

IMUNO-COMPLEXOS NA ESQUISTOSSOMOSE. I — UTILIZAÇÃO DA FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO PARA SUA DETECÇÃO

Ferruccio SANTORO, Daniel BOUT, Pierre WATTRE e André CAPRON

RESUMO

Dois métodos de fixação do C' são propostos para a detecção e a dosagem dos imuno-complexos (IC) circulantes na esquistossomose. As taxas de atividade anticomplementar observadas nos soros dos esquistossomóticos foram paralelas às taxas de fixação do C' e densidade ótica verificadas nos IC precipitados pelo polietileno-glicol (P.E.G.) a 3,5% dos mesmos soros. Os valores de poder anticomplementar dos soros dos 17 doentes estudados foram significativamente superiores aos observados nos 12 controles. Num estudo preliminar, a quantidade de IC circulante foi menor nas formas hepatesplênicas que nas formas sub-clínicas e hepatintestinais.

INTRODUÇÃO

A presença de imuno-complexos (IC) em esquistossomóticos portadores da forma hepatesplênica, foi suspeitada por vários Autores após a evidênciação de depósitos granulados ao nível do glomérulo renal^{2, 3, 5, 6, 14, 15}, contendo IgG, IgM e a fração C₃ do complemento⁵.

Os depósitos eventuais destes IC sugerem sua circulação prévia sob forma solúvel.

Argumento importante relativo ao aparecimento de IC circulantes, refere-se à demonstração de antígenos circulantes de origem parasitária na esquistossomose experimental^{4, 9, 11}, e recentemente na esquistossomose mansônica humana⁷. Por outro lado, a presença de anticorpos dirigidos contra alguns destes antígenos foi demonstrada no soro de doentes esquistossomóticos⁷. A presença destes 2 componentes básicos do IC, livres na circulação, faz-nos supor que a formação de complexos Ag-Ac *in vivo* é bastante provável.

Vários métodos foram descritos para a detecção dos IC. Entre os mais recentes, convém citar a técnica de caracterização do Clq em meio gelificado descrita por AGNELLO & col.¹, o estudo da atividade anticomplementar na hepatite viral realizado por THIRY & col.¹⁶, o método que utiliza a precipitação dos IC circulantes com o polietileno-glicol (P.E.G.) a várias concentrações⁸ e a técnica radio-imunológica utilizando o Clq marcado por iodo-125 descrita por NYDEGGER & col.¹³ e aplicada à esquistossomose mansônica por LAMBERT & HOUBA¹⁰.

Nós nos propomos, no presente trabalho, a avaliar os IC circulantes na esquistossomose humana por *Schistosoma mansoni* e na esquistossomose experimental do camundongo, através da fixação do C' sobre precipitados em P.E.G. a 3,5%⁸, e a dosagem do poder anticomplementar¹⁶ nos soros totais. Ao mesmo tempo, estudaremos a rela-

Service d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de la Faculté de Médecine — 59000 Lille (France) e Laboratório Central Gonçalo Moniz — 40000 — Salvador — Bahia
Endereço: Ferruccio Santoro: Service d'Immunologie et de Biologie Parasitaire — Faculté de Médecine — Place de Verdun — 59000 Lille (France)

ção dos IC circulantes com a forma clínica e a evolução da parasitose.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros

a) *humanos* — soros de 17 pacientes originários do Estado da Bahia portadores de esquistossomose crônica. Por um problema de simplificação, as 4 formas sub-clínicas (SC) e 4 hepatintestinais (HI), ditas benignas, foram agrupadas e separadas das 9 formas graves- hepatesplênica (HE). A infecção por *S. mansoni* foi verificada pela presença de ovos nas fezes e pelos testes sorológicos de diagnóstico da esquistossomose.

Soros humanos normais (SHN) de 12 indivíduos sem nenhum sintoma clínico da esquistossomose, e com provas sorológicas e fezes negativas, foram utilizados como controles.

b) *camundongos* — soros de camundongos C57 black infectados com uma dose média de 100 cercárias de *S. mansoni* foram colhidos regularmente. Soros de camundongos do mesmo grupo não infectados, foram utilizados como controles negativos. A coleta sanguínea foi efetuada aproximadamente ao 5.º dia após a infestação nos camundongos experimentais, e ao 15.º dia nos controles.

Métodos

Numa experiência preliminar, 8 soros de esquistossomóticos e 5 SHN foram precipitados em P.E.G. a 3,5% segundo a técnica proposta por CREIGHTON & col.⁸. O precipitado obtido foi dissolvido em um volume de água destilada igual ao volume inicial do soro. Esta solução foi, então, dividida em 2 partes iguais. Uma servia para determinar a densidade ótica (D.O.) a 280 nm após diluição a 1/10 na soda (NaOH) 0,1 N. Na outra parte efetuou-se a fixação do C' sobre placas, descrita por WASSERMAN & col.¹⁷ e utilizada por THIRY & col.¹⁶ no estudo relacionado da atividade anticomplementar e IC.

Esta mesma fixação do C' foi aplicada ao estudo do poder anticomplementar (P.A.C') do soro total dos 29 indivíduos estudados (incluindo os que foram precipitados em P.E.G.), dos camundongos infectados por *S. mansoni* e dos camundongos-controles.

RESULTADOS

Esquistossomose mansônica humana

A detecção dos IC circulantes foi realizada nos precipitados em P.E.G. dos soros de 8 esquistossomóticos e 5 controles através da leitura da densidade ótica (D.O.) e da fixação do C'. O estudo do poder anticomplementar (P.A.C') foi efetuado nos soros totais dos mesmos pacientes (Tabela I).

TABELA I

Dosagem dos I.C.

Pacientes	N.º de casos	Soro prec. em peg 3,5%		Soro total
		D.O.	Fixação do C'	Poder anti-C'
Esquistossomóticos	8	0,28 ± 0,14	147 (5)	210 (4)
Controles	5	0,06 ± 0,01	4,6 (2,3)	Neg.

() Desvio padrão

Observamos nestes resultados a freqüência importante dos IC tal como são detectados pelos 2 métodos. Mais de 60% dos doentes apresentaram valores numéricos significativamente superiores quando comparados aos controles. Notaremos em particular a boa correlação existente entre os métodos utilizados.

TABELA II
Taxa dos I.C. nas formas clínicas da esquistossomose

Pacientes	N.º de casos	Poder anti-C'
SC + HI	8	530 (2,7)
HE	9	82 (2)
Controles	12	Neg.

() Desvio padrão

Estes resultados preliminares autorizaram-nos a aplicar o estudo do P.A.C', em um maior número de soros de esquistossomóticos e controles. A Tabela II resume todos os resultados obtidos nos soros totais das diferentes formas clínicas dos pacientes esquistossomóticos e dos 12 controles, bem como os resultados do P.A.C' do soro dos 8 esquistossomóticos e 5 controles da experiência preliminar.

Podemos constatar que a média das taxas dos IC observadas no grupo de doentes subclínicos e hepatintestinais é significativamente superior à observada nos doentes portadores de forma hepatoesplênica ($P < 0,01$).

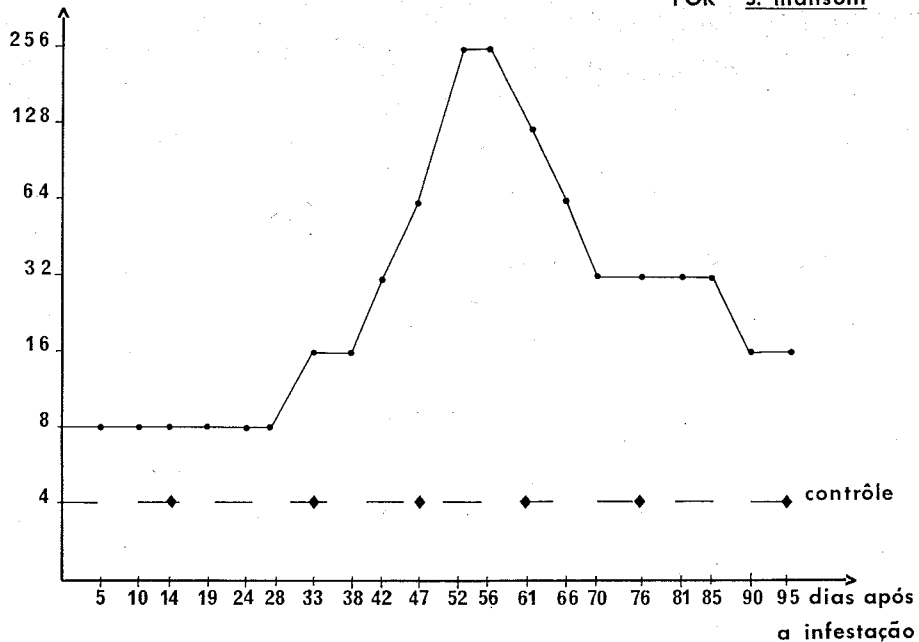
Esquistossomose mansônica experimental

Na esquistossomose experimental do camundongo, a presença de IC foi também apreciada pelo estudo do P.A.C' (Diagrama A).

DIAGRAMA A : EVOLUÇÃO DOS I.C. NO CAMUNDONGO INFESTADO

título do soro

POR *S. mansoni*



Podemos notar que os IC circulantes no camundongo infectado por *S. mansoni* são detectados a partir do 42.º dia após a infes-

tação. Entre os 52.º e 56.º dias observam-se os teores mais elevados. A partir do 56.º dia após a infestação houve diminuição im-

portante, chegando ao 90.^o dia com uma taxa até mesmo pouco superior àquela verificada nos camundongos-controles.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Em se tratando de assunto relativamente novo no campo da Imunologia Parasitária, só encontramos um trabalho relacionado com os IC circulantes na esquistossomose mansônica: o de LAMBERT & HOUBA¹⁰.

Se a reação de fixação do C' tem como princípio fundamental a ligação do C' sobre um complexo Ag-Ac formado *in vitro*, as taxas elevadas do P.A.C' observada nos soros de esquistossomóticos deve ter uma relação específica com a presença de IC circulante formado *in vivo*.

O paralelismo existente entre as taxas do P.A.C' nos soros totais e as observadas com a fixação do C' nos IC precipitados em P.E.G. dos mesmos soros, reforça sensivelmente, apesar do pequeno número de casos estudados, a especificidade do estudo do P.A.C'.

Os resultados observados na Tabela II mostram nos pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos, uma quantidade de IC inferior à observada nas formas sub-clínicas e hepatintestinais. Esta diminuição inversamente proporcional à evolução clínica da doença poderia corresponder ao depósito de IC. Um estudo mais profundo deste assunto, está sendo realizado atualmente nos nossos laboratórios, em um maior número de pacientes.

Na curva que representa a taxa de IC na esquistossomose experimental do camundongo observamos que após uma quantidade máxima no 56.^o dia após a infestação, ocorre uma diminuição dessa taxa com a evolução da parasitose. É interessante notar aqui que os IC eluidos do rim de camundongos infectados por *S. mansoni*, recentemente demonstrado por NATALI & CIOLI¹², tiveram uma incidência máxima a partir do 60.^o dia após a infestação. Resta-nos supor que, efetivamente, os IC circulantes no camundongo infestado por *S. mansoni*, aparecem em maior quantidade antes do depósito ao nível renal, logo, provavelmente antes da agravação da parasitose.

Se permitirem a confirmação destas observações, os trabalhos posteriores conferirão ao estudo dos IC na esquistossomose interesse fundamental para o conhecimento da patogenia das manifestações viscerais dessa parasitose.

SUMMARY

Immune complexes in schistosomiasis. I — The use of complement fixation tests for their detection

The precipitation by polyethylene glycol (P.E.G.) and the complement fixation (C.F.) test were applied to detect the presence of immune complexes in sera from human and experimental *Schistosoma mansoni* infections.

Titers of CF reaction and extinction values of optical density obtained with P.E.G.-treated sera, correlated well with the anti-complementary activity of the same non-treated sera.

It is postulated that the determination of serum anticomplementary activity in *S. mansoni* patients may be a valuable procedure for the detection of circulating immune complexes.

According to some preliminary results, the mean level of immune complexes was significantly higher in sub-clinic or hepatointestinal forms than in hepatosplenic forms of the disease.

AGRADECIMENTOS

Gostariamos de agradecer às Senhoras Fabienne Derbaudrenghien e Martine Vanneste pela excelente colaboração técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGNELLO, V.; WINCHESTER, R.J. & KUNKEL, H.G. — Precipitin reaction of the C1q component of complement with aggregated -globulin and immune complexes in gel diffusion. *Immunology* 19:909-911, 1970.
2. ANDRADE, Z.A. & QUEIROZ, A.C. — Lesões renais na esquistossomose hepato-esplênica. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10: 36-40, 1968.

3. ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G. & SARDIGURSKY — Renal changes in patients with hepatosplenic schistosomiasis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 20:77-80, 1971.
4. BERGGREN, W.L. & WELLER, T.H. — Immuno-electrophoretic demonstration of specific circulating antigen in animals infected with *Schistosoma mansoni*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 16:606, 1967.
5. BRITO, T. de; BONI, D. de; LOPES, J.D. & SILVA, L.C. da — Kidney biopsy in human schistosomiasis: an ultrastructural study. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11: 62-64, 1969.
6. BRITO, T. de; GUNGI, J.; CAMARGO, M. E.; PENNA, D.O. & SILVA, L.C. da — Advanced kidney disease in patients with hepatosplenic manson's schistosomiasis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:225-235, 1970.
7. CARLIER, Y.; BOUT, D.; BINA, J.C.; CAMUS, D.; FIGUEIREDO, J.F.M. & CAPRON, A. — Immunological studies in human schistosomiasis. I — Parasitic antigen in urine. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 24:949-954, 1975.
8. CREIGHTON, W.D.; LAMBERT, P.H. & MIESCHER, P.A. — Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol. *J. Immunol.* 111:1219-1221, 1973.
9. GOLD, R.; ROSEN, F.S. & WELLER, T.H. — A specific circulating antigen in hamsters infected with *Schistosoma mansoni*. Detection of antigen in serum and urine and correlation between antigenic concentration and worm burden. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 18:545, 1969.
10. LAMBERT, P.H. & HOUBA, V. — Immune complexes in schistosomiasis. Meeting of investigators on the immunology of schistosomiasis (WHO), Nairobi (Kenya), 11-17 décembre, 1974.
11. NASH, T.E.; PRESCOTT, B. & NEVA, F.A. — The characteristics of a circulating antigen in schistosomiasis. *J. Immunol.* 112: 1500-1502, 1974.
12. NATALI, P.G. & CIOLI, D. — Immune complexes nephritis in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Fed. Proc.* 33:757, 1974.
13. NYDEGGER, U.E.; LAMBERT, P.H.; GERBER, H. & MIESCHER, P.A. — Circulating immune complexes in the serum in systemic lupus erythematosus and in carriers of hepatitis B antigen. Quantitation by binding to radiolabelled Clq. *J. Clin. Invest.* 54: 297-299, 1974.
14. QUEIROZ, F.P.; BRITO, E.; MARTINELLI, R. & ROCHA, H. — Nephrotic syndrome in patients with *Schistosoma mansoni* infections. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 22:622, 1973.
15. SILVA, L.C. da; BRITO, T. de; CAMARGO, M.E.; BONI, D. de; LOPES, J.D. & GUNGI, J. — Kidney biopsy in the hepatosplenic form of infection with *S. mansoni* in man. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 42:907, 1970.
16. THIRY, L.; CLINET, G.; TOUSSAINT, C. & VEREERSTRAETEN, P. — The use of complement fixation tests to detect Australia antigen-antibody complexes and antibodies to a tween antigen. *Vox. Sang.* 24: 36-40, 1973.
17. WASSERMAN, E. & LEVINE, L. — Quantitative micro-complement fixation and its use in the study of antigenic structure by specific antigen-antibody inhibition. *J. Immunol.* 87:290-293, 1961.

Recebido para publicação em 8/7/1975.