

## DEPOSIÇÃO DE COMPLEXOS IMUNES NA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL (\*)

Júnia CHAVES (1), Olisnei Nascimento MARIANO (1), Hertha B. W. Telles de SOUZA (1), Ione IRULEGUI (2) e Celidéia A. Coppi VAZ (3)

### RESUMO

Vinte e cinco camundongos SW, inoculados com  $10^5$  tripomastigotas da cepa FL do *Trypanosoma cruzi*, foram sacrificados após 5, 10 e 14 dias, e 3 e 6 meses, bem como 27 animais controles. Fragmentos de coração foram congelados a  $-170^\circ\text{C}$  e conservados a  $-70^\circ\text{C}$  até o uso. Cortes destes fragmentos, feitos em criostato, foram submetidos à imunofluorescência direta com anti-soros conjugados com isotiocianato de fluoresceína: anti- $\gamma$  globulina, anti-IgG, anti-IgM e anti- $\text{C}_3$  de camundongos. Foi usado também soro hiperimune anti-antígenos do *T. cruzi* presentes nos imune complexos circulantes (IC), preparado em camundongos SW adultos, através de inoculações sucessivas dos IC precipitados com polietilenoglicol. A partir do 10.<sup>o</sup> dia de infecção, houve nítida deposição de antígenos do *T. cruzi*, IgG e  $\text{C}_3$ , nas paredes das pequenas artérias do coração.  $\text{C}_3$ , IgG e antígenos parasitários localizaram-se também, além de IgM, na zona perivascular e no interstício entre as fibras cardíacas, principalmente nas áreas de destruição celular. Nos animais em fase crônica igualmente verificamos deposição de antígenos parasitários, IgG e  $\text{C}_3$ , nos vasos. A localização de  $\text{C}_3$ , IgG e IgM no interstício foi menos pronunciada que nos camundongos em fase aguda; antígenos do *T. cruzi* não foram detectados nesta região durante a fase crônica.

### INTRODUÇÃO

Lesões sugestivas de mecanismos patogênicos envolvendo deposição de complexos imunes, tais como arterites necrotizantes, foram referidas há anos, em pacientes na fase crônica da Doença de Chagas, por BRITO & VASCONCELOS<sup>3</sup>, e em animais de laboratório por OKUMURA & col.<sup>11</sup>.

Recentemente demonstramos que os antígenos liberados pelo *Trypanosoma cruzi* na circulação de camundongos infectados com a cepa FL formam complexos imunes solúveis, circulantes (IC), capazes de reagirem com o primeiro componente,  $\text{C}_1\text{q}$ , do Complemento

humano (C)<sup>4</sup>. Demonstramos também que a conversão do componente  $\text{C}_3$  do C é acentuada em camundongos na fase aguda da infecção e moderada nos animais em fase crônica, sugerindo que um dos prováveis fatores de ativação do C, nesta última fase, sejam IC depositados nos tecidos<sup>6</sup>.

Neste trabalho procuramos constatar deposição de IC em tecidos, ou seja, a deposição conjunta de antígenos do *T. cruzi*, imunoglobulinas e  $\text{C}_3$  numa mesma estrutura, que pudesse explicar as lesões referidas pelos Autores anteriormente mencionados.

(\*) Financiado pelo CNPq (PDE — 08-01-13)

(1) Laboratório de Parasitologia — Instituto de Medicina Tropical de São Paulo — USP, Brasil

(2) Laboratório de Imunopatologia — Instituto de Medicina Tropical de São Paulo — USP

(3) Centro de Pesquisas Imunoquímicas — Instituto de Ciências Biomédicas — USP

## MATERIAL E MÉTODOS

**T. cruzi** — Foi usada a cepa FL do **T. cruzi**, isolada por BRENER em 1965<sup>2</sup>, mantida em nosso laboratório em camundongos SW, com passagens através de vectores a cada 6 meses.

**Animais** — Vinte e cinco camundongos, SW, machos de 20-25g de peso foram inoculados por via intra-peritoneal com 10<sup>5</sup> tripomastigotas da cepa FL do **T. cruzi**, provenientes de animais no sexto repique após passagem por triatomíneos. Depois de 5, 10 e 14 dias, e 3 e 6 meses, grupos formados por 5 animais infectados, bem como 27 controles de mesmo sexo e peso, foram sacrificados. Fragmentos de coração, de todos os animais, foram congelados rapidamente a -170°C e conservados até o uso, a -70°C.

**Imunofluorescência direta** — Cortes dos fragmentos de coração feitos em criostato (-20°C), de maneira seriada, foram submetidos à imunofluorescência direta (ID), seguindo-se para tal técnica referida por NAKAMURA<sup>10</sup>. Cinco soros hiperimunes, marcados com isotiocianato de fluoresceína, foram utilizados nas reações de ID, sendo 2 deles, anti-IgG e anti-IgM de camundongo, adquiridos comercialmente (Miles, Yeda Research Co.). Anti- $\gamma$  globulina e anti-C<sub>3</sub> de camundongo foram preparados em coelhos, de acordo com os métodos de FERRI<sup>5</sup> e MARDINEY & MÜLLER-EBERHARD<sup>8</sup>, respectivamente. Anti-antígenos do **T. cruzi** foi obtido por imunização de camundongos SW, adultos, com doses sucessivas de IC precipitados do soro de outros camundongos SW, infectados 10 dias antes com 10<sup>5</sup> tripomastigotas da cepa FL; antes da precipitação e concentração dos IC com Polietilenoglicol 6.000 (Sigma Chemical Co.) na concentração final de 4% (V/V), a mistura de soros foi filtrada em "Milipore" (0,2  $\mu$ m), para eliminar parasitas circulantes.

Anti- $\gamma$  globulina, anti-C<sub>3</sub> e anti-antígenos do **T. cruzi**, foram parcialmente purificados por precipitação com sulfato de amônio a 45% de saturação. Anti-C<sub>3</sub> foi absorvido com mistura de soros de camundongos depletados de C<sub>3</sub> pelo fator do veneno da cobra *Naja naja*, previamente purificado de acordo com método de MÜLLER-EBERHARD & FJELLSTRÖM<sup>9</sup>.

Todos os anti-soros utilizados, incluindo-se os comercialmente adquiridos, foram absorvidos antes do uso com pó de fígado bovino, de

acordo com metodologia recomendada também por NAKAMURA<sup>10</sup>.

## RESULTADOS

No grupo de animais sacrificados no 5.º dia após inoculação apenas 2 apresentaram reações de ID duvidosas. Porém a partir do 10.º dia de infecção, verificamos nítida deposição de antígenos do **T. cruzi**, IgG e C<sub>3</sub> nas camadas endotelial, média e adventícia das pequenas artérias do coração, em todos os animais sacrificados no 10.º e 14.º dia após inoculação (Fig. 1).

O componente C<sub>3</sub> do Complemento, IgG e antígenos do parasita, além de IgM, localizam-se também na região perivascular e no interstício entre as fibras cardíacas (Figs. 2 e 3), principalmente nas áreas onde havia parasitismo e destruição da musculatura, vistos em cortes corados com Giemsa e Hematoxilina-eosina.

Os 10 animais em fase crônica da doença (3 e 6 meses) também apresentaram deposição de antígenos parasitários, IgG e C<sub>3</sub> nas diferentes camadas da parede dos vasos (Fig. 4). A presença de IgG, IgM e C<sub>3</sub> na região perivascular e interstício foi menos extensa e de menor intensidade que a observada em camundongos em fase aguda. Na fase crônica os antígenos do parasita localizaram-se apenas nos vasos, não tendo sido vistos no interstício.

Todos os animais infectados, com exceção daqueles do grupo sacrificado após 5 dias, apresentaram ID positiva para  $\gamma$  globulina. Todos os 27 controles foram negativos às reações de ID, feitas com os 5 anti-soros referidos.

## DISCUSSÃO

A formação de IC "in vivo" é parte integral da resposta imune normal e, sob circunstâncias fisiológicas, o próprio IC pode estimular mecanismos para sua eliminação, resultando daí um equilíbrio dinâmico entre formação e eliminação<sup>12</sup>. Em outras situações, devido a diversos fatores, os IC podem depositar-se e desencadear lesões; localizam-se nas diferentes camadas dos vasos, sendo bastante eficientes como fator ativador do C, principalmente se formados em excesso de anticorpo<sup>1</sup>. Através da ativação do C os IC levam à formação de pelo menos, dois tipos de mediadores da resposta inflamatória aguda: fatores quimiotáticos para neutrófilos e possivelmen-

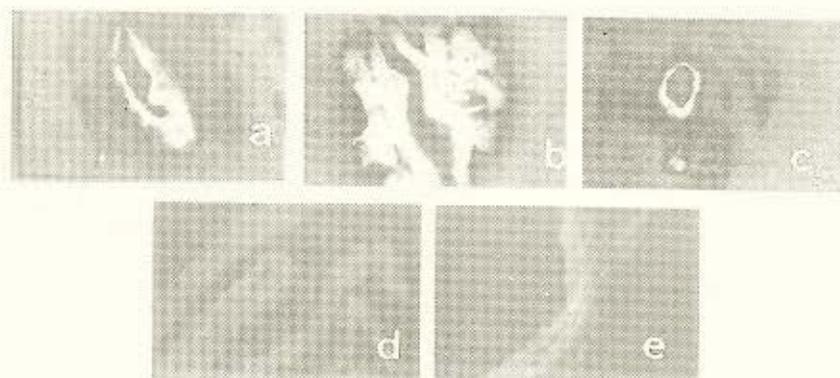


Fig. 1 — Deposição de IC na parede de pequenas artérias do coração de camundongo na fase aguda da Doença de Chagas experimental (10 dias de infecção). ID ( $\pm 500 \times$ )  
a = Antígenos do *T. cruzi*  
b = IgG  
c = C<sub>3</sub>  
d = Aspecto de corte de coração de camundongo controle submetido à ID com soro hiperimune anti-antígenos do *T. cruzi*  
e = Idem, com anti-C<sub>3</sub>

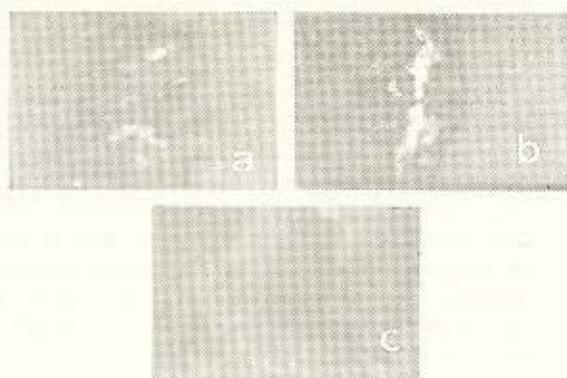


Fig. 2 — Localização de antígenos do *T. cruzi* e IgG no interstício do coração de camundongo infectado há 14 dias. ID ( $\pm 500 \times$ )  
a = Antígenos parasitários  
b = IgG  
c = Aspecto de corte de coração de camundongo controle submetido à ID com soro hiperimune anti-antígenos do *T. cruzi*



Fig. 3 — Localização de IgM no interstício do coração de camundongo infectado há 10 dias. ID ( $\pm 500 \times$ )

te macrófagos e fatores anafilatóxicos que atuando sobre basófilos circulantes e mastócitos teciduais provocam liberação do fator de agregação de plaquetas e da histamina ou serotonina, de acordo com a espécie<sup>7</sup>.

Desta maneira, verdadeira cascata de interações celulares e moleculares pode ser induzida pelos IC, cujo resultado final é o aumento da permeabilidade vascular e "engasgamento"

de outros IC na parede dos vasos. O conjunto dos mecanismos responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular pode representar maneira adequada para remover IC da circulação; no entanto, na dependência da proporção existente entre antígeno-anticorpo, concentração de ambos, classe e subclasse do anticorpo, força de ligação entre antígeno e anticorpo, tamanho, forma e carga do IC, bem como da capacidade para intercalar o fragmento C<sub>3b</sub> no látice an-



Fig. 4 — Deposição de IC em camundongo na fase crônica da Doença de Chagas experimental (160 dias de infecção)

a = Deposição de antígenos do *T. cruzi* nas paredes de pequena artéria do coração

b = Idem, de IgG

c = Idem, de C<sub>3</sub>

tígeno-anticorpo, os IC podem depositar-se de forma maciça, provocando o aparecimento de lesões e de "doença por imune complexo".

Esta parece ser a situação dos animais da presente experiência, pois, dos 25 camundongos infectados apenas 5 (com 5 dias de infecção) não apresentaram deposição maciça de IC. Nos demais praticamente todos os vasos presentes num mesmo corte mostraram os componentes imunes do IC. Fator importante no desencadeamento desta "doença por imune complexo" nos nossos animais, deve ter sido a dose de tripomastigotas inoculada ( $10^5$ ), quantidade esta certamente muito elevada, quando comparada à situação que acredita-se ocorrer quando da infecção humana. Não obstante cremos que os IC possam ser causadores das lesões referidas pelos Autores já citados anteriormente, mesmo em infecções naturais onde a carga parasitária inicial deve ser pequena pois, a capacidade para depositar, ativar C e produzir lesões está ligada a vários fatores e não somente à concentração dos componentes do IC.

A deposição de C<sub>3</sub> no interstício entre as fibras cardíacas, mais intensa ao redor das zonas de destruição celular, indica nos nossos animais, participação precoce deste componente na formação do infiltrado inflamatório que ocorreu nestas áreas durante a fase aguda.

Na fase crônica os animais estudados continuaram a mostrar deposição de IC nos vasos e, em menor extensão e intensidade C<sub>3</sub> no interstício. Esses dados sugerem por um lado, participação discreta deste componente na fibrose e inflamação crônica e pelo outro, a continuidade ou talvez mesmo, a perpetuação da deposição de IC, na medida em que a doença progride.

## SUMMARY

### Deposition of immune complex in experimental Chagas' disease

Twenty-five SW mice infected with  $10^5$  trypanomastigotes of the FL strain of *T. cruzi* were sacrificed 5, 10 and 14 days, 3 and 6 months after inoculation, as well as 27 controls.

Pieces of heart were frozen at  $-170^{\circ}\text{C}$  and maintained at  $-70^{\circ}\text{C}$  till the use. Criostat sections were submitted to direct immunofluorescence with 5 antisera conjugated with fluorescein: anti-mouse  $\gamma$  globulin, anti-mouse IgG, anti-mouse IgM, anti-mouse C<sub>3</sub> and anti *T. cruzi* antigens present in the circulating immune complex (IC). The last antiserum was raised in adult SW mice by inoculation of IC precipitated with Polyethyleneglicol.

Deposition of *T. cruzi* antigens, IgG and C<sub>3</sub> in the capillary and small arteries' walls was clearly evident in animals sacrificed after 10 days of infection. C<sub>3</sub>, IgG, IgM and parasitic antigens were also seen in the perivascular and interstitial areas mainly in foci of cellular destruction.

Animals in the chronic phase of disease presented in a similar way deposition of parasitic antigens, C<sub>3</sub> and IgG in their heart vasculature. In these mice deposition of C<sub>3</sub>, IgG and IgM in the interstitial areas was less pronounced than in mice in the acute phase of the disease. Parasitic antigens were not found in interstitial areas during the chronic phase.

## AGRADECIMENTO

Aos integrantes do Laboratório de Cirurgia Experimental da FMUSP pelas facilidades e contradas para a utilização dos equipamentos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENVENISTD, J. & MENCIA-HUERTA, J. M. — Mechanisms of Immune Complex tissue injury. Abstract: 4th. European Immunology Meeting. Budapest, 1978. "In vivo significance of Immune Complexes", p. 16.
2. BRENER, Z. — Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. & Parasitol.* 59: 19-26, 1965.
3. 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.
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.
5. FERRI, R. G. — Mieloma. [Tese de livre docência]. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 1974.
6. 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.
7. JEFFREY, H. H. & WARD, P. A. — The phlogistic role of C<sub>3</sub> leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J. Exp. Med.* 133: 885-900, 1971.
8. MARDINEY, M. R. & MÜLLER-EBERHARD, H. J. — Mouse  $\beta_2C$  globulin: production of antiserum and characterization in the Complement reaction. *J. Immunol.* 94: 877-882, 1965.
9. MÜLLER-EBERHARD, H. J. & FJELLSTRÖM, K. F. — Isolation of the anti complementary protein from cobra venom and its mode of action on C<sub>3</sub>. *J. Immunol.* 107: 1666-1672, 1972.
10. NAKAMURA, R. M. — *Immunopathology: Clinical Laboratory Concepts and Methods*. First Edition. Boston, Ed. Little Brown and Company, 1974. "Fluorescent antibody methods", p. 620.
11. OKUMURA, M.; BRITO, T.; PEREIRA DA SILVA, L. H.; CARVALHO DA SILVA, A. & CORRÊIA NETTO, A. — The pathology of experimental Chagas' disease in mice: I — Digestive tract changes with a reference to necrotizing arteritis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 2: 17-28, 1960.
12. RAJNAVÖLGYI, E.; FÜST, G.; KULICS, J.; EMBER, J.; MEDGYESI, G. A. & GERGELY, J. — The effect of immune complex composition on Complement activation and Complement dependent complex release. *Immunochemistry* 15: 887-894, 1978.

Recebido para publicação em 28/1/1981.