, anticorpos a *T. cruzi* foram demonstrados pela RFC. Em uma paciente epilética, com 26 anos de idade, cuja doença de Chagas crônica não era acompanhada de outras manifestações; a composição do LCR dessa paciente era normal, exceto pela positividade da RFC (título 1/1). Em um paciente com 28 anos de idade, que apresentou acidente vascular cerebral no decurso de doença de Chagas crônica: a composição do LCR deste paciente era normal, exceto pela positividade da RFC (título 1/2). Em ambos eram não-reagentes tanto a RIF como as reações de fixação do complemento para sífilis e para cisticercose, da mesma forma que as de imunofluorescência para sífilis, para cisticercose e para toxoplasmose.

Grupo	Diagnóstico			Presença de anticorpos a <i>T. cruzi</i> no LCR
	Epilepsia	AVC	Outro	
1	2	2	6	0/10
2	4	4	2	3/10*
3	0	0	10	0/10
4	4	4	2	0/10
5	20	20	70	0/110
6	8	8	34	0/50
Total	38	38	124	3/200

Tabela 3 — Distribuição dos casos segundo as manifestações clínicas e demonstração da presença de anticorpos a *T. cruzi* no LCR. \* Demonstrados por: RIF em um caso de AIDS que apresentou reagudização de moléstia de Chagas crônica; RFC e não por RIF em um caso de epilepsia e em um caso de AVC.

## COMENTÁRIOS

Despopulação neuronal esparsa e irregularmente distribuída resulta do acometimento do SNC pelo *T. cruzi* e esse acometimento é particularmente observado na fase aguda da doença, como comprovam estudos no homem e experimentais, na maioria conduzidos pela escola de Ribeirão Preto e sob a orientação de Köberle<sup>10</sup>. Seqüelas dessa despopulação podem transparecer no homem como 'encefalopatias mínimas', conforme conceituado por Jörg e sua escola em relação a pacientes observados longo tempo depois de, na primeira infância, terem tido meningoencefalite chagásica<sup>9</sup>. Concordantes a esses achados são aqueles de Armbrust-Figueiredo, Jardim e Takayanagui em relação a pacientes internados em hospital psiquiátrico e a pacientes com epilepsia<sup>7,8</sup>. Por outro lado, lesões maciças, resultantes de acidentes cerebrovasculares, AVC embólicos geralmente secundários a cardiopatia chagásica crônica (CCC) podem expressar-se por quadros neurológicos mais evidentes<sup>17</sup>. Todavia, nestes casos, a lesão encefálica resulta habitualmente do déficit regional de irrigação provocado pelo AVC, não sendo incomum que, ao longo da evolução da CCC, possam ocorrer vários episódios cerebrais embólicos como sugerido pelos dados de Pittella<sup>13</sup>. Além disso, o comprometimento das condições imunitárias de organismo já albergando *T. cruzi* em fase crônica da doença de Chagas pode ser acompanhado de exacerbação da fase aguda da doença, como vem sendo demonstrado no homem a partir de observação feita por Mattosinho-França et al.<sup>12</sup>. Da mesma forma, em afecções que se acompanham de comprometimento imunitário e nas quais torna-se necessária hemoterapia, esta pode levar a infestação por *T. cruzi* e desenvolvimento de forma aguda grave da doença como primeiro apontado por Becker<sup>1</sup>. Em condições como essas é comum haver infestação do SNC pelo *T. cruzi*, como nos casos referidos. Meningoencefalite ou meningoencefalomielite pode resultar, com evolução geralmente fatal, como ocorre nas meningoencefalites graves da forma aguda primária da doença.

No LCR, tanto meningoencefalites da forma aguda primária como aquelas próprias à exacerbação da fase aguda costumam transparecer de modo semelhante. Hipercitose discreta ou moderada (até cerca de 200 células/mm<sup>3</sup>), com citomorfologia de padrão linfomononuclear predominante, associa-se a aumento discreto ou moderado da concentração proteica e, eventualmente, a hipoglicorraquia discreta<sup>5</sup>. O diagnóstico de segurança pode ser dado pela demonstração no LCR de anticorpos a *T. cruzi*<sup>5</sup>. O diagnóstico de certeza é dado pela demonstração do parasita no LCR<sup>6</sup>. O caso de AIDS cujo LCR foi estudado nesta pesquisa ilustra esses achados; nele foi estabelecido o diagnóstico de segurança. Nas formas crônicas, o diagnóstico de certeza é particularmente não-esperado e aquele de segurança, eventual<sup>16</sup>. Nos dois casos em que anticorpos a *T. cruzi* foram demonstrados no LCR, o diagnóstico de segurança pode ser considerado eventual e, mesmo assim, não foi confirmado pela RIF. Embora esta não tenha sido conduzida em LCR concentrado, o baixo título da positividade da RFC em ambos deixa margem a dúvidas.

O fato de não terem sido evidenciados anticorpos a *T. cruzi* tanto pela RIF, em LCR não-concentrado e em LCR concentrado, como pela RFC, nos 197 casos restantes permite algumas considerações. Epilepsia (37 dos 38 casos) é grupo de risco quanto a possibilidade de poder eventualmente estar relacionada a seqüela do acometimento do SNC na moléstia de Chagas e o risco nele encontrado (um caso duvidoso) foi semelhante àquele verificado para AVC, com números símeles e também com um caso duvidoso, em que risco não era esperado. Neste grupo, o comprometimento da barreira hêmato-encefálica poderia explicar passagem de anticorpos do soro na área do encéfalo danificada pelo AVC. No caso em que anticorpos foram encontrados, a concentração proteica normal não sugeria essa possibilidade e este fato é corroborado por não terem sido encontrados anticorpos a *T. cruzi* provenientes do sangue nos três casos desse grupo (no qual todos os pacientes apresentavam tais anticorpos no soro) e em que a concentração proteica estava aumentada. Comparativamente ao eventual risco encontrado nessas duas patologias não foram encontrados anticorpos a *T. cruzi* nos casos com outras patologias do SNC, em número de 124, apesar de sabidamente em dois haver no soro anticorpos a *T. cruzi*. Possibilidades de reações cruzadas não foram observadas em relação ao diagnóstico de segurança de outras causas de acometimento do SNC como é caracterizado em relação aos 10 casos do grupo 3, com neurosífilis, neurocisticercose, neuroesquistossomíase e toxoplasmose do SNC. Essas possibilidades são restringidas também pelos

50 casos do grupo 6, em nenhum dos quais a reação para toxoplasmose mostrou-se reagente no LCR concentrado. Por outro lado, o fato de neste grupo serem não-reações as reações tanto para moléstia de Chagas como para toxoplasmose comprova ser difícil introduzir a concentração de amostra de LCR fatores que induzam reações falsamente positivas. Investigação de anticorpos a neurônios e de imunocomplexos não foram motivo desta pesquisa, apesar de estudos a respeito de sua importância na gênese de lesões provocadas no sistema nervoso pela moléstia de Chagas<sup>14</sup>. Podem elas ser induzidas também por fenômenos imunológicos de natureza autoimune ou de hipersensibilidade tardia. Estes últimos, por exemplo, têm sido apontados pela escola de Said<sup>2,3</sup> e podem, pelo menos em parte, explicar aspectos do comprometimento do sistema nervoso periférico<sup>4</sup>.

Assim, métodos mais precisos devem ser buscados para viabilizar tentativas de diagnóstico de segurança do acometimento do SNC na doença de Chagas, considerando que esse acometimento é comum<sup>16</sup> e que, em outras amostras populacionais, percentagens maiores de anticorpos a *T. cruzi* no LCR são registradas, particularmente quando é ele concentrado<sup>11</sup>.

#### REFERÊNCIAS

1. Becker PFL — Moléstia de Chagas aguda acidental por transfusão de sangue de doador chagásico. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 17:187, 1975.
2. Ben Younés-Chennoufi A, Hontebeyrie-Joskowicz M, Tricottet V, Eisen H, Reynes M, Said G — Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 82:77, 1988.
3. Ben Younés-Chennoufi A, Said G, Eisen H, Durand A, Hontebeyrie-Joskowicz M — Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper cells (CD4+). *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 82:84, 1988.
4. DeFaria CR, Rezende JF, Rassi A — Estudo da deservação periférica nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas. *Arq Neuro-Psiquiat* (São Paulo) 46:225, 1988.
5. Gutiérrez MV, DiCarlo MD, Millan A, Valli J, Ardanaz-Otaño SE — Análisis del líquido cefalorraquídeo proveniente de enfermos del mal de Chagas. *Rev Neurol Argent* 3:452, 1977.
6. Hoff R, Teixeira RS, Carvalho JS, Mott KE — *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease. *N Engl J Med* 298:604, 1978.
7. Jardim E, Armbrust-Figueiredo J — Estudo neurológico e do líquido cefalorraqueano em pacientes com a forma crônica da moléstia de Chagas. *Arq Neuro-Psiquiat* (São Paulo) 30:322, 1972.
8. Jardim E, Takayanagui OM — Epilepsia e doença de Chagas crônica. *Arq Neuro-Psiquiat* (São Paulo) 39: 32, 1981.
9. Jörg ME, Freire RS, Orlando AS, Bustamante AG, Figueredo RC, Peltier YA, Oliva R — Disfunción cerebral mínima como secuela de meningoencefalitis aguda por *Trypanosoma cruzi*. *Prensa Méd Argent* 59:1658, 1972.
10. Köberle F — Aspectos neurológicos da moléstia de Chagas. *Arq Neuro-Psiquiat* (São Paulo) 25:159, 1967.
11. Marquez JO, Jardim E, Lopes ER, Santos RR — Inmunopatología del líquido cefalorraquídeo en la enfermedad de Chagas. *Rev Neurol Argent* 3:448, 1977.
12. Mattosinho-França LC, Lemos S, Fleury RN, Melaragno R Filho, Ramos HAJr, Pasternak J — Moléstia de Chagas crônica associada a leucemia linfática: ocorrência de encefalite aguda com alteração do estado imunitário. *Arq Neuro-Psiquiat* (São Paulo) 27-59, 1969.
13. Pittella JEH — Ischemic cerebral changes in the chronic chagasic cardiopathy. *Arq Neuro-Psiquiat* (São Paulo) 42:105, 1984.
14. Santos RR, Marquez JO — Mecanismos inmunológicos comprometidos en la destrucción neuronal en la enfermedad de Chagas. *Rev Neurol Argent* 3:439, 1977.
15. Spina-França A, Livramento JA, Machado LR, Nobrega JPS — Líquido cefalorraqueano na síndrome de imunodeficiência adquirida. *Arq Neuro-Psiquiat* (São Paulo) 45:412, 1987.
16. Spina-França A, Mattosinho-França LC — American trypanosomiasis (Chagas' disease). In Vinken PJ, Bruyn GW, eds: *Handbook of Clinical Neurology*. Vol 35. North-Holland, Amsterdam, 1978, pg 85.
17. Spina-França A, Yasuda N — Incidência do acidente cérebro-vascular embólico na cardiopatia chagásica crônica. *Arq Neuro-Psiquiat* (São Paulo) 32:195, 1974.