

## COMPLEMENTO HEMOLÍTICO TOTAL, C<sub>3</sub> E TAXA DE CONVERSÃO DE C<sub>3</sub> NAS FORMAS CARDÍACA E INDETERMINADA DA DOENÇA DE CHAGAS

M. A. SHIKANAI-YASUDA (1), Z. T. W. SOUZA (2), P. H. YASUDA (3), S. BAUEB (2), E. A. CASTILHO (4), I. IRULEGUI (4) e C. A. C. VAZ (2)

### RESUMO

Os valores de complemento hemolítico total, C<sub>3</sub> total (nativo + produtos de degradação) e o grau de conversão de C<sub>3</sub> nativo foram estudados em dois subgrupos de pacientes chagásicos, nas formas cardíaca e indeterminada, e em um subgrupo de indivíduos não chagásicos, clinicamente sadios. Os níveis de C<sub>3</sub> total e as taxas de conversão de C<sub>3</sub> em seus produtos de degradação foram semelhantes nos três subgrupos. Os valores de complemento hemolítico total foram estatisticamente diferentes nos três subgrupos (nível de significância descritivo  $p = 0,0757$ ), tendo sido observada média aritmética mais baixa no subgrupo de cardíacos e mais elevada no subgrupo de controles. Maior amplitude de variação dos níveis de complemento hemolítico total foi notada no subgrupo de cardíacos, no qual se encontraram os valores extremos (máximo e mínimo), considerando-se todos os subgrupos.

### INTRODUÇÃO

Ao se analisar um possível efeito protetor do complemento "in vivo" contra o *Trypanosoma cruzi*<sup>3,7,8,14,15</sup>, encontram-se observações conflitantes na literatura, em parte relacionadas à diversidade de cepas tanto de parasitas quanto de animais utilizados. CUNNINGHAM & col.<sup>7</sup>, estudando camundongos altamente suscetíveis ao parasita, notaram diminuição progressiva de C até a morte deles, com aproximadamente 43% do nível normal de complemento (C). SIQUEIRA & col.<sup>22</sup> sugeriram uma relação entre queda dos níveis de complemento hemolítico total e níveis máximos de antígeno solúvel circulante na doença em ratos, com possível ativação de C pelo antígeno solúvel liberado no soro.

A presença de imunocomplexos circulantes na doença experimental aguda foi confirmada

por CHAVES & col.<sup>4</sup> e GALVÃO CASTRO & col.<sup>11</sup>, tendo os primeiros Autores identificado antígenos parasitários nestes complexos. Observou-se ainda diminuição dos níveis de C<sub>3</sub> na fase aguda<sup>11</sup> e conversão do complemento, bem como aumento de seus produtos de degradação mais intensamente na fase aguda e menos intensamente na fase crônica da doença experimental<sup>13</sup>. Uma possível participação de mecanismos imunológicos humorais na patogênese de lesões teciduais da doença de Chagas foi sugerida por CHAVES & col.<sup>5</sup>, ao observarem deposição de antígeno parasitário, gamaglobulina e C nas fases aguda e crônica da doença em camundongos, embora tenham feito a ressalva de terem utilizado dose elevada de tripomastigotas, na infecção experimental. Paralelamente, IRULEGUI & col.<sup>14</sup> notaram menor intensidade de alterações histológicas cardíacas

(1) Departamento de Medicina Tropical e Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP

(2) Centro de Pesquisas Imunoquímicas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP

(3) Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP

(4) Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da USP. (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo)

em camundongos de complementados, infectados com a cepa Y do parasita, quando comparados a animais normocomplementêmicos. Na doença humana aguda, COSSERMELLI & col.<sup>6</sup> descreveram valor diminuído de complemento hemolítico total em paciente que desenvolveu polimiosite, com presença de ninhos de parasita em material de biópsia e anticorpos da classe IgM específicos, na vigência de tratamento com corticosteróides para artrite reumatóide.

Quanto à doença humana crônica, alguns Autores têm evidenciado imunocomplexos circulantes apenas em pequena porcentagem de pacientes examinados<sup>19,20</sup>. Outros encontraram nível médio de imunocomplexos circulantes maior em cardiopatas chagásicos do que naqueles pacientes chagásicos sem cardiopatia aparente<sup>10</sup>. Quanto ao complemento total ou seus produtos, SÁ FERREIRA & col.<sup>20</sup> e ABLIN & CANESE<sup>1</sup> não encontraram diferença entre pacientes e controles e RIERA & col.<sup>19</sup> observaram em 46% de pacientes cardiopatas, níveis de complemento total inferiores a pelo menos dois desvios padrões abaixo da média normal e alterações do componente C<sub>4</sub> do complemento (C<sub>4</sub>), em menor magnitude.

No presente trabalho, procurando investigar possíveis diferenças entre pacientes chagásicos, com e sem cardiopatia aparente, estudamos níveis de complemento hemolítico total (CH<sub>50</sub>) e do componente C<sub>3</sub> do complemento (C<sub>3</sub>), bem como taxas de conversão de C<sub>3</sub> nestes pacientes.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

### Casuística

Foram formados três subgrupos, a partir de doadores de sangue, sendo dois constituídos de pacientes chagásicos crônicos, nas formas cardíaca e indeterminada. O diagnóstico de doença de Chagas foi estabelecido pela positividade simultânea das reações de imunofluorescência, hemaglutinação passiva e de fixação de complemento.

Os pacientes de forma indeterminada não tinham queixas clínicas e não apresentavam anormalidades aos exames eletrocardiográfico e radiológicos de área cardíaca e esôfago contrastado. Os pacientes cardíacos eram oligo ou assintomáticos e apresentavam as seguintes

alterações eletrocardiográficas: bloqueio completo de ramo direito e/ou hemibloqueio anterior esquerdo e/ou extrassístoles ventriculares polifocais, associando-se, às vezes, alterações de repolarização ventricular.

O terceiro subgrupo foi formado por indivíduos não chagásicos, clinicamente sadios, com as reações já citadas, negativas.

O número de soros analisados por subgrupo variou segundo o método empregado, estando estes dados representados nas Tabelas I, II e III. Cada indivíduo foi examinado em uma única circunstância, sendo o número de soros igual ao número de pessoas estudadas.

### Métodos

**Soros** — Os soros foram separados logo após a coleta e guardados a -70°C.

**Anti-soro** — Soro anti-C<sub>3</sub> humano foi produzido em coelhos pelo método de MARDINEY & MÜLLER-EBERHARD<sup>17</sup>.

**Complemento hemolítico total** — Os soros foram titulados em unidades 50% de hemólise (CH<sub>50</sub>) pelo método de WADSWORT, MALTANER & MALTANER<sup>24</sup>, sendo os resultados expressos em unidades CH<sub>50</sub> de hemólise/ml.

**Imunodifusão radial** — Realizada segundo o método de MANCINI & col.<sup>16</sup>. O anti-soro anti-C<sub>3</sub> humano incorporado à placa de agarose, reage com C<sub>3</sub> nativo e seus produtos de degradação. Utilizou-se como padrão uma mistura única de dez soros de doadores de sangue, não chagásicos, aparentemente sadios, em três diferentes diluições, cujas concentrações de C<sub>3</sub> eram conhecidas (172, 146 e 134 mg/100ml). Os resultados foram expressos em mg/100ml.

**Imunoeletroforese bidimensional** — Imunoeletroforese bidimensional (imunoeletroforese cruzada de Laurell) foi realizada a partir da descrição de Weeke, com modificações conforme IRULEGUI & col.<sup>13</sup>. Utilizou-se como padrão uma mistura única de dez soros de doadores de sangue, com taxa de conversão média de 3,34%. A porcentagem de conversão de C<sub>3</sub> foi calculada pela seguinte fórmula:

$$C_3P.D. \times 100$$

% de conversão =  $\frac{\text{C}_3P.D. \times 100}{\text{C}_3P.D. + \text{C}_3N}$ , onde

C<sub>3</sub>P.D. = área correspondente aos precipitados dos produtos de degradação de C<sub>3</sub>.

$C_3N$  = área correspondente aos precipitados do  $C_3$  nativo.

**Incubação de soro humano com zimosan** — Amostras de soro humano fresco foram incubadas com zimosan durante 10', 30', 2 horas e 24 horas a 37°C para identificação de curvas de precipitação nas placas de imunoeletroforese bidimensional. Os sobrenadantes foram utilizados para análise.

### Análise estatística

As observações referentes aos valores de Complemento hemolítico total,  $C_3$  e conversão

de  $C_3$ , nos três subgrupos foram analisados segundo um modelo linear, não paramétrico, proposto por KRUSKAL & WALLIS<sup>12</sup>. Comparações múltiplas entre os grupos foram realizadas segundo a estatística de DUNN<sup>9</sup>.

### RESULTADOS

Nas Tabelas I, II e III são observados: média aritmética, mediana, valores máximo e mínimo e desvio padrão das seguintes variáveis: Complemento hemolítico total,  $C_3$  e taxa de conversão de  $C_3$ .

TABELA I  
Estatísticas descritivas do nível do complemento hemolítico total em chagásicos e indivíduos não chagásicos

Estatísticas descritivas	Grupos		
	cardíacos (N* = 18)	Chagásicos f. indeterminada (N = 17)	Não chagásicos "controle" (N = 18)
M. aritmética	244,9**		
Mediana	243,1	261,9	277,9
Valor mínimo	154,0	243,0	275,4
Valor máximo	401,0	197,9	231,0
Desvio padrão	17,9	341,0	336,1
		13,8	9,8

\* N = número de pessoas

\*\* — em unidades  $CH_{50}$ /ml

TABELA II  
Estatísticas descritivas do nível de  $C_3$  em pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos

Estatísticas descritivas	Grupos		
	cardíacos (N* = 20)	Chagásicos f. indeterminada (N = 31)	Não chagásicos "controle" (N = 22)
M. aritmética	181,3**		
Mediana	181,0	186,1	183,6
Valor mínimo	134,0	188,0	182,0
Valor máximo	230,0	140,0	146,0
Desvio padrão	21,9	268,0	224,0
		28,1	23,6

\* N = número de pessoas

\*\* — mg/100 ml

TABELA III  
Estatísticas descritivas da taxa de conversão de  $C_3$  em pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos

Estatísticas descritivas	Grupos		
	cardíacos (N* = 23)	Chagásicos f. indeterminada (N = 33)	Não chagásicos "controle" (N = 20)
M. aritmética	5,2**		
Mediana	4,1	6,0	5,4
Valor mínimo	1,4	5,0	5,6
Valor máximo	11,8	0,8	1,3
Desvio padrão	4,6	13,4	11,6
		4,1	5,0

\* N = número de pessoas

\*\* — % de conversão

Resume-se na Tabela IV o resultado da análise estatística entre os três subgrupos estudados.

T A B E L A I V  
Resultado da análise estatística

Variável	Valor observado da estatística de Kruskal-Wallis	Nível de significância descritivo
C hemolítico total	5,162	0,0757*
Conversão de C <sub>3</sub>	1,261	0,5324
C <sub>3</sub>	0,255	0,8801

\* significante ao nível de 8%

Comparações entre subgrupos, segundo os valores de CH<sub>50</sub>, são observadas na Tabela V.

## DISCUSSÃO

Pode-se notar, no presente trabalho, diferença significativa entre os subgrupos estudados, quanto aos valores de CH<sub>50</sub>. As médias aritméticas encontradas foram menores nos pacientes chagásicos (cardíacos = 244,9; forma indeterminada = 261,9) em relação aos indivíduos controles (277,9) (\*). Essas observações são concordantes com as de RIERA & col.<sup>19</sup>, que, es-

T A B E L A V  
Resultado das comparações entre grupos segundo os valores de C hemolítico total

Tipo de comparação	Valor observado da estatística de Dunn	Valor crítico da estatística de Dunn para uma taxa de erro "experiment wise" de 0,08
F. cardíaca x F. indeterminada	4,80	3,79
F. cardíaca x controle	11,60	3,85
F. indeterminada x controle	6,80	3,79

tudando menor número de pacientes com cardiopatia chagásica típica e na forma indeterminada, evidenciaram valores baixos de C hemolítico total nos cardiopatas. Uma das possíveis causas de consumo do C nos cardiopatas seria a presença de imunecomplexos circulantes e/ou depositados. Esta hipótese é corroborada pelo encontro de imunecomplexos circulantes em nível médio mais elevado nos pacientes chagásicos cardíacos do que naqueles na forma indeterminada (FRUIT & col.<sup>10</sup>) e pelos menores níveis de C hemolítico total no subgrupo de cardíacos do presente trabalho.

Vários tipos de anticorpos (anti-EVI e anti-nervo periférico, anti-neurônio-glia) tem sido observados em níveis elevados em pacientes chagásicos, com e sem cardiopatia, tendo-se evidenciado propriedade fixadora de C pelo anticorpo anti-EVI. Embora pacientes de forma

indeterminada possam eventualmente ter alterações cardíacas inaparentes ao exame eletrocardiográfico de repouso, não se tem observado diferença entre estes e cardiopatas clássicos, quanto aos níveis de anticorpos anti-EVI e anti-neurônio-glia das classes IgG + IgM<sup>18,21,23</sup>. Níveis mais elevados de anticorpos anti-EVI da classe IgM tem sido encontrados em pacientes de forma indeterminada, sendo possivelmente marcadores de lesões mais recentes<sup>21</sup>. Embora os menores níveis de anticorpos anti-EVI da classe IgM em cardiopatas pudesse estar relacionado à deposição de imunecomplexos e consumo de C, torna-se difícil, dessa forma, explicar a menor intensidade de alterações do sistema C em pacientes de forma indeterminada, cujas lesões por imunecomplexos seriam mais recentes.

Os níveis de C<sub>3</sub>, obtidos pelo método de MANCINI & col.<sup>16</sup>, compreendem tanto o C<sub>3</sub> ativo como o inativo, não constituindo, portanto, um parâmetro tão útil para analisar a ativação do componente C<sub>3</sub> do complemento como a taxa de conversão de C<sub>3</sub>. No presente trabalho, tanto os níveis de C<sub>3</sub> quanto as suas taxas de conversão medidas foram semelhantes nos três subgrupos. Uma explicação parcial para a semelhança entre os dois subgrupos de pacien-

(\*) Deve-se lembrar que nos pacientes cardiopatas ocorreu maior amplitude de variação dos valores de complemento hemolítico total, sendo deste grupo os valores extremos (máximo e mínimo) observados neste trabalho. Já nos subgrupos de forma indeterminada e não chagásicos, as variações foram menos amplas, sendo semelhantes os valores máximos encontrados nestes dois subgrupos; o valor mínimo foi menor nos pacientes de forma indeterminada do que nos indivíduos não chagásicos (Tabela I).

tes estudados (em relação aos valores de  $CH_{50}$ ,  $C_3$  e conversão de  $C_3$ ) seria o consumo de C por imunocomplexos circulantes ou depositados tanto em cardiopatas, quanto em pacientes de forma indeterminada. Com efeito, tais imunocomplexos depositados poderiam ser uma das possíveis causas de alterações cardíacas encontradas nos pacientes de forma indeterminada, que só foram evidenciadas por meio do emprego de métodos mais sensíveis do que o eletrocardiograma convencional (vetocardiografia + métodos radioisotópicos)<sup>21</sup>. Outra possibilidade seria a de que tanto imunocomplexos circulantes como consumo de C não tivessem qualquer relação com lesões cardíacas.

A equivalência das taxas de conversão de  $C_3$  nos subgrupos estudados poderia sugerir que, mesmo podendo estar presentes imunocomplexos circulantes em pacientes chagásicos, estes não são capazes de provocar conversão significativa de  $C_3$ . A ausência de lesões renais, clinicamente detectáveis nestes pacientes chagásicos, parece indicar que imunocomplexos circulantes, porventura existentes nos mesmos, são insuficientes para provocar nefropatia.

Portanto, embora na doença experimental se observe consumo e conversão do C, como conseqüência da formação de imunocomplexos, não se comprovou, nos pacientes crônicos estudados, pelo método utilizado, conversão significativa do  $C_3$ . Deve-se lembrar, aqui, que a dose de tripomastigotas utilizada na infecção experimental foi elevada<sup>5</sup>. Outras possíveis causas de depressão de complemento hemolítico total, como por exemplo, consumo de outros componentes ou depressão de síntese, podem ser consideradas mas devem ser ainda estudadas.

Considerando que alterações sugestivas da deposição de imunocomplexos circulantes foram descritas na doença humana crônica em 1959 por BRITO & VASCONCELOS<sup>2</sup>, torna-se fundamental o prosseguimento de estudos, com maior casuística e com métodos mais sensíveis, que visem determinar a importância de imunocomplexos circulantes na patogenia da cardiopatia chagásica crônica.

## SUMMARY

Levels of hemolytic complement, total  $C_3$  and degree of conversion of native  $C_3$  in cardiac

## and indeterminate form of Chagas' disease

The levels of hemolytic complement and total  $C_3$  (native  $C_3$  plus its degradation products) and the degree of conversion of native  $C_3$  into its breakdown products were studied in sera from two subgroups of chagasic patients (indeterminate and cardiac forms) and from non chagasic individuals (control subgroup). The levels of total  $C_3$  and the degree of conversion of native  $C_3$  into its breakdown products were similar in the three subgroups. The levels of hemolytic complement were statistically different among the three subgroups. The lowest average was observed in the subgroup of cardiac patients and the highest average in the control subgroup of non chagasic individuals. The widest variation on levels of hemolytic complement was observed in the subgroup of cardiac patients in which we found the maximum and minimum values among all the subgroups.

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Marcília de Araújo Medrado-Faria, coordenadora do Projeto CNPq — PDE 2228/110/80 e ao Dr. Yoshitaka Okumura, chefe do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, por possibilitarem a seleção de pacientes; às Dras. Júnia Chaves e Tereza A. E. Kliemann, pelas facilidades na utilização respectivamente, de material e equipamento de seus laboratórios; ao Prof. Dr. Vicente Amato Neto, pelo auxílio na aquisição de reagente utilizado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABLIN, R. J. & CANESE, A. — Immunoglobulin and complement in Chagas' disease. Zbl. Bakt. Hyg. Abt. Orig. A 223: 124-129, 1973.
2. BRITO, T. & VASCONCELOS, E. — Necrotizing arteritis in megaesophagus. Histopathology of ninety-one biopsies taken from the cardia. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 1: 195-206, 1959.
3. BUDZKO, D. B.; PIZZIMENTI, M. C. & KIERSZENBAUN, F. — Effects of complement depletion in experimental Chagas' disease: immune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immunity 11: 86-91, 1975.
4. CHAVES, J.; FERRI, R. G.; KLIEMANN, T. A. E.; IRULEGUI, I. & SOUZA, H. B. W. T. — Complexos imunes circulantes na Doença de Chagas experimental. Identificação de antígenos parasitários nos complexos. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 21: 77-81, 1979.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; SOUZA, Z. T. W.; YASUDA, P. H.; BAUEB, S.; CASTILHO, E. A.; IRULEGUI, I. & VAZ, C. A. C. — Complemento hemolítico total, C<sub>3</sub> e taxa de conversão de C<sub>3</sub> nas formas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 26:13-18, 1984.

5. CHAVES, J.; MARIANO, O. N.; SOUZA, H. B. W. T.; IRULEGUI, I. & VAZ, C. A. C. — Deposição de complexos imunes na doença de Chagas experimental. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 24: 11-15, 1982.
6. COSSERMELLI, W.; FRIEDMAN, H.; PASTOR, E. H.; NOBRE, M. R.; MANZIONE, A.; CAMARGO, M. E. & SHIROMA, M. — Polymyositis in Chagas' disease. *Ann. Rheum. Dis.* 37: 277-280, 1978.
7. CUNNINGHAM, D. S.; GRAIG, W. H. & KUHN, R. E. — Reduction of complement levels in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 64: 1044-1049, 1978.
8. DALMASSO, A. P. & JARVINEN, J. A. — Experimental Chagas' disease in complement-deficient mice and guinea-pigs. *Infect. Immun.* 28: 432-438, 1980.
9. DUN, O. J. — Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* 6: 241-252, 1964.
10. FRUIT, J.; MOSCA, W.; AFCHAUN, D.; YARZABAL, L.; SANTORO, F. & CAPRON, A. — Circulating immune complexes in human Chagas' disease. ANAIS CONGRESSO INTERNACIONAL D. CHAGAS. Rio de Janeiro, p. 199. 1979.
11. GALVÃO-CASTRO, B.; MORGADO, M. G. & SCHMÖCKER, K. — Immunopathology of American trypanosomiasis: Immune complexes, complement C<sub>3</sub>, immunoglobulins and immune response in experimental Chagas disease. ANAIS CONGRESSO INTERNACIONAL D. CHAGAS. Rio de Janeiro, p. 179, 1979.
12. HOLLANDER, M. & WOLFE, D. A. — *Nonparametric statistical methods*. New York, John Wiley & Sons, 1973.
13. IRULEGUI, I.; CHAVES, J.; FERRI, R. G.; SOUZA, Z. W. T.; SOUZA, H. B. W. T. & CASTILHO, E. A. — Conversion of the C<sub>3</sub> component of complement in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 22: 62-68, 1980.
14. IRULEGUI, I.; YAMASHIRO, E. H.; CASTILHO, E. A. & BRITO, T. — The complement system and the inflammatory response in experimental Chagas' disease. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 24: 349-352, 1982.
15. KIERSZENBAUM, F. — Cross-reactivity of lytic antibodies against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 62: 134-135, 1976.
16. MANCINI, G.; CARBONARA, A. O. & HEREMANS, J. F. — Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2: 235-254, 1965.
17. MARDINEY, M. R. & MULLER-EBERHARD, H. J. — Mouse B<sub>2</sub>C globulin: production of antiserum and characterization in the complement reaction. *J. Immunol.* 94: 877-882, 1965.
18. PERALTA, J. M.; MANIGOT, D. A.; MUSCELLI, E. O. A.; MAGALHÃES, T. C. R.; ALMEIDA, E. A. & BASTOS, A. — Anticorpos EVI e NP na infecção chagásica crônica. Estudo em pacientes com diferentes formas clínicas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 24: 6-10, 1982.
19. RIERA, N. E.; MALBRAN, A.; RITACCO, V.; COSCIO, P. M.; ARANA, R. M. & BRANCO, M. M. E. — El sistema complemento en la enfermedad de Chagas crónica. *Medicina (E. Aires)* 40: 125-132, 1980.
20. SÁ FERREIRA, J. A.; GALVÃO-CASTRO, B.; SCHMÖCKER, K.; CASTRO, E.; MACEDO, V. & PRATA, A. — Detection of circulating immune complexes and complement study in different clinical forms of Chagas' disease. VII REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS. Resumos. Caxambu, MG, Brasil, 1980.
21. SHIKANAI-YASUDA, M. A. — Doença de Chagas: formas indeterminada e cardíaca. Resposta imune humoral estudada em linfócitos, miocárdio e tecido nervoso periférico. São Paulo, 1982. [Tese Doutorado]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
22. SIQUEIRA, A. F.; FERRIOLI FILHO, F. & RIBEIRO, R. D. — Aspectos imunológicos precoces observados em ratos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Resumos. IX REUNIÃO ANUAL SOBRE PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS. Caxambu, M.G., Brasil, 1977, p. 76.
23. SZARFMAN, A.; LUQUETTI, A.; RASSI, A.; RESENDE, J. M. & SCHMUNIS, G. A. — Tissue reacting immunoglobulins in patients with different clinical forms of Chagas' disease. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* 30: 43-46, 1981.
24. WADSWORTH, A. B. — *Standard methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health*. Baltimore, William & Wilkins, 1947.

Recebido para publicação em 18/2/1983.