

## ESTUDO IMUNOCITOQUÍMICO DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

Zilton A. ANDRADE e Sonia G. ANDRADE

### RESUMO

O emprêgo da técnica de Coons com anticorpos fluorescentes permitiu demonstrar que os ninhos de leishmânia presentes em vários órgãos de camundongos contêm antígeno ao qual se fixam especificamente os anticorpos circulantes presentes em portadores humanos da doença de Chagas. A presença de células produtoras de gamaglobulina, provávelmente anticorpos contra o *T. cruzi*, foi vista em vários órgãos do animal infetado especialmente no baço. A participação de uma reação antígeno-anticorpo no organismo do hospedeiro deve ocorrer durante a rotura do ninho parasitário.

### INTRODUÇÃO

A técnica de COONS<sup>3</sup> com anticorpos fluorescentes já tem sido ensaiada com finalidade diagnóstica na doença de Chagas. Os primeiros estudos neste sentido foram feitos por FIFE & MUSCHEL<sup>4</sup>, que utilizaram formas de cultura do *T. cruzi* como antígenos, para evidenciar por meio de reação de fluorescência a presença de anticorpos no sôro de pacientes chagásicos. Outros Autores têm também estudado o método de fluorescência empregando formas de cultura ou formas sanguíneas como antígenos, em lâminas<sup>2, 6</sup>. Todavia, o método ainda não foi empregado com a finalidade de se investigar a distribuição de antígeno e anticorpos (gamaglobulina) nos tecidos dos animais infetados pelo *T. cruzi*.

Em 1965 SAINT MARIE<sup>5</sup> introduziu uma modificação à técnica de COONS com anticorpos fluorescentes que permitiu sua aplicação em secções de tecidos previamente fixados e incluídos em parafina. Como disse o Autor, esta modificação precisa ser ensaiada para cada tipo especial de pesquisa, pois nem sempre se mostra adequada. Em

vista de termos obtido excelentes resultados com a modificação proposta por SAINT MARIE, resolvemos estudar através a técnica da imunofluorescência, o comportamento de antígenos e anticorpos nos tecidos de camundongos infetados pelo *T. cruzi*. Sabendo da grande importância que os fatores imunitários parecem ter na patogenia da doença de Chagas, um estudo desta ordem nos pareceu importante como passo preliminar para a exploração dos aspectos imunopatológicos desta doença.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados camundongos brancos cujo pêso variava de 15 a 18 g experimentalmente infetados pelo *T. cruzi*, em dois grupos, um dos quais inoculado com a cepa Y do *T. cruzi* e outro com a cepa colombiana. Os inóculos variaram entre 45.000 e 250.000 tripanosomas. Os animais infetados com a cepa Y foram sacrificados com 10, 12 e 27 dias após a inoculação, enquanto os infetados pela cepa colombiana foram sacrificados com 30, 45 e 75 dias.

Após o sacrifício dos animais por secção da aorta abdominal, fragmentos de coração, baço, músculo esquelético e intestinos foram imediatamente fixados em álcool etílico absoluto, à temperatura de 4°C e incluídos em parafina, de acordo com técnica descrita por SAINT MARIE<sup>5</sup>. Camundongos controles intatos foram sacrificados simultaneamente e submetidos aos mesmos processos. As secções obtidas, de 5 micra de espessura, foram divididas em dois grupos: a) para demonstração de gamaglobulina nos tecidos as secções foram tratadas por um conjugado fluoresceínado anti-globulina do camundongo (\*) após lavagem em salina tamponada e com fixação posterior em álcool etílico a 4°C; b) para demonstração de antígenos nos tecidos (leishmânias), as secções foram tratadas por soro de paciente chagásico (reação de Machado-Guerreiro fortemente reagente) e depois de lavadas em salina tamponada (pH = 7,2) foram submetidas a tratamento por um conjugado fluoresceínado de anti-globulina humana (\*\*). Secções controles foram submetidas a tratamento apenas com a anti-globulina humana fluoresceínada sem tratamento prévio pelo soro de paciente chagásico. Secções de tecidos de animais controles intatos foram submetidos aos mesmos métodos.

As secções montadas em glicerina neutra tamponada foram examinadas em microscópio ZEISS com luz ultra-violeta obtida de lâmpada Osram 200 com dois filtros excitadores BG 12 e filtros barreira OG 5.

As fotografias foram obtidas com filme Ektachrome "highspeed" e posteriormente convertidas em preto e branco. As secções observadas sob luz ultra-violeta e que mostraram fluorescência específica verde maçã, foram subsequentemente lavadas e coradas pela hematoxilina e eosina de maneira usual, para identificação das estruturas ao microscópio comum.

## RESULTADOS

A) *Pesquisa de anticorpos* — O estudo permitiu visualizar células com fluorescência específica citoplasmática e com morfologia de células da linhagem plasmocitária, principalmente nos animais infetados pela *cepa*

*colombiana*, em que a reação plasmocitária foi mais evidente. Assim, células contendo anticorpos, positivas pelo tratamento com a gamaglobulina fluoresceínada anti-camundongo, foram vistas especialmente no baço, no tecido adiposo da base do coração, no interstício muscular, em torno de vasos e formando bainha em torno de nervo. Nos animais infetados pela *cepa Y*, em que a pólpa vermelha do baço mostrava nos cortes pela hematoxilina e eosina densa infiltração por células basófilas, as células fluorescentes apareciam esparsas, em pequeno número.

B) *Pesquisa de antígeno* — Os ninhos de leishmânias apareciam com intensa fluorescência específica e foram observados no coração, no baço, nos músculos esqueléticos, no tecido adiposo e em gânglios linfáticos. No interstício dos ninhos parasitários, o material amorfo entre as leishmânias mostrava densa e intensa fluorescência específica verde maçã. Além dos ninhos parasitários as secções tratadas para demonstração de antígeno por vezes mostravam algumas áreas ou células isoladas com fluorescência específica. Estas estruturas não puderam ser seguramente identificadas após coloração pela hematoxilina e eosina, mas em um caso foram identificadas quatro células agrupadas ao nível da submucosa do esôfago, parecendo tratar-se de macrófagos contendo antígenos ou de elementos do plexo de Meissner.

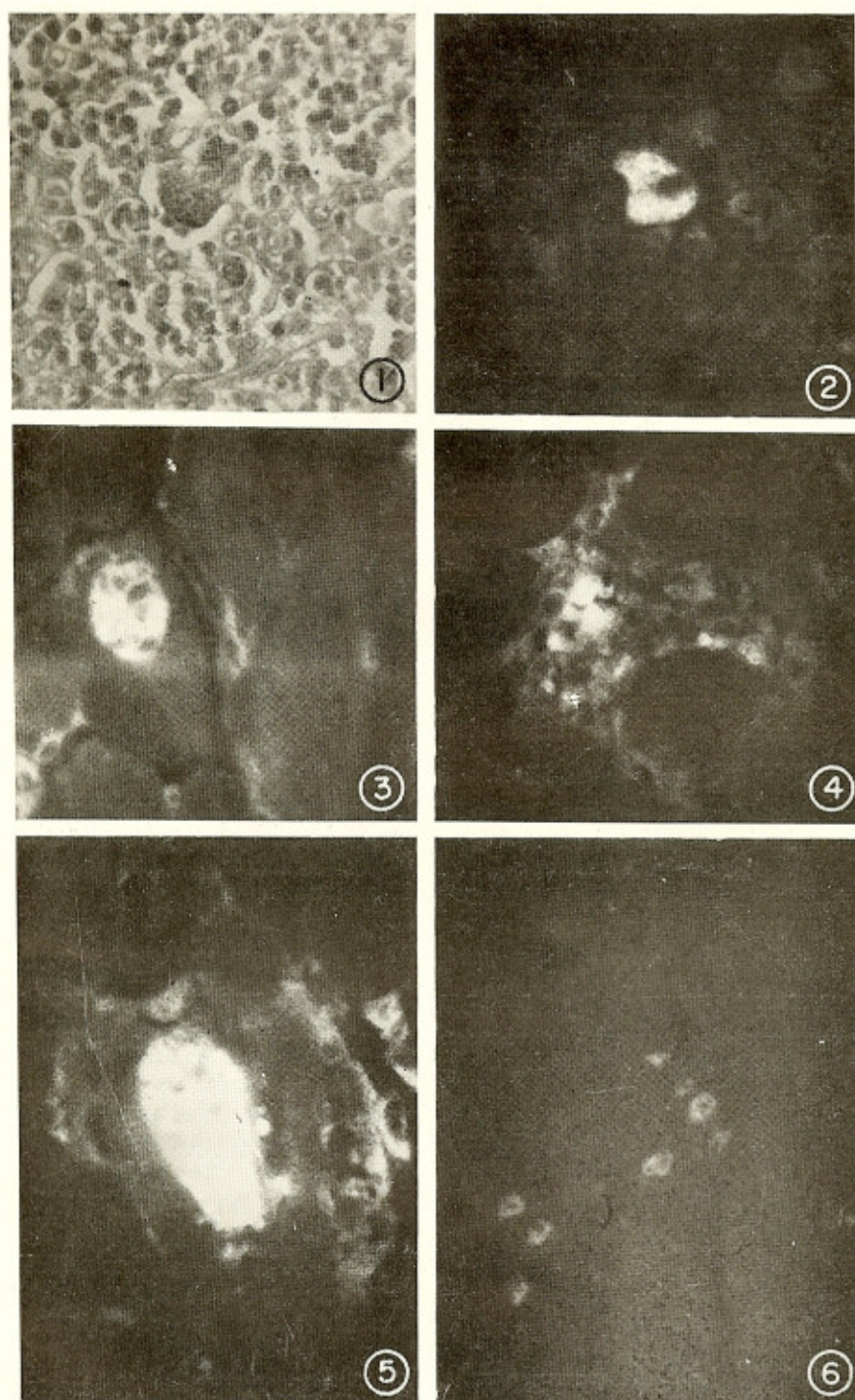
C) *Estudo dos controles* — As secções examinadas para controle deram, consistentemente, resultados negativos, mesmo nos cortes tratados pela anti-gamaglobulina do camundongo para pesquisa de anticorpos.

## DISCUSSÃO

A técnica da imunofluorescência permite demonstrar que os anticorpos circulantes localizados na fração gamaglobulina do plasma de pacientes humanos com doença de Chagas se fixam especificamente nas formas intracelulares do *T. cruzi* presentes nas secções de vários órgãos de animais experimentalmente infetados. Também a parte líquida ou amorfa do ninho parasitário toma

(\*) Anti-mouse globulin (fluorescein labeled Baltimore Biological Lab.)

(\*\*) Anti-human globulin (fluorescein labeled Baltimore Biological Lab.)



Figs. 1-6 — Presença de numerosas leishmânias no citoplasma de um macrófago no interior de um gânglio linfático H.E. (1). As mesmas leishmânias após tratamento pelo sôro do indivíduo chagásico, de uma anti-gamaglobulina humana fluoresceïnada (2). Leishmânias fluorescentes, tratadas pelo mesmo processo acima e localizadas no músculo esquelético (3 e 5). No tecido adiposo do mesentério (4). Células fluorescentes coradas especificamente para gamaglobulina do camundongo em uma secção do baço (6). Tôdas as fotos com aumento de  $43 \times 10$ .

fluorescência específica, mostrando conter material antigênico. Podemos, portanto, presumir que uma reação antígeno-anticorpo se processa toda a vez que um ninho parasitário se rompe no organismo do hospedeiro. A formação de complexos antígeno-anticorpo deve contribuir para exacerbar a reação inflamatória observada em torno da fibra parasitada e em desintegração. A formação de anticorpos específicos, pelo menos nas condições experimentais presentes e a julgar pela presença de células secretoras de globulinas, se faz em múltiplos locais, muito embora predominantemente ao nível do baço. As células secretoras de gamaglobulina, com citoplasma basófilo nas colorações de rotina, aparecem freqüentemente no conjuntivo peri-cardíaco, no interstício muscular, no tecido adiposo e a impressão é de que elas tenham se formado localmente, ao invés de terem migrado de outros locais.

A modificação introduzida por SAINT MARIE<sup>5</sup> na técnica de imunofluorescência, permitindo o uso de cortes em parafina, deu excelentes resultados nesta pesquisa. Além de permitir cortes tecnicamente perfeitos, evita o uso do criostato e permite facilmente a coloração subsequente das secções com hematoxilina e eosina. BIAGI<sup>1</sup> se refere a ter obtido fluorescência específica das leishmânias com o uso de cortes comuns em parafina de material fixado rotineiramente em formol a 10%. Em seu trabalho não há documentação fotográfica para que possamos julgar do tipo de preparados obtidos. Não nos foi possível obter qualquer resultado satisfatório com a técnica descrita por BIAGI & col.<sup>1</sup>, mesmo empregando soros altamente positivos.

A modificação de SAINT MARIE<sup>5</sup> não parece dar resultados tão bons quando ao invés de antígenos, pesquisamos anticorpos. Aparentemente a maioria das células produtoras da gamaglobulina, não toma a fluorescência e aquelas que tomam aparecem com fluorescência muito fraca.

#### SUMMARY

#### *Immunocitochemical study in experimental Chagas' disease*

It was demonstrated by means of the COONS' technique with fluorescent antibodies that circulating antibodies present in the sera of patients with Chagas' disease bind specifically to the leishmania forms of the *T. cruzi* present in the tissues of mice. The presence of gamma globulin containing cells (probably antibodies against *T. cruzi*) was demonstrated in various organs of the infected animals, specially in the spleen. So an antigen-antibody reaction might occur during the rupture of parasitized cells.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIAGI, F.; TAY, J. & MURRAY, R. M. — La reaction de inmunofluorescencia en el diagnostico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.* 57:234-240, 1964.
2. CAMARGO, M. E. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:227-234, 1966.
3. COONS, A. H.; LEDUC, E. H. & CONOLLY, J. M. — Studies on antibody production. I — A method for histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of hyperimmune rabbit. *J. Exp. Med.* 102:49-60, 1955.
4. FIFE Jr., E. H. & MUSCHEL, L. H. — Fluorescent antibody technic for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 101:540-543, 1959.
5. SAINT MARIE, G. — A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem. Cytochem.* 10:250-256, 1962.
6. SOUZA, S. L. & CAMARGO, M. E. — The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American trypanosomiasis serodiagnosis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:255-258, 1966.

Recebido para publicação em 11/9/1968.