

MIOCARDITE CHAGÁSICA EXPERIMENTAL : RESPOSTA CELULAR NA FASE AGUDA. (*)

Júnia Chaves** Rosane H. Cunha*** José N. Kawabata****

RESUMO

A resposta celular inflamatória da miocardite de camundongos inoculados com a amostra FL do *T. cruzi* foi avaliada em duas ocasiões, durante a fase aguda. Parte dos animais foi tratada com Aspirina, que ativa Complemento, "in vivo".

Em ambas as ocasiões, houve acúmulo de células inflamatórias no coração dos animais infectados, o que foi mais evidente naqueles infectados e tratados.

Os resultados indicam que a ativação do Complemento influenciou o desenvolvimento da inflamação observada.

UNITERMOS: CHAGAS, MIOCARDITE; EXPERIMENTAL. *TRYPANOSOMA* C.

INTRODUÇÃO

Na Miocardite Chagásica experimental, durante a fase aguda, quando os parasitas e/ou as células degeneram e morrem, surge a flogose focal. Graves e difusas são também as lesões do endotélio

dos capilares, que se torna tumefeito. Os espaços entre as células endoteliais apresentam-se alargados e a membrana basal está alterada (BOGLIOLO 2).

Durante a mesma fase, camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* apresentam na circulação, complexos

* Trabalho realizado com apoio financeiro do CNPq (40.344/81 e da FAPESP (82/1394-2).

** Professora Assistente Doutora – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo.

*** Ex-biologista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – Faculdade de Medicina – USP.

**** Biologista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – Faculdade de Medicina – USP.

imunes solúveis (CI), formados com participação de antígenos parasitários e de composição molecular adequada para reagir contra o primeiro componente do sistema Complemento (C), Clq, "in vitro" (CHAVES e cols. 6). CI formados por anticorpos das classes IgG e IgM depositam-se nas paredes vasculares e interstício do coração de camundongos igualmente infectados pelo *T. cruzi*, ativando, no local, o C (CHAVES e cols. 7). Podem, portanto, ser causa das lesões vasculares referidas. Devido à ativação do C, os CI depositados certamente são foco de atração quimiotática para leucócitos, principalmente neutrófilos, tal como na vasculite imune da Doença do soro (TUCKER 16) e a ativação do sistema pode, ainda, influenciar, indiretamente, várias outras funções imunes, pois fragmentos formados durante o processo ativam mastócitos, macrófagos e, possivelmente, outros tipos de células, na liberação de mediadores inflamatórios com função imunoreguladora (EGWANG e BEFUS 8).

Neste trabalho, usamos aspirina (AAS), capaz de ativar o C, "in vivo" (VOIGTLANDER e cols. 17), (HANSCH e cols. 9) para ressaltar a associação entre a ativação do C e o desenvolvimento da resposta celular da miocardite de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, em duas ocasiões da fase aguda.

MATERIAL E MÉTODOS

T. cruzi — Usamos a amostra FL, isolada e caracterizada pelo Prof. Dr. Z. BRENER, da UFMG (BRENER e CHIARI 3), (BRENER 4), (BRENER e cols. 5).

Animais — Foram utilizados 36 camundongos comuns, albinos, machos, de 20-25g de peso e idade aproximada de 4 semanas, provenientes do biotério da faculdade de Medicina — USP. Vinte e quatro foram inoculados com 5×10^4 tripomastigotas, por via intraperitoneal. Doze animais, não infectados, formaram o grupo de controles. Metade dos animais infectados foi tratada, a partir do dia da inoculação, com AAS.

No 6º dia depois da inoculação, seis camundongos infectados, seis infectados e tratados, bem como seis controles, foram sacrificados. No 12º dia pós-inoculação, adotamos procedimento igual.

Fragmentos do coração (região das aurículas, onde a inflamação do órgão parece predominar nesta espécie, quando infectada por diferentes amostras do *T. cruzi*), foram obtidos de cada um dos camundongos, nas duas ocasiões, após o que foram congelados e mantidos a -180°C , até o processamento.

AAS (Bayer) — Comprimidos com 500mg foram macerados e diluídos em solução de cloreto de sódio, a 0,85%, com pH = 7,2. A solução foi usada imediatamente, devido ao pH instável da mesma (HANSCH e cols. 9), nas doses de 15mg/dia/camundongo, através de sonda oral.

Identificação das células inflamatórias — Foi feita em cortes histológicos, com 1μ de espessura, obtidos a -20°C , separadamente, de cada um dos fragmentos referidos. Depois de fixação com glutaraldeído (Merck) a 3%, os cortes foram corados com Giemsa (Merck), diluído em

tampão de fosfatos com pH ácido, na proporção de V/V, durante 12 horas.

Os cortes correspondentes aos animais controles foram examinados em primeiro lugar, com aumento de 1000X, nas duas ocasiões. O número de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, mastócitos e macrófagos, com características morfológicas suficientes para identificação, foi determinado em toda a superfície dos mesmos. Naqueles dos camundongos infectados e tratados, somente 10 campos microscópicos, com mesmo aumento, foram examinados, nas duas oportunidades, devido à extensão do infiltrado presente em todo o corte.

RESULTADOS

A TABELA I mostra as médias dos tipos celulares determinados nos cortes histológicos correspondentes aos três grupos de camundongos. No grupo A (não infectados) a média do total das células, identificadas pelo exame de toda a superfície dos cortes, foi de aproxi-

madamente 123 no 6º dia e 121 no 12º dia, depois do início da experiência. No grupo B (infectados pelo *T. cruzi*) estas médias, determinadas pelo exame de apenas 10 campos microscópicos, corresponderam a 500 no 6º e 509 no 12º dia pós-inoculação. No grupo C (infectados pelo *T. cruzi* e tratados com AAS) as médias, também em 10 campos microscópicos, foram de 600 no 6º e 670 no 12º dia, depois da inoculação.

A figura 1 ilustra o aspecto de células inflamatórias presentes em corte histológico do coração de camundongo infectado pelo *T. cruzi*, no 6º dia, depois da inoculação.

A figura 2 mostra o aspecto de macrófago parasitado pelas formas intracelulares do *T. cruzi*, em corte de coração de camundongo infectado, no 6º dia, pós-inoculação, e a figura 3 ilustra o aspecto de mastócito em processo de degranulação, presente em corte histológico do coração de camundongo infectado e tratado, no 12º dia, depois da inoculação.

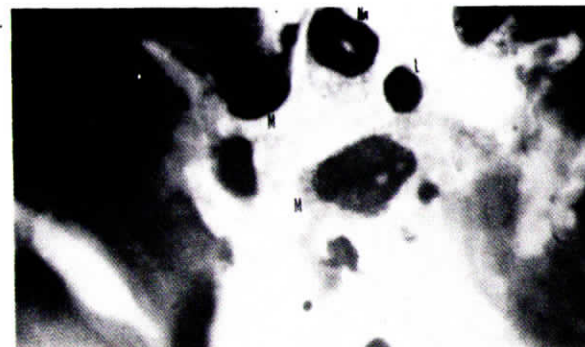


Fig. 1 — Aspecto de células inflamatórias observadas em corte histológico do coração de camundongo infectado por *T. cruzi* (6º dia, pós-infecção).

M = macrófago
L = linfócito

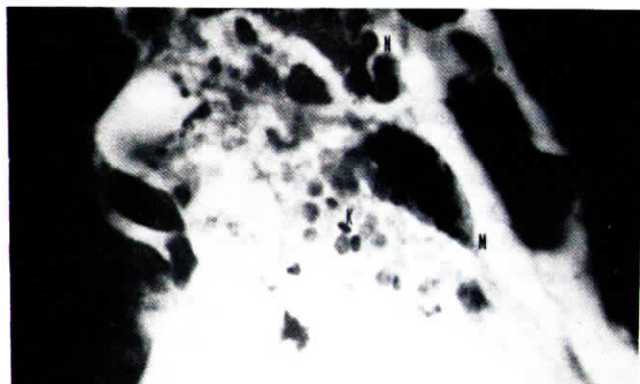


Fig. II – Aspecto de macrófago do infiltrado celular inflamatório observado em corte histológico do coração de camundongo infectado por *T. cruzi*, apresentando formas intra-celulares do parasita (6º dia, pós-inoculação).

M = macrófago

N = neutrófilo

A = amastigotas, intracelulares

K = cinetoplasto

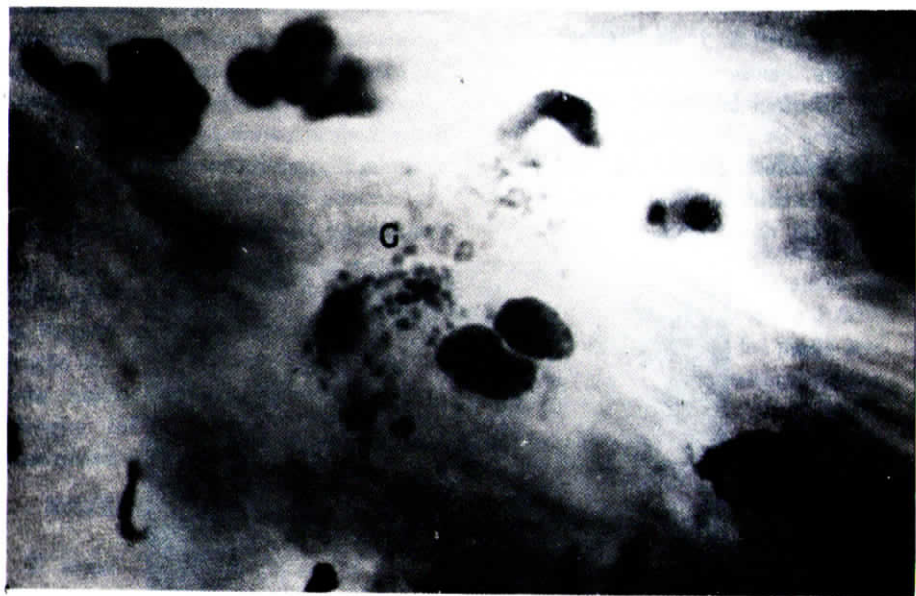


Fig. III – Aspecto de mastócito em processo de degranulação, observado em corte histológico do coração de camundongo infectado por *T. cruzi* e tratado com AAS (12º dia, pós-inoculação).

G = grânulo citoplasmático liberado para o tecido cardíaco próximo.

TABELA I – Médias dos tipos celulares determinados em cortes histológicos do coração de camundongos infectados por *T. cruzi*, infectados e tratados com AAS e respectivos controles, no 6º e 12º dia, depois da inoculação (6 animais/grupo nas duas ocasiões).

	Período após a inoculação									
	6º dia					12º dia				
	N.	Eo.	Mast.	L.	Macróf.	N.	Eo.	Mast.	L.	Macróf.
<i>grupo (A)</i> (não infectados)	22	0,16	3,75	35	62	20	0,05	4	35	62
<i>grupo (B)</i> (infectados)	110	5	5	140	240	90	4	10	150	255
<i>grupo (C)</i> (infectados e tratados)	135	5	10	150	300	140	5	15	145	365

N. = neutrófilos

L. = linfócitos

Eo. = eosinófilos

Macróf. = macrófagos

Mast. = mastócitos

DISCUSSÃO

O número de células inflamatórias determinado nos cortes dos grupos de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, pelo exame de apenas 10 campos microscópicos, foi bem maior que o encontrado nos cortes dos camundongos não infectados, pelo exame de toda a superfície dos mesmos. Este acúmulo de células no coração dos animais infectados, mais evidente naqueles tratados com AAS, nos quais a ativação do C foi maior, indica que o sistema influenciou no desenvolvimento quantitativo e qualitativo da resposta celular observada.

Trânsito leucocitário anormal pode ter sido responsável pela regulação desta resposta, visto que:

(a) — as alterações do endotélio vascular são precoces na miocardite da doença de Chagas experimental, em camundongos (BOGLIOLO 2);

(b) — a adesão entre as células endoteliais de vênulas pós-capilares e leucócitos é necessária para a migração extravascular das células, influenciando a diapedese dos leucócitos através do endotélio, o alojamento das células fagocitárias nos locais de inflamação e, mesmo, a recirculação dos linfócitos (HARLAN 10), (PUMAROLA-SUNE e cols. 13);

(c) — esta adesão se dá através das glico-proteínas Mac-1 e LFA-1, importantes para a resposta imune, pois granulócitos, monócitos e linfócitos de pacientes com deficiência de expressão das mesmas, apresentam severos defeitos da adesão e funções adesão-dependentes. Em macrófagos humanos e de camundongos, Mac-1 foi identificada como sendo o receptor

CR3 para o C (BELLER e cols. 1), (SASTRE e cols. 15).

A degranulação dos mastócitos observada freqüentemente nos cortes correspondentes aos animais infectados pelo *T. cruzi*, principalmente naqueles tratados com AAS, sugere que C₅a, que retém por maior tempo a atividade imuno-reguladora "in vivo" (MORGAN e cols. 12), tenha sido o indutor do processo.

Macrófagos, eosinófilos e neutrófilos também possuem receptores para vários dos fragmentos ativos do C e é possível que no micro-ambiente onde estejam presentes, a ligação entre os fragmentos e os receptores celulares estimulem a liberação dos metabolitos do ácido araquidônico e/ou do oxigênio (ROSS 14), (METZGER e cols. 11), (EGWANG e BEFUS 8). O acúmulo de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos no coração de camundongos infectados pelo *T. cruzi* sugere que tais processos devem estar ocorrendo no local, "in vivo".

SUMMARY

Chagasic experimental myocardite — Response of cellular immunity in the acute fase.

The cellular inflammatory response of the acute Chagasic myocarditis of mice inoculated with the FL strain of *T. cruzi* was evaluated in two occasions. Part of the animals was treated with Aspirin which activates Complement system, "in vivo".

In both occasions there was an accumulation of inflammatory cells in the heart of the infected mice, which was

most evident in the infected and treated ones.

The results indicates that Complement activation influenced this inflammation.

AGRADECIMENTO: à Bayer, pelo fornecimento de AAS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 — BELLER, D.I.; SPRINGER, T.A. & SCHREIBER, R.D. — Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three Complement receptor. *J. Exp. Med.*, 156: 1000-1009, 1982.
- 02 — BOGLIOLO, L. — *Miocardite Chagásica*, Patologia. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1976. p. 339-352.
- 03 — BRENER, Z. & CHIARI, E. — Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, 5: 220-224, 1963.
- 04 — BRENER, Z. — Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. & Parasitol.*, 59: 19-26, 1965.
- 05 — BRENER, Z.; CHIARI, E. & ALVARENGA, N.J. — Observations on *Trypanosoma cruzi* strains maintained over an 8-year period in experimentally inoculated mice. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, 16: 39-46, 1974.
- 06 — CHAVES, J.; FERRI, R.G.; KLIEMANN, T.A.E.; IRULEGUI, I. & SOUZA, H. B.W.T. de — Complexos imunes circulantes na doença de Chagas experimental. Identificação de antígenos parasitários nos complexos. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, 21: 77-81, 1979.
- 07 — CHAVES, J.; MARIANO, O.N.; SOUZA, H.B.W.T. de; 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.
- 08 — EGWANG, T.G. & BEFUS, A.D. — The role of Complement in the induction and regulation of immune responses. *Immunology*, 51: 207-224, 1984.
- 09 — HÄNSCH, G.M.; RÖMER, W.; VOIGTLÄNDER, V. & ROTHER, U. — Effect of salicylates on the Complement system: generation of mediators "in vivo" and "in vitro". *Clin. Immunol. & Immunopathol.*, 21: 228-236, 1981.
- 10 — HARLAN, J.M. — Leucocyte — endothelial interactions. *Blood*, 65: 513-525, 1985.
- 11 — METZGER, Z.; HOFFELD, J.T. & OPPENHEIM, J.J. — Regulation by PEG₂ of the production of oxygen intermediates by LPs-activated macrophages. *J. Immunol.*, 127:1109-1113, 1981.
- 12 — MORGAN, E.L; WEIGLE, W.O. & HUGLI, T.E. — Anaphylatoxin mediated regulation of the immune response. I-C₅a mediated suppression of humoral and murine humoral immune responses. *J. Exp. Med.*, 155: 1412-1426, 1982.
- 13 — PUMAROLA-SUNE, T.; GRANS, F.; CHEN, Y-X; CORDON-CARDO, C. & EVANS, R.L. — A monoclonal antibody that induces T cell aggregation reacts with vascular endothelial cells and placental trophoblasts. *J. Immunol.*, 137: 826-828, 1986.
- 14 — ROSS, G.D. — Structure and function of membrane Complement receptors. *Fed. Proc.*, 41: 3089-3093, 1982.
- 15 — SASTRE, L.; KISHIMOTO, T.K.; GEE, C.; ROBERTS, T. & SPRINGER, T.A. — The mouse leucocyte adhesion pro-

- teins Mac-1 and LFA-1: studies on mRNA translation and protein glycosylation with emphasis on Mac-1. *J. Immunol.*, 137: 1060-1065, 1986.
- 16 - TUCKER, E.S. - The role of Complement and other biochemical mediators in the pathogenesis of immune injury. In: NAKAMURA, R.M. - *Immunopathology. Clinical Laboratory. Concepts and Methods.* Boston, Little Brown, 1974. p. 104-137.
- 17 - VOIGTLÄNDER, V.; HÄNSCH, G.M. & ROTHER, U. - Effect of Aspirin on Complement "in vivo". *Int. Archs. Allergy appl. Immunol.*, 61: 145-149, 1980.