

ENFERMEDAD DE CHAGAS

REACTIVIDAD SEROLOGICA HACIA ANTIGENOS CRUDOS Y SEMIPURIFICADOS DEL *T. CRUZI* EN DISTINTOS GRUPOS CLINICOS DE PACIENTES

LILIANA CERVETTA*, BEATRIZ BASSO, IRMA CASTRO, NORBERTO SANTAMARINA, EDGARDO MORETTI

Area Diagnóstico y Tratamiento, Servicio Nacional de Chagas, Córdoba

Resumen La respuesta inmune de los infectados chagásicos difiere cualitativa y cuantitativamente según el estadio de la enfermedad. La medición con fines clínicos de estas diferencias depende de la posibilidad de contar con preparaciones antigénicas adecuadas. Con el objeto de avanzar en este sentido, se estudió el comportamiento de distintos antígenos (Ag) del *T. cruzi* en pacientes chagásicos agudos y crónicos pertenecientes a los grupos 0 (G0) y 1 (G1). Se midió el nivel de anticuerpos (Ac) totales por serología convencional (hemaglutinación e inmunofluorescencia (IF)), y por enzimoanálisis, los títulos de Ac contra el extracto crudo de formas epimastigotes del parásito (F 105) y contra una fracción semipurificada por cromatofocado analítico (F IV). En los pacientes agudos se observó mediante la reacción de ELISA con F 105, un 60% de resultados positivos, mientras que la serología convencional reveló un alto porcentaje de sueros con ambas reacciones negativas (61%) y un 35% de discordantes. Luego del tratamiento antiparasitario en los pacientes agudos, hubo una disminución en los títulos de Ac hacia cualquiera de los Ag estudiados. En los pacientes crónicos, los resultados mostraron una tendencia de los individuos de G1 a presentar mayores títulos de Ac tanto por IF frente al parásito total, como por enzimoanálisis (ELISA) frente a la fracción F IV, con respecto a los del G0. Esta tendencia fue más evidente cuando se combinaron los resultados de ambas técnicas. En efecto, el 22% de los sueros del G1 presentaron títulos por IF $\geq 1: 128$, e índices por ELISA $\geq 3,5$, mientras que sólo el 2% de los sueros del G0 presentó esta característica. Niveles más bajos no permitieron discriminar poblaciones. La conjugación de los métodos tradicionales con la utilización de técnicas que empleen antígenos purificados o sintéticos puede resultar en una mejora en la calidad y en la utilidad del inmunodiagnóstico.

Palabras clave: enfermedad de Chagas, *T. cruzi*, antígenos, serología, respuesta inmune

El *T. cruzi* desencadena profundas alteraciones inmunológicas en los individuos desde el momento en que ingresa al organismo. Durante la etapa aguda de la infección provoca fundamentalmente inmunosupresión, que facilita la super-

vivencia del parásito y su diseminación en las células huésped^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8}. En la etapa crónica, en cambio, predominan los fenómenos de autoagresión, postulados como mecanismos de patogenia^{9, 10, 11, 12}, si bien actualmente se vuelve a otorgar importancia a la acción directa del parásito como factor de daño celular^{13, 14, 15}. La base que sustenta el primero de los mecanismos está dada, entre otras causas, por la dificultad de detectar formas intracelulares o sanguíneas del *T. cruzi* en pacientes con infección crónica¹⁶, por la modulación de la patología en animales inmuno-

Recibido: 16-I-1996

Aceptado: 18-X-1996

*Becaria de CONICOR (Consejo de Investigaciones Científicas y tecnológicas de la Pcia. de Córdoba).

Dirección postal: Dra. Liliana Corvetta, Rondeau 41, Córdoba, Argentina

comprometidos^{17, 18} y por la presencia de antígenos (Ag) del *T. cruzi* y tejidos del huésped que manifiestan reacción cruzada^{19, 20}.

Así como la fisiopatología de la enfermedad de Chagas está relacionada con la respuesta inmune, la medición de dicha respuesta tiene potencial interés como indicador evolutivo. Por ejemplo, la negativización serológica puede ser un criterio de curación en el tratamiento de casos agudos o congénitos^{21, 22, 23, 24, 25}. Por otra parte, hallazgos recientes sugieren que el título y perfil de anticuerpos (Ac) es diferente en pacientes con y sin cardiopatía^{26, 27, 28, 29}. No ha sido posible aún, sin embargo, relacionar en forma directa la presencia de determinados Ac con el desarrollo de la patología, y se discute el significado clínico que podría tener el nivel de Ac totales contra el *T. cruzi*^{30, 31}.

Frente a estos antecedentes e interrogantes, el objetivo del trabajo fue realizar un análisis cuali y cuantitativo de la respuesta inmune específica hacia Ag crudos y semipurificados del *T. cruzi* en los grupos clínicos de pacientes con enfermedad de Chagas de mayor incidencia.

Materiales y métodos

Pacientes

Agudos: Se obtuvieron sueros de 30 pacientes con infección aguda, con parasitemia detectable por los métodos de Strout y/o microstrout. En 8 pacientes se realizó un seguimiento, obteniendo muestras de sangre luego del tratamiento específico con Benznidazol.

Crónicos: Se obtuvieron sueros de 86 individuos con infección crónica, demostrada por la positividad de dos reacciones serológicas (hemaglutinación e inmunofluorescencia). Los pacientes fueron clasificados desde el punto de vista clínico según lo descrito por Kuschnir y col.³² en grupo 0 (G0): pacientes sin cardiopatía detectable por electrocardiograma (ECG) convencional (n = 41) y grupo 1 (G1): pacientes con alteraciones en el ECG compatibles con las producidas por la enfermedad de Chagas, con área cardíaca normal en el estudio radiológico, y sin evidencias clínicas ni hemodinámicas de insuficiencia cardíaca (n = 45). Las alteraciones observadas fueron: bloqueo completo de rama derecha, solo o asociado con hemibloqueo anterior izquierdo y/o extrasistolia. No se incorporaron a este estudio pacientes de los grados más severos (2 y 3) de dicha clasificación.

La edad de la población estudiada osciló entre 1 mes y 30 años con un promedio de 5 años en los agudos, y

entre 4 y 50 años, con un promedio de 34 para los crónicos. Como controles se usaron sueros de pacientes con serología negativa para Chagas y otras infecciones (Hepatitis, HIV, Lúes), con edades similares a los problemas. Se descartaron los individuos con enfermedades metabólicas (diabetes, dislipemias) o de otro tipo que pudieran afectar la pureza de la muestra (cardiopatías isquémicas, hipertensivas, metabólicas, congénitas, y valvulopatías). Todos los pacientes provinieron de zonas endémicas de las provincias de Córdoba, Santiago del Estero y La Rioja.

Técnicas de Laboratorio

Antígenos: Los parásitos (formas epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen) fueron cultivados en medio monofásico³³, cosechados en la fase de crecimiento exponencial, y lavados con buffer de fosfato salino (PBS) pH = 7,2.

Ag para inmunofluorescencia: Los epimastigotes se fijaron con glutaraldehído al 0,1%, de acuerdo a lo descrito por Fruit y col³⁴.

Ag para hemaglutinación: Los parásitos se lisaron y se centrifugaron a 105.000g durante 60 minutos, a 4°C. El sobrenadante (F 105) se empleó para sensibilizar glóbulos rojos humanos grupo O³⁵.

Ag para cromatofocado analítico: Se utilizó la F 105, como material de partida.

Ag para enzimoimmunoensayo: Se utilizó el extracto crudo F 105, y las fracciones F III y F IV, obtenidas por cromatofocado.

Cromatofocado analítico (CEF): Es una técnica mediante la cual se obtiene, a partir de un extracto crudo, fracciones semipurificadas cuya característica principal es la de estar compuestas por proteínas con puntos isoeléctricos similares. Básicamente, si se eluye un buffer equilibrado a un determinado pH a través de una columna de intercambio iónico equilibrada a un segundo pH, se genera un gradiente de pH. Si se utiliza tal gradiente para eluir proteínas unidas a la columna, se consigue que tales proteínas eluyan de acuerdo a sus puntos isoeléctricos. La técnica utilizada fue la descrita por Sluyterman y col.^{36, 37}. Brevemente, se preparó un ligando entre el gel (Polybuffer exchanger 94, Pharmacia Fine Chemicals) y el buffer inicial (BI, Imidazol-Clorhídrico, pH = 7,4), con el cual se empaquetó una columna (K 9/60, Pharmacia Fine Chemicals) usando el BI como eluyente. Luego se diluyó convenientemente la F 105 (concentración proteica 15 mg/ml) en BI, y se sembró en la columna, eluyéndose con Poly-buffer (Pharmacia Fine Chemicals) pH = 4,0. Se recolectaron fracciones de 2 ml, se les determinó el pH y se estimó la concentración proteica mediante lectura a 280 nm. El perfil de elución obtenido al graficar DO en función del volumen de elución se muestra en la Fig. 1. En la misma se pueden obser-

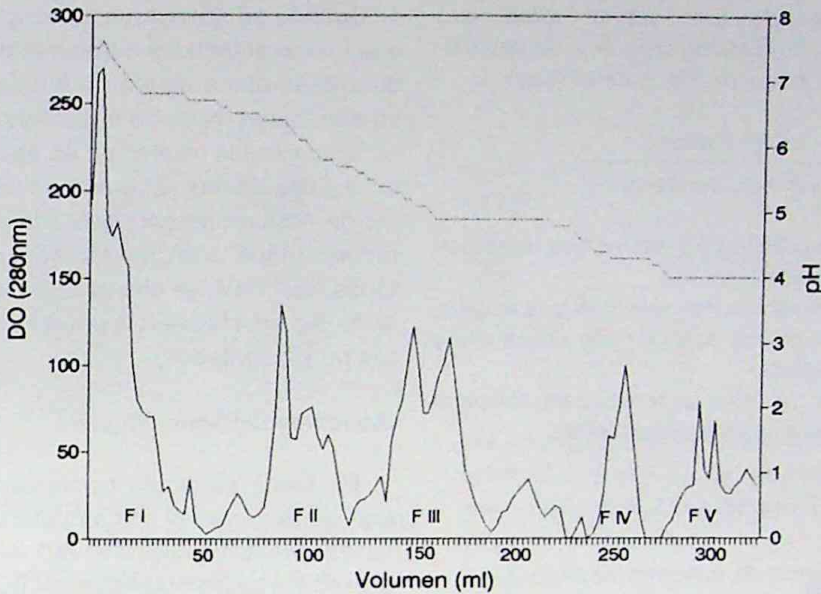


Fig. 1.— Fraccionamiento de proteínas del extracto crudo de formas epimastigotes del *T. cruzi* (F 105) mediante cromatografía de intercambio iónico. (—): Densidad óptica a 280 nm de las fracciones eluidas. (···): Gradiente de pH.

var 5 fracciones principales, denominadas F I a F V, cuyos rangos de puntos isoeléctricos fueron: 7,5-7,0; 6,4-5,8; 5,3-4,9; 4,3-4,1 y 4,0 respectivamente. La línea superior representa el gradiente de pH. Las fracciones se dializaron contra PBS y se conservaron a -20°C hasta su uso.

Cuando se empleó la técnica de ensayo de inmunoenzima (ELISA) con dichas fracciones, los ensayos realizados permitieron seleccionar dos fracciones de interés, F III y F IV, de acuerdo a lo descrito por Gea y col.²⁸ usando electroforesis de intercambio iónico. Los resultados mostraron que las fracciones de pI más elevados (F I y F II) fueron menos eficaces en discriminar poblaciones de individuos infectados.

Dosaje de proteínas: Se realizó mediante la técnica de Lowry²⁸.

Reacciones parasitológicas

Strout: Se extrajeron aproximadamente 5 ml de sangre mediante punción venosa. Se dejó retraer el coágulo en forma espontánea, y se centrifugó durante 1 minuto a 1000 rpm. Descartando el coágulo se centrifugó nuevamente a 3000 rpm, durante 3 minutos. El sedimento obtenido se observó entre porta y cubreobjetos con objetivo de 40X.

Microstrout: Se realizó la técnica esencialmente de acuerdo a lo descrito por Woo³⁹. Brevemente, se extrajo sangre mediante punción digital, la que se colocó en capilares heparinizados y se centrifugó durante 7 minutos a 800 rpm. Los capilares fueron cortados con

lápiz de diamante en la interfase glóbulos-plasma, y se observó dicho material entre porta y cubreobjetos, con objetivo de 40X.

Reacciones serológicas

Inmunofluorescencia (IF): Se utilizó la técnica descrita por Camargo modificada por Fruit y col³⁵, empleando un conjugado anti inmunoglobulinas totales humanas marcado con isotiocianato de fluoresceína y Azul de Evans como medio de contraste.

Hemaglutinación (HA): Se realizó la microtécnica en policubetas fondo en U, básicamente de acuerdo a lo descrito por Neal & Miles⁴⁰.

Enzaimunoenzima (ELISA): Se realizó esencialmente según lo descrito por Gea y col²⁸. Se sensibilizaron microplacas de poliestireno con 60 μl de los materiales antigénicos convenientemente diluidos en buffer carbonato pH = 9,6, incubando 24 horas 4°C . Posteriormente se lavaron las placas 3 veces con PBS conteniendo Tween 20 al 0,05% (PBS-T) y se bloquearon con 100 μl de PBS-T con albúmina sérica bovina al 2% (PBS-T-A). Luego, las placas lavadas se incubaron con los sueros controles y problemas diluidos con PBS-T-A, 60 minutos a 37°C . La unión Ag-Ac fue detectada por adición del conjugado (inmunoglobulinas de cabra anti inmunoglobulinas totales humanas, unidas a fosfatasa alcalina - Sigma Immunochemicals) (60 min), y posterior agregado del reactivo de color (p-nitrofenilfosfato, Sigma, diluido en buffer dietanolamina-cloruro de magnesio, pH = 9,8) (30 min). La reacción se frenó con NaOH 3N y

se leyeron la absorbancias a 405 nm en un fotómetro de lectura vertical (Labysistems Uniskan). Se determinaron los índices (I) como resultado de la relación:

$$I = \frac{\text{DO problema}}{\text{DO promedio controles (-)}}$$

Se consideraron positivos los sueros que mostraron índices iguales o mayores (\geq) a 2.

En todas las determinaciones serológicas se emplearon como controles sueros positivos (de títulos alto y bajo) y sueros negativos.

Test estadístico: Se utilizó el test z, para comparar proporciones de dos grupos independientes.

Resultados

Pacientes agudos

Los resultados obtenidos mediante serología convencional mostraron, como era de esperar, un alto porcentaje de resultados negativos (61%), una pequeña proporción de positivos (4%) y un 35% de discordantes, todos ellos con IF positiva.

Al ensayar la técnica de ELISA se obtuvo, empleando F 105, un 60% de resultados positivos. Con F III y con F IV se observó una positividad de 37 y 40% respectivamente.

Cuando se ensayaron los sueros de pacientes que fueron sometidos a tratamiento antiparasitario durante la etapa aguda de la infección se observó que, luego de dicho tratamiento, hubo una disminución en los niveles de Ac hacia cualquiera de los Ag estudiados. El grado de caída en los niveles de Ac fue diferente en cada paciente, pero la tendencia fue la misma en todos ellos. Los resultados, con F IV, se observan en la Fig. 2. Con los otros Ag se obtuvieron resultados similares (datos no presentados).

Pacientes crónicos G0 y G1

Mediante serología convencional, se observó una diferencia en el comportamiento de los sueros estudiados. En la Fig. 3 se representan los promedios de los títulos obtenidos por IF, para cada suero (los que fueron ensayados, como mínimo, por duplicado). Cuando dichos promedios estuvieron entre dos títulos, el criterio adoptado fue adjudicarle el valor más bajo. Como puede observarse, el 49% (22/45) de los sueros pertenecientes al G1 presentó títulos \geq 1:128 contra el 17% (7/41) de sueros del G0. Por el contrario, en los títulos iguales o menores (\leq) a 1:64 predominaron los sueros de G0 (83% (34/41) vs 51% (23/45)). Este corrimiento no fue detectado con la reacción de HA, donde hubo una

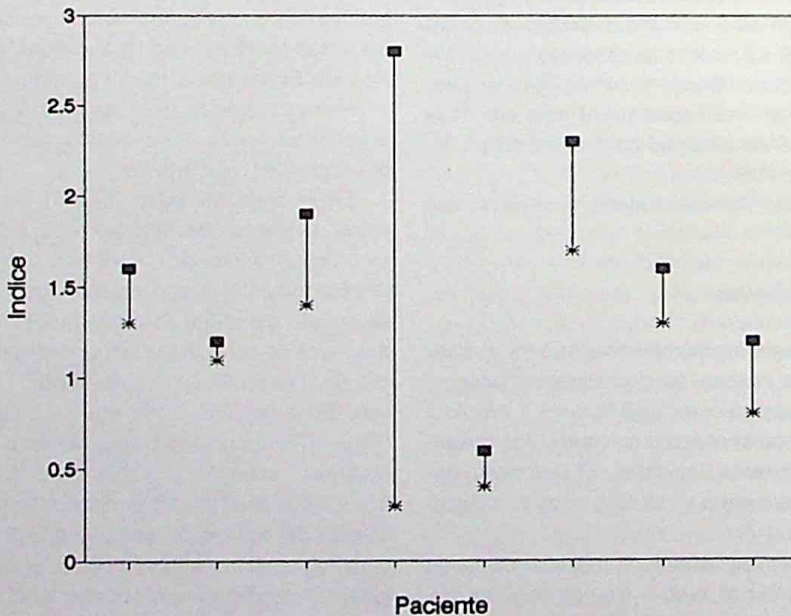


Fig. 2.— Variaciones por el tratamiento antiparasitario en los índices obtenidos mediante enzoinmunoanálisis con F IV, en pacientes con Enfermedad de Chagas aguda. (■): pretratamiento. (*): post tratamiento.

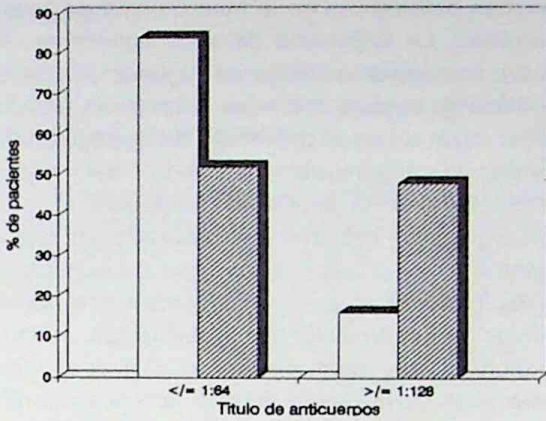


Fig. 3.— Distribución porcentual de pacientes con enfermedad de Chagas crónica pertenecientes a los grupos 0 (■) y 1 (▨), que presentaron títulos $\leq 1:64$ y $\geq 1:128$ mediante la técnica de inmunofluorescencia.

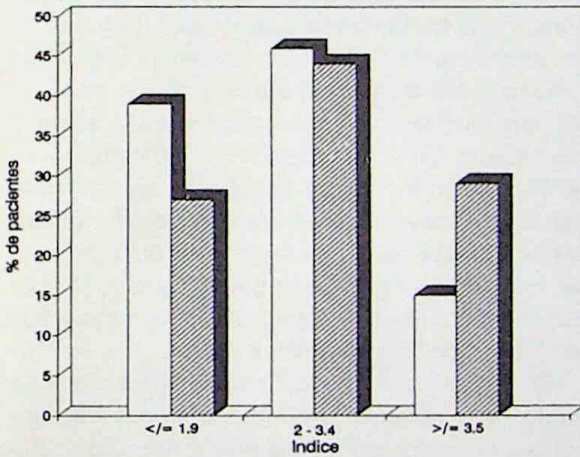


Fig. 4.— Distribución porcentual de resultados obtenidos por enzimoimmunoanálisis con F IV, en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas crónica pertenecientes a los grupos 0 (□) y 1 (▨),

superposición prácticamente total entre los dos grupos estudiados.

Al ensayar la técnica de ELISA, usando como Ag la fracción F IV (Fig. 4), se observó que 13 sueros (30%) pertenecientes al G1 mostraron índices altos comprendidos entre 3,5 y 6, con respecto a 6 sueros (15%) del G0. Por el contrario, en los índices menores a 1,9 predominaron los sueros pertenecientes a G0. Es de interés mencionar que todos los pacientes que mostraron ín-

TABLA 1.— Sueros de individuos pertenecientes a los grupos 0 y 1 que presentaron títulos $\geq 1:128$ por inmunofluorescencia, e índices $\geq 3,5$ por enzimoimmunoanálisis, empleando como antígenos F 105, F III y F IV.

Grupo	n	F 105	F III	F IV
G 0	41	4 (10%)	3 (7,3%)	2 (4,9%)*
G 1	45	5 (11%)	9 (20%)	10 (22,2%)*

* $p < 0,05$

dices mayores a 4 pertenecieron al G1. Por otra parte, F 105 y F III no permitieron observar ninguna diferencia entre grupos (datos no presentados.)

Cuando se tomaron en conjunto los resultados de IF y ELISA con los distintos Ag, se obtuvo la información resumida en la tabla 1. Como se puede observar, cuando se empleó el extracto crudo (F 105) como Ag, no hubo diferencias en los resultados obtenidos en G0 y G1. Con F III se observó una tendencia de los sueros del G1 a presentar mayores niveles de Ac por las dos metodologías. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Por último, empleando F IV, se detectó una diferencia significativa entre ambos grupos ($p < 0,05$). En efecto, el 22% de los sueros presentó títulos elevados por ambas reacciones, mientras que sólo 2 sueros (4,9%) del G0 presentaron esta característica (se consideraron títulos elevados: para IF $\geq 1:128$, y para ELISA índices $\geq 3,5$).

Discusión

Del presente trabajo es posible extraer algunas conclusiones de potencial interés diagnóstico. En primer lugar, llama la atención la elevada sensibilidad que se obtuvo mediante la reacción de ELISA empleando F 105 como antígeno. En efecto, este método permitió detectar anticuerpos anti *T. cruzi* en el 60% de los pacientes agudos, la mayoría de los cuales presentó resultados negativos o discordantes por HA e IF.

Con respecto a la respuesta de Ac hacia Ag crudos y semipurificados del *T. cruzi* en pacientes crónicos asintomáticos y cardíopatas se observó una tendencia de estos últimos (G1) a presentar mayores niveles de Ac contra el *T. cruzi*,

mediante la técnica de IF. Es importante señalar que esta es una tendencia que no se verifica necesariamente con cada muestra individual. Por otra parte, aunque la diferencia en los picos de positividad no es marcada, refleja los resultados obtenidos a doble ciego y en determinaciones realizadas, como mínimo, por duplicado. Estos resultados sugieren que pueden existir diferencias en la respuesta de Ac entre los individuos chagásicos, según presenten o no cardiopatía, y que tales diferencias podrían estar inducidas por Ag de superficie, ya que sólo fueron visibles por IF.

Mediante la técnica de ELISA se observó también que algunos cardiópatas presentaron características diferenciales en su repertorio de Ac. Esta diferencia fue visible sólo cuando se emplearon las fracciones acídicas, fundamentalmente F IV. Por el contrario, los resultados obtenidos con el extracto crudo (F 105) fueron indistinguibles de los que mostraron los individuos de G0. Esta tendencia de los pacientes cardiópatas a presentar mayores niveles de Ac hacia ciertas fracciones antigénicas ya fue comunicada por Gea y col., en un grupo de individuos chagásicos analizados frente a Ag semipurificados por isoelectroenfocado²⁸. Utilizando distintas estrategias metodológicas, otros autores^{27, 29} también encontraron diferencias cuali y cuantitativas en el repertorio de Ac de los pacientes asintomáticos y sintomáticos. El método empleado en el presente trabajo permite la purificación a escala preparativa, potenciando su posible utilización para la preparación de reactivos diagnósticos.

Analizando conjuntamente los resultados de IF y ELISA (Tabla 1) fue posible observar más claramente las tendencias mencionadas anteriormente. En efecto, se observó una diferencia significativa a favor del G1 en el número de pacientes que mostraron niveles elevados de anticuerpos por IF y por ELISA con F IV.

Se desconocen los factores determinantes de que en un alto porcentaje de infectados el parásito se comporte como un comensal no patógeno y, en cambio, en el resto provoque lesiones de distinta magnitud en corazón o aparato digestivo. Hasta el momento no es posible determinar si un individuo infectado va a desarrollar o no manifes-

taciones patológicas en la fase crónica de la enfermedad. La existencia de altos niveles de Ac contra fracciones acídicas en algunos pacientes cardiópatas sugiere que tales Ac podrían desempeñar algún rol en el desarrollo de la cardiopatía, aportando argumentos a favor del origen autoinmune de la patología chagásica^{11, 12}. Sin embargo, esto debería ser analizado en seguimientos longitudinales, a los fines de conocer la evolución de dichos Ac y su posible correlación con los parámetros clínicos, radiológicos, electrocardiográficos y hemodinámicos. Por otra parte, resta analizar la causa de que la tendencia observada no se verifique en la totalidad de los pacientes del G1. Sería también de interés conocer lo que ocurre con sueros provenientes de chagásicos con alteraciones cardíacas más severas (grupos 2 y 3). Hasta el momento se han ensayado sólo algunos sueros de tales grupos, lo que no permite extraer conclusiones valederas.

En resumen, se puede concluir, en primer lugar, que la reacción de ELISA con F 105 puede brindar una herramienta diagnóstica adicional, no solamente para aumentar la sensibilidad del inmunodiagnóstico en el periodo agudo de la infección, sino también como control de la eficacia terapéutica. En la infección crónica, por otra parte, la fracción F IV es la que puede brindar información de mayor interés, ya que permite observar una tendencia de los sueros del G1 a presentar mayores niveles de anticuerpos que los del G0, tendencia que se intensifica al combinar sus resultados con los obtenidos por IF.

En definitiva, la mayor información se obtuvo mediante la conjugación de los métodos tradicionales y el uso de antígenos semipurificados. Quizás, como ocurre con otras enfermedades infecciosas, el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas podría realizarse, en un primer paso, mediante técnicas convencionales, altamente sensibles, operativamente sencillas y de gran difusión entre quienes realizan el estudio y quienes deben interpretar sus resultados. Posteriormente, la utilización de antígenos purificados, recombinantes o péptidos sintéticos, podría aportar mayor especificidad e información adicional sobre la relación infección-enfermedad.

Summary

Chagas disease. Serologic response to crude and semipurified T. cruzi antigens in different clinical groups of patients

The immune response of people infected by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* varies in indeterminate or chronic periods of infection, according to the course of the disease. Apparently, the antibody pattern is different in asymptomatic patients than in patients with cardio-myopathy. The study of those differences for clinical purposes depends on the availability of adequate antigenic preparations. We studied the behavior of crude and partially purified antigens of *T. cruzi* in acute and chronically infected patients. The level of total antibodies was measured by conventional serology (indirect immunofluorescence, IF, and indirect hemagglutination, HA) and the level of antibodies against different fractions of antigens obtained by analytical chroma-tofocusing, by using enzymatic immunoassay (ELISA). Chronic patients were classified according to Kuschnir et al.²⁴ in: Group 0 (G0) or Group 1 (G1) according to the absence or presence of electrocardiographic alterations. In acute patients, conventional serology was negative in most cases. However, the ELISA performed with the soluble fraction of the lysate of parasites, showed positive results in 60% of patients. By classical serology, the behavior of chronic patients sera was different in the two groups when assayed by IF; G1 showing more elevated titles than G0. On the other hand, by HA the results were similar in both groups. When the sera were studied by ELISA using the different fractions, the fraction collected at pH 4-4.5, named F IV, detected distinct reactivity in some of, but not in all, the patients of G1. In that subgroup, the highest ELISA index (optical density of sera vs OD of negative controls) was observed. By associating IF plus FIV-ELISA the results became more apparent: 22% of sera showed titles by IF equal or more than 1:128 and ELISA index equal or more than 3.5, whereas only 2% of G0 showed this characteristic and all the sera with index equal or more than 4 belonged to G1. With lesser antibody titles it was not possible to differentiate between the two groups. It can be concluded that the study of the pattern of antibodies by using different antigens and serological methodologies can offer useful information in the different periods of Chagas disease, by adding the higher sensitivity of methods using crude antigens with the more specific and discriminative results obtained by the use of purified or synthetic antigens.

Agradecimientos: Al Dr. Oscar Ledesma y al Dr. Gustavo Barbieri, del Centro de Chagas y Patología Regional de Santiago del Estero, por la realización del diagnóstico clínico y de laboratorio de los pacientes agudos y por la provisión de los sueros de dichos pacientes.

Fuentes de financiación: Servicio Nacional de Chagas, Secretaría de Ciencia y Técnica de la Pcia. de Córdoba (SECYTECOR), Asociación de Bioquímicos de la Ciudad de Córdoba, Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Pcia. de Córdoba (CONICOR).

Bibliografía

1. Beltz L, Szein M, Kierszenbaum F. Novel mechanism for *T. cruzi* induced suppression of human lymphocytes. *J Immunol* 1988; 141:289-94.
2. Cunningham D, Khun E, Rowland C. Suppression of humoral responses during *T. cruzi* infection in mice. *Infect Immun.* 1978; 22: 155-60.
3. Harel-Bellan A, Joskowicz E, Fradelizi D, Elsen H. Modification of T cell proliferation and IL-2 production in mice infected with *T. cruzi*. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 80: 3466-9.
4. Kierszenbaum F. On evasion of *T. cruzi* from the host immune lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic experimental Chagas' disease. *Immunology* 1981; 44: 641-8.
5. Kierszenbaum F, Moretti E, Szein M. Molecular basis of *T. cruzi* induced immunosuppression. Altered expression by activated human lymphocytes of molecules with regulate antigen recognition and progression through the cell cycle. *Biol Res* 1993; 26: 197-207.
6. Liew F, Scott M, Liu D, Croft L. Suppressive substance produced by T cell from mice chronically infected with *T. cruzi*. I. Preferential inhibition of delayed type hypersensitivity. *J Immunol* 1987; 139: 2452-7.
7. Texeira A, Texeira G, Macedo V, Prata A. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. *J Clin Invest* 1978; 62: 1132-41.
8. Voltarelli J, Donadio E, Falcao R. Immunosuppression in human acute Chagas disease. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 169-70.
9. Gruppi A, Gea S, Moretti E, Vottero-Cima E. Human antibodies against *T. cruzi* exoantigens recognizing parasite surface antigens and heart tissue components. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 90: 119-23.
10. Hudson L. Autoimmune phenomena in chronic chagasic cardiopathy. *Parasitol Today* 1985; 1: 6-9.
11. Snacy D, Flint JE, Wood JN, et al. A monoclonal antibody with specificity for *T. cruzi* central and peripheral neurones and glia. *Clin Exp Immunol* 1983; 54: 617-24.
12. Szarfman A, Terranova VP, Rennard SI, et al. Antibodies to laminin in Chagas' disease. *J Exp Med.* 1982; 155: 1161-9.

13. Andrade S, Stocker S, Pimentel S, Grimaud A. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *T. cruzi*, under specific chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86: 187-200.
14. Ben Jounes-Chennoufi A, Hontebeyre-Joskowicz M, Tricottet U, Eisen H, Reynes M, Said G. Persistence of *T. cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 77-83.
15. Jones E, Coley D, Tostes S, Lopes E, Unencak C, McCurley L. Amplification of a *T. cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 48: 348-57.
16. Andrade Z. Pathogenesis of Chagas'disease. *Res Immunol* 1991; 142: 126-9.
17. Minoprio P, Coutinho A, Spinella S, Hontebeyre J. Xid immunodeficiency imparts increased parasite clearance and resistance to pathology in experimental Chagas' disease. *Inf Immunol* 1991; 3: 427-33.
18. Tarleton R, Koller B, Latour A, Postan M. Susceptibility of beta-2-microglobulin-deficient mice to *T. cruzi* infection. *Nature* 1992; 356: 338-40.
19. Cossio PM, Bustuobad O, Paterno E, et al. Experimental myocarditis induced in Swiss mice by homologous heart immunization resembles chronic experimental Chagas' disease. *Clin Exp Immunol* 1984; 33: 165-75.
20. Wood J, Hudson L, Jessell M, Yamamoto M. A monoclonal antibody defining antigenic determinant on subpopulations of mammalian neurones and *T. cruzi* parasites. *Nature* 1982; 296: 34-8.
21. Barcklay C, Cerisola J, Lugones H, Ledesma O, Lopez Silva J, Moura G. Aspectos farmacológicos y resultados terapéuticos del Benznidazol en el tratamiento de la infección chagásica. *Prensa Med Argent* 1978; 65: 239-44.
22. Bocca Tourres C. La Enfermedad de Chagas en el período agudo y su tratamiento con BAY 2502. *Bol Chil Parasitol* 1969; 24: 24-7.
23. Cerisola J, Fatala Chaben N, Lazzari J. Evolución serológica de pacientes con Enfermedad de Chagas aguda tratados con BAY 2502. *Bol Chil Parasitol.* 1969; 24: 54-9.
24. Cerisola J, Fatala Chaben N, Lazzari J, Lugones H, Ravinovich L. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas. 1972. 6° Premio Científico E. Antonio Rizzuto.
25. Moya P, Paolasso R, Blanco S, et al. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas con Nifurtimox durante los primeros meses de vida. *Medicina (Buenos Aires)* 1985; 45: 553-8.
26. Cervetta L, Basso B, Moretti E, Castro I, Santamarina N. Estudio del perfil inmunológico en la Enfermedad de Chagas crónica. *Presencia Bioquímica.* 1993; 144: 9-15.
27. Avila Reis D, Gazzinelli R, Gazzinelli G, Colley D. Antibodies to *T. cruzi* express idiotypic patterns that can differentiate between patients with asymptomatic or severe Chagas' disease. *J Immunol* 1993; 150: 1611-8.
28. Gea S, Rodriguez P, Vottero-Cima E. Characterization of *T. cruzi* antigens recognized by sera from patients with chronic Chagas' disease. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 84: 410-13.
29. Levin M. et al. Identification of major *T. cruzi* antigenic determinant in chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 530-8.
30. Sadigursky M. et al. Association of elevated antiscarolema and antiidiotypic antibodies levels with the clinical and pathologic expression of chronic Chagas' myocarditis. *Circulation* 1989; 80: 1269-76.
31. Ternynck T, Bleur C, Gregoire J, et al. Comparison between autoantibodies arising during *T. cruzi* infection in mice and natural autoantibodies. *J Immunol* 1990; 14: 1504-11.
32. Kuschnir E, Vives J, Sgammini H, Kinkelstein C, Rivas J, Santamarina N. Valoración de la reserva cardíaca en pacientes chagásicos. *Rev Fed Arg Cardiol* 1979; 8: 8-35.
33. Basso B, Moretti E, Domínguez M. Cultivo de *T. cruzi* en medio monofásico con aireación para la obtención de antígenos. *Medicina (Buenos Aires)* 1980; 4: 428-32.
34. Fruit J, Afchain D, Petitprez A, Capron A. *T. cruzi* location of specific antigen of the surface of bloodstream trypomastigote and culture forms. *Expt Parasitol* 1978; 45: 183-9.
35. Boyden S. The absorption of protein on the erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J Exper Med* 1951; 93: 107-11.
36. Sluyterman L, Wijdenes J. Chromatofocusing: Isoelectricfocusing on ion exchanger. I. General principles. *J Chromatogr* 1978; 150: 17-30.
37. Sluyterman L, Wijdenes J. Chromatofocusing: Isoelectricfocusing on ion exchanger. II. Experimental verification. *J Chromatogr* 1978; 150: 31-5.
38. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin Fenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
39. Woo P. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomiasis in blood. *Can J Zool* 1969; 47: 921-4.
40. Neal R, Miles R. Indirect hemagglutination test for Chagas' disease with a simple method for survey work. *Rev Med Trop. Sao Paulo* 1970; 12: 325-8.