

Imp-
ANTONIO CARLOS LEITÃO CAMPOS CASTRO

" ESTUDO PATOGENICO DA NEFROPATIA EM RATOS
INOCULADOS COM TRYPANOSOMA CRUZI "

Tese de Doutorado apresentada
à Faculdade de Ciências Médicas-
da Universidade Estadual de Cam-
pinas.

CAMPINAS - SÃO PAULO

1976

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

REITOR-

Professor Doutor ZEFERINO VAZ

COORDENADOR GERAL DA UNIVERSIDADE-

Doutor PAULO GOMES ROMEO

DIRETOR-

Professor Doutor JOHN COOK LANE

PROFESSORES TITULARES-

Professor Doutor BERNARDO BEIGUELMAN

Professor Doutor GOTTFRIED KOBERLE

Professor Doutor JOSÉ ARISTODEMO PINOTTI

Professor Doutor JOSÉ LOPES DE FARIA

Professor Doutor LUIZ SÉRGIO LEONARDI

Professor Doutor MANUEL PEREIRA

Professor Doutor OSWALDO VITAL BRASIL

Professor Doutor SILVIO DOS SANTOS CARVALHAL

Professor Doutor VICENTE AMATO NETO

Professor Doutor ARMANDO DE AGUIAR PUPO

Professor Doutor AURELIANO BAPTISTA FONSECA

Ofereço este meu trabalho
à Violeta,
esposa paciente, compreensiva
e dedicada

Aos meus queridos filhos
Suzana, Raquel, Renata, Paulo e Mariana
a razão do meu viver

A meus pais,
por seu exemplo, por seu apoio

A meu sogro,
com quem compartilho
lutas e vitórias.

A G R A D E C I M E N T O S

Com respeito, admiração e carinho, agradeço a todos aqueles que me permitiram dar mais um passo em - minha vida profissional.

Inesquecível será para mim, a ajuda valiosa e - desinteressada dos professores e amigos.

Dr. Walter August Hadler,

meu orientador incansável

Dr. Sílvio dos Santos Carvalhal,

por seu constante estímulo

Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos,

colaborando sempre, como amigo

Dr. Francisco Gomes de Alcântara,

de quem recebi inspiração e incentivo

Dr. Norair Salviano dos Reis,

no qual encontrei sempre cooperação

Dr. José Ribeiro de Menezes Neto,

pelo apoio sempre recebido

Dr. Antonio Cesar Lins de Lima,

em quem sempre encontrei colaboração

D. Luiza Araújo Farah e a tantos outros

a quem devo muito.

Í N D I C E

	Página
I - INTRODUÇÃO	1
II - MATERIAL E MÉTODOS	6
2a. - Imunofluorescência	8
2b. - Microscopia eletrônica	9
2c. - Pesquisa do antígeno específico.....	10
III- RESULTADOS.....	12
3a. - Microscopia óptica	13
3b. - Imunofluorescência	14
3c. - Microscopia eletrônica	15
IV - DISCUSSÃO	26
V - CONCLUSÕES.....	33
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

I. INTRODUÇÃO

Admite-se atualmente que um grande número, senão a maioria das nefropatias, apresente um substrato imunopatológico (14,15,20,22,24,27,30,31,32,47).

Os estudos, que procuram comprovar os mecanismos para as doenças renais, tiveram início em 1900, quando Lindemann (28) demonstrou a nefrotoxicidade do soro heterólogo anti-rim, em animais de experimentação; Von Pirquet (49), em 1911, relacionou a nefrite clínica com os eventos imunológicos da doença do soro. Em 1912, Escherich e Schick (17) sugeriram que a glomerulonefrite, que se manifestava após faringites, ou após a escarlatina, como já havia sido demonstrado por Bright (11), em 1833, deveria ser consequência de reações imunológicas à infecção. Em 1928, Masugi (29) realizou sua clássica experimentação, ao injetar emulsão de rim de rato em Coelho. O anti-soro formado no coelho, quando injetado no rato, produzia glomerulonefrite aguda ou crônica.

Dois mecanismos imunológicos parecem induzir o aparecimento da nefropatia (33,47):

1. O primeiro mecanismo depende da formação de anticorpos contra componentes antigênicos da membrana basal glomerular e ocorre quando se usa o soro nefrotóxico.

2. O segundo mecanismo decorre da formação de imunocomplexos circulantes, que se depositam na membrana basal dos glomérulos.

No primeiro mecanismo, estabelece-se a reação antígeno-anticorpo, com fixação da fração C'3 do sistema do complemento no rim. A partir da lesão estabelecida, podem formar-se neo-antígenos, com desenvolvimento de nova fase de agressão renal, responsável pela perpetuação do processo. Esse mecanismo desencadeia lesão renal, portanto, através de duas fases características: a heteróloga inicial, seguida da autóloga, que poderá perpetuar a doença.

No segundo mecanismo, os complexos solúveis de antígeno-anticorpo se depositam no rim e aí exercem seus efeitos, devido à fixação da fração C'3 do complemento. Nesse mecanismo, o antígeno não apresenta, necessariamente, relação imunológica com os componentes antigênicos-glomerulares. A deposição desses imunocomplexos, que pode ser facilitada por uma série de fatores, poderá desencadear a ativação do sistema do complemento, bem como do mecanismo de coagulação intra-vascular, provocando não somente uma nefropatia, como estabelecendo condições, pelos produtos resultantes das destruições celulares que acarreta, para a perpetuação da nefropatia.

Muitos antígenos têm sido descritos, capazes de, através dos imunocomplexos formados, provocarem o aparecimento de nefropatias (6,8,10,18,25,44). As doenças parasitárias são, geralmente, consequência da longa

permanência de parasitas no hospedeiro. Embora o parasita - possa não agredir, diretamente, as estruturas do organis - mo, acaba por desenvolver ação patogênica através de meca - nismos imunológicos. Isso se faz pela formação de imunocom - plexos, resultantes de antígenos liberados, frequentemente, - pela destruição desses parasitas (16,25).

Em algumas doenças, como a malária (1,5,- 8,9,25,50), a esquistossomose (2,6,18,25,40,42), a tripa - nosomíase africana (25,36,41) e o calazar (3,12), há evi - dências desse fenômeno. Essas evidências baseiam-se em - estudos sorológicos ou em investigações imunológicas. Mesmo na ausência de manifestações clínicas de nefropatia, o - achado de imunoglobulinas e do complemento, depositados - no glomérulo renal, é frequente (25).

A nefropatia resultante é, em todas es - sas entidades, semelhante e caracteriza-se por aumento nu - mérico de células mesangiais e pela presença de imunoglo - bulinas e do complemento, depositados nas paredes dos ca - pilares (1,2,3,5,8,9,12,18,25,36,41,42,50).

Com base nesses fatos, supusemos a possi - bilidade de ocorrer um tipo de nefropatia na evolução da - doença de Chagas, pois, nessa tripanosomíase, existe um - elevado contingente de reações imunológicas, à semelhança - do que acontece em outras doenças parasitárias (16,44,45,- 46).

Para verificar a hipótese formulada, que - admite o comprometimento renal de natureza imunológica, - que poderia ocorrer na doença de Chagas, recorreremos à in -

fecção crônica experimental de ratos por Trypanosoma cru-
zi. Realizamos o presente estudo motivados, também, pela-
ausência de publicações, até à presente data, referentes-
à nefropatia na doença de Chagas, tanto humana quanto ex-
perimental.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Os animais usados nesta experimentação - foram ratos Wistar, com 15 dias de idade, pesando 20 gramas, em média. Foram inoculados com 5000 parasitas/grama de peso, por via sub-cutânea. O inóculo era constituído por suspensão de Trypanosoma cruzi, formas sanguícolas da cepa " Y " (amostra isolada por Silva e Nussenzweig(17), em 1953, mantidas através de repiques semanais, em camundongos. Os controles da parasitemia foram feitos no 8º, 15º e 20º dias após a inoculação, sendo utilizados somente os - animais com parasitemia positiva verificada, segundo a - técnica de Pizzi e Brener (13). Foram, também, utilizados animais normais, que constituíram o grupo controle.

Utilizamos 80 Ratos, distribuídos em - três lotes:

Lote 1 - composto por 20 ratos, infectados há 1 ano;

Lote 2 - composto por 30 ratos, infectados há 6 meses;

Lote 3 - composto por 30 ratos, não inoculados.

Os ratos foram sacrificados através de - anestesia pelo éter e, logo após, foram retirados os rins.

Fragmentos desses rins foram fixados em:

1. solução de formalina a 10%, tampada com fosfatos de pH 7,2:

2. solução de Bouin.

Outros fragmentos foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em " Deep Freezer ", a -80°C, até sua utilização. Nessa ocasião, foram feitos cortes com 4 micrômetros de espessura, em criôtomos " International-Harris ", modelo CT, os quais foram utilizados para reações de imunofluorescência. Outros fragmentos foram fixados em glutaraldeído e utilizados para a microscopia eletrônica.

O material fixado em solução de formalina e em Bouin, foi incluído em parafina e destinado ao estudo histológico; foram efetuadas, com esta finalidade, coloração pela Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson, reação do ácido periódico reativo de Schiff, e impregnação argêntica, segundo Gomori.

Em cortes obtidos em criôtomos, foi pesquisada a presença de imunoglobulina, da fração C'3 do complemento e do fibrinogênio agregados ao tecido renal. Utilizou-se a reação de imunofluorescência direta, usando-se conjugados anti-gama globulina de rato, anti-C'3 de rato e anti-fibrinogênio de rato, marcados pelo isotiocianato de fluoresceína. Esses conjugados foram obtidos, comercialmente, do " Cappel Laboratories, Inc. ", U.S.A.; apresentavam as seguintes relações molares fluoresceína/proteína (F/P) : - anti-gama total: 6,5: anti-complemento: 5,3 e anti-fibrinogênio: 6,7.

2 a: Técnica da reação de imunofluorescência:

1. cortes, de 4 micrômetros, obtidos em -

criôtomos, foram colocados em lâminas extra-finas e secas, com jato de ar aquecido;

2. os conjugados foram adequadamente diluídos, em salina tamponada com fosfato, pH 7,2, contendo 0,1% de azul de Evans. Os conjugados, após titulações adequadas, foram usados nas seguintes diluições: anti-gama total, 1/30; anti-complemento e anti-fibrinogênio, 1/20;

3. as lâminas foram incubadas com os conjugados, em câmara úmida, a 37°C, durante 30 minutos;

4. após a incubação, as lâminas foram lavadas por 10 minutos, 3 vezes, com salina tamponada com fosfatos, pH 7,2;

5. após a última lavagem, as lâminas foram secas com ar aquecido, e montadas em lamínula com glicerol tamponado de pH 8,6.

As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência Zeiss, sob luz ultra-violeta, utilizando-se como excitador filtro BG12, e como barreiras, a combinação dos filtros 53, 50 e 44.

2 b: Microscopia eletrônica: fragmentos de rim fixados em solução de glutaraldeído a 1,4%, durante uma hora, foram lavados em solução tampão de cacodilato de sódio, pH 7,2 e, em seguida, tratados por solução de tetróxido de ósmio a 1%, durante 45 minutos. Após desidratação em acetona, foram incluídos em Epon, cortados em ultramicrotomo e montados em telas. Estas foram tratadas por solução de acetato de uranila a 4%, durante uma hora

e depois por solução de citrato de chumbo a 1%, durante -
um minuto, secas e examinadas em microscópio eletrônico -
Zeiss.

2 c: Pesquisa do antígeno específico:

A tentativa de demonstração do antígeno de Trypanosoma cruzi, agregado ao rim de ratos inoculados -
com esse Trypanosoma, foi feita através da reação de imu -
nofluorescência indireta, utilizando-se uma mistura de -
IgG (gama-globulina), obtida de pacientes chagásicos -
crônicos, purificada em coluna de DEAE-celulose. Essa IgG -
mostrava-se reativa para o antígeno de Trypanosoma cruzi -
(reação de imunofluorescência indireta), até a diluição de
1/320. Como conjugado, foi utilizado soro anti-IgG humano,
marcado pelo isotiocianato de fluoresceína, cuja relação -
molar F/P era 4,7. Esse conjugado foi utilizado após di -
lução 1/30, em salina tamponada com fosfato, pH 7,2, con -
tendo 0,1% de azul de Evans. Cortes de rins, obtidos con -
forme foi acima descrito, foram incubados com gama-globu -
lina de chagásicos, diluída a 1/10, em salina tamponada -
com fosfatos. Essa incubação foi feita durante 30 minutos,
em câmara úmida, a 37°C. Procedeu-se então, a 3 lavagens, -
em salina tamponada com fosfatos, pH 7,2, por 10 minutos.
Os cortes foram então incubados com o conjugado anti-IgG -
humano, adequadamente diluído, durante 30 minutos, em câ -
mara úmida a 37°C. Procedeu-se a mais três lavagens, em -
salina tamponada com fosfatos, com intervalos de 10 minu -
tos. A seguir, as lâminas foram secas com ar aquecido e -
montadas com lamínula, utilizando-se glicerol tamponado, -

pH 8,6. Foram examinadas em luz ultra-violeta, usando-se -
como excitador filtro BG12, e como barreiras, a combinação
dos filtros 53, 50 e 44.

III. RESULTADOS

A. Resultados da microscopia Óptica:

Basearam-se na comparação dos ratos infectados com os controles. No lote 1, o estudo histológico dos rins revelou:

1. a maioria dos glomérulos apresenta espessamento discreto ou moderado da área mesangial, às custas de depósito de material PAS positivo. As alças capilares apresentam luz evidente, e estão, muitas vezes, aderidas entre si, havendo, nas áreas de maior espessamento do mesângio, perda da individualidade da membrana basal, por estar em continuidade com o material PAS positivo do mesângio. Nas áreas onde é menos intenso o depósito de material PAS positivo, a membrana basal das alças capilares se apresenta individualizada, sendo discutível seu espessamento. Alguns glomérulos exibem hiper celularidade (figuras 1 e 2)-

2. nos vasos sanguíneos, demonstra-se a presença de depósitos de material PAS positivo em arteríolas, ao nível do hilo dos glomérulos;

3. alguns túbulos contornados proximais apresentam-se intumescidos e com desorganização do citoplasma das células de revestimento, as quais contêm, grânulos de material PAS positivo, em seu interior.

No lote 2, essas mesmas alterações são verificadas, se bem que apresentem intensidade menor.

No lote 3, não foram encontradas altera -

ções histopatológicas significantes ;

B. Resultados da imunofluorescência:

Lote 1 (Quadro I): em 75% dos animais, - demonstra-se a presença de depósitos granulares de imuno - globulina em alças capilares dos glomérulos. Em 60% dos - animais, verifica-se a presença da fração C'3 do comple - mento e, em 100% dos casos, a do fibrinogênio nesses mes - mos locais. Em 20% dos animais há, também, depósito de - material fluorescente granular em arteríolas (figuras 3,- 4,5 e 6).

No presente trabalho, considerou-se como - altamente sugestivo de nefropatia por imunocomplexos, - quando, no mesmo corte de rim, encontrava-se fluorescência positiva para imunoglobulina, complemento e fibrinogênio.- Esse fato é observado em 60% dos animais. Os casos em que - é demonstrada a presença de apenas um ou dois dos conjuga - dos utilizados, não foram considerados.

Lote 2 (Quadro II): foi realizada, nesse lote, a mesma sequência de estudos e interpretações.Em 60% dos animais demonstra-se a presença de imunoglobulina nos - glomérulos; em 40%, da fração C'3 do complemento, e em - 100% dos casos, ocorre a presença de fibrinogênio.Em 13,3% dos animais, há depósitos de material fluorescente em ar - teríolas. Considerou-se como altamente sugestivo da pre - sença de nefropatia por imunocomplexos, nesses animais, a - presença de imunoglobulina, complemento e fibrinogênio, no mesmo rim. Assim, observamos que 40% deles apresentaram - essa condição.

Lote 3: Em todos os animais deste grupo, - não se evidenciou imunofluorescência.

Foi negativa, em todos, a demonstração do antígeno específico no rim.

C. Resultados da microscopia eletrônica:

Todos os ratos do grupo controle tinham a membrana basal dos glomérulos normal à microscopia eletrônica. Nos glomérulos dos ratos previamente inoculados com Trypanosoma cruzi, a membrana basal em todos os animais - estudados (5 animais), se apresentava bastante espessada, atingindo proporções duas a três vezes maiores que as da - membrana basal normal. Além disso, ela sofreu alteração da - sua morfologia normal, perdendo-se a individualização dos - seus componentes e adquirindo aspecto finamente granuloso. Esses são os achados em ratos inoculados há 1 ano. Nos ino- culados há 6 meses, as alterações da membrana basal dos - glomérulos renais são semelhantes, mas ocorrem com menor - frequência (figuras 7 e 8).

QUADRO I

RESULTADOS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA EM RINS DE RATOS INFECTA - DOS HÁ 1 ANO (Lote 1)

A intensidade da reação foi estimada grosseiramente

Nº do Rato	Fluorescência nos glomérulos			Fluorescência em arteríolas
	Ig	C'3	Fi	
*01	++	+	++	┌───┐
02	+	┌───┐	++	┌───┐
03	┌───┐	┌───┐	+	┌───┐
*04	+++	++	+++	+ (Ig. C3-Fi)
*05	++	+	++	┌───┐
06	┌───┐	┌───┐	+	┌───┐
*07	+++	+++	+++	+ (Ig. C3-Fi)
*08	+++	+	+++	┌───┐
*09	+++	++	+++	┌───┐
10	+	┌───┐	+	┌───┐
11	┌───┐	┌───┐	+	┌───┐
*12	++++	+++	+++	+ (Ig. C3-Fi)
*13	+++	++	+++	┌───┐
14	+	┌───┐	++	┌───┐
*15	++	+	++	┌───┐
16	┌───┐	┌───┐	+	┌───┐
*17	+++	+	++	┌───┐
*18	++	+	++	┌───┐
19	┌───┐	┌───┐	+	┌───┐
*20	+++	++	+++	+ (Ig. C3-Fi)

Número total de ratos estudados.....20
 Percentagem de ratos que reagem positivamente aos 3 -
 anticorpos.....60%
 Ig positivo em.....75%
 C3 positivo em.....60%
 Fi positivo em.....100%
 Percentagem de ratos que apresentaram fluorescência -
 nos vasos..... 20%

Os números assinalados com (*)correspondem-
 aos ratos cujos rins reagem positivamente com os 3 anti -
 corpos fluorescentes empregados.

Ig= imunoglobulina; C'3= complemento; Fi= fibrinogênio.

QUADRO II

RESULTADOS DA IMUNOFLOURESCÊNCIA EM RINS DE RATOS INFECTA - DOS HÁ 6 MESES. (Lote 2)

A intensidade da reação foi estimada grosseiramente.

Nº do Rato	Fluorescência nos glomérulos			Fluorescência em arteríolas
	Ig	C'3	Fi	
01			+	
*02	+++	++	+++	
*03	++	+	+++	
04			++	
*05	+++	++	+++	+ (Ig.C3.Fi)
06	+		+	
07			+	
*08	+++	+	++	
09	+		++	
*10	+++	++	+++	
11			+	
*12	+++	++	+++	+ (Ig.C3.Fi)
13			+	
14	+		+	
*15	++	+	++	
16			+	
*17	+++	++	++	
18			++	
19			+	
20	+		+	
21			++	
*22	++	++	+++	+ (Ig.C3.Fi)
23			+	
*24	++	+	++	
*25	++	+	++	
26			++	
*27	+++	+++	+++	+ (Ig.C3.Fi)
28	+		+	
29			+	
30	+		+	

Número total de ratos estudados..... 30
 Percentagem de ratos que reagem positivamente aos 3 -
 anticorpos..... 40%
 Ig positivo em 60%
 C3 positivo em 40%
 Fi positivo em 100%
 Percentagem de ratos que apresentaram fluorescência -
 nos vasos 13,3%

Os números assinalados com (*) correspondem -
aos ratos cujos rins reagem positivamente com os 3 anti -
corpos fluorescentes empregados.

Ig= imunoglobulina; C'3= complemento; Fi= fibrinogênio.

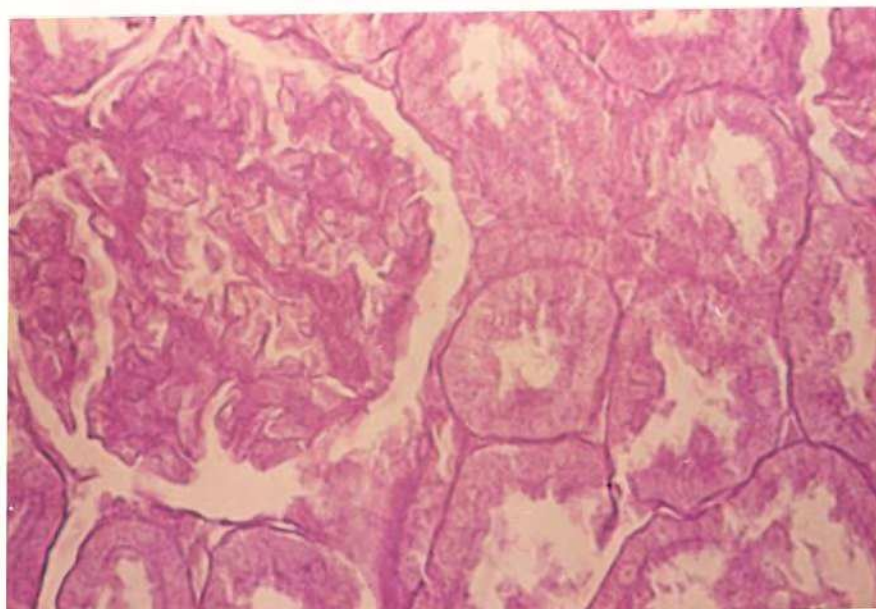


Figura 1. Rim, rato inoculado com Trypanosoma cruzi há 1 ano.

PAS, 500 x.

A membrana basal das alças capilares glomerulares apresenta-se espessada, havendo, além disso, material PAS positivo nas áreas mesangiais.

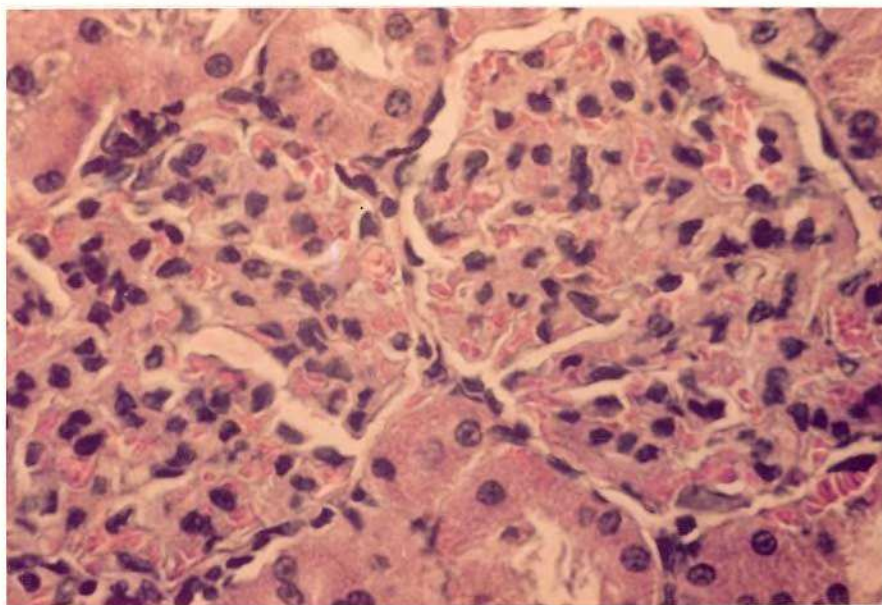


Figura 2. Rim, rato inoculado com Trypanosoma cruzi há 1 ano.

H.E., 500 x.

Os glomérulos apresentam grande número de núcleos, o que revela hiper celularidade.



Figura 3. Rim, rato inoculado com Trypanosoma cruzi há 1 ano.

Resultado da imunofluorescência com soro-
anti-gama globulina de rato, conjugado com
isotiocianato de fluoresceína.

250 x.

O material fluorescente localiza-se, prin-
cipalmente, sobre a membrana basal dos glo-
mérulos.

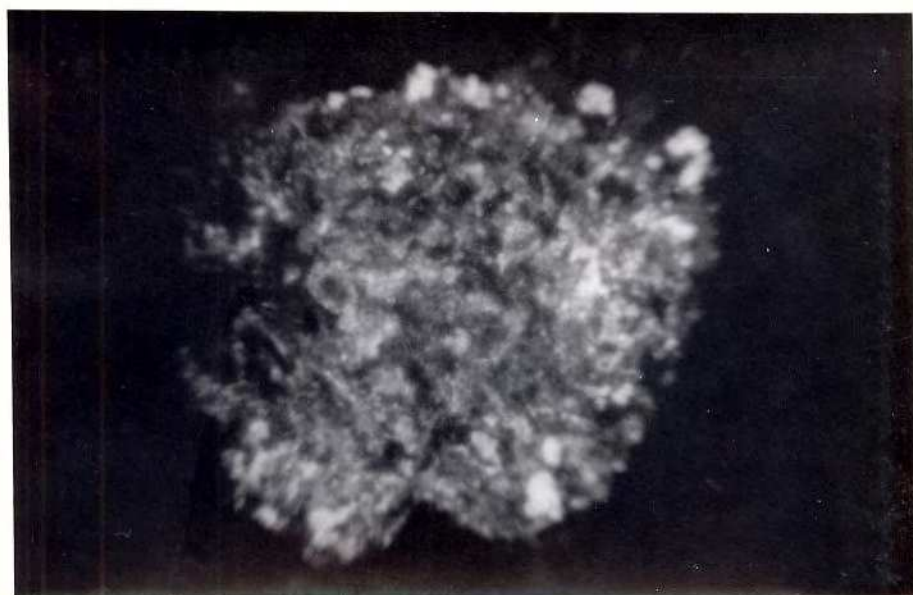


Figura 4. Rim, rato inoculado com Trypanosoma cruzi há 1 ano.

Resultado da imunofluorescência com soro-
anti-gama globulina de rato, conjugado -
com isotiocianato de fluoresceína.

480 x.

O material fluorescente localiza-se, prin-
cipalmente, sobre a membrana basal dos -
glomérulos.



Figura 5. Rim, rato inoculado com Trypanosoma cruzi há 6 meses.

Resultado da imunofluorescência com soro-
anti-complemento de rato, conjugado com -
isotiocianato de fluoresceína.

850 x.

A membrana basal se apresenta fluorescente,
em quase toda sua extensão.

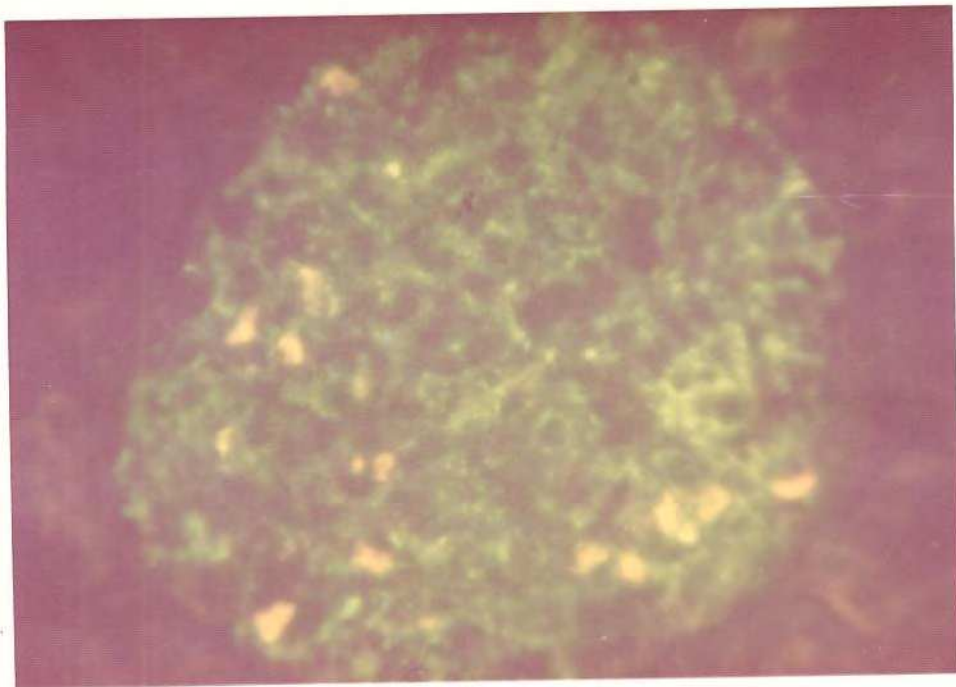


Figura 6. Rim, rato inoculado com Trypanosoma cruzi há 6 meses.

Resultado da imunofluorescência com soro-
anti-complemento de rato, conjugado com -
isotiocianato de fluoresceína.

680 x.

A membrana basal se apresenta fluorescen-
te, em quase toda sua extensão.



Figura 7. Rim, rato inoculado com Trypanosoma cruzi há 1 ano.

Microscopia eletrônica.

26.000 x.

A membrana basal apresenta-se espessada, - com estrutura homogênea e finamente granular, tendo perdido a estrutura normal. O - aspecto granular da membrana basal pode - ser interpretado como consequência da deposição de imunocomplexos. Os podócitos não - apresentam alterações morfológicas aparentes.



Figura 8. Rim, rato inoculado com Trypanosoma cruzi há 1 ano.

Microscopia eletrônica.

33.000 x.

A membrana basal apresenta-se espessada, com estrutura homogênea e finamente granular, tendo perdido a estrutura normal. O aspecto granular da membrana basal pode ser interpretado como consequência da deposição de imunocomplexos. Os podócitos não apresentam alterações morfológicas aparentes.

IV. D I S C U S S Ã O

Dois mecanismos imunológicos parecem responsáveis pelo aparecimento das nefropatias (33,47) ;o primeiro mecanismo, depende da formação de anticorpos contra-componentes antigênicos da membrana basal glomerular, e - ocorre quando se usa o soro nefrotóxico; o segundo mecanismo, decorre da formação de antígeno-anticorpo circulante, - que se deposita na membrana basal renal.

Os complexos de antígeno-anticorpo se depositam nos rins por mecanismos ainda obscuros. Todavia, - conhecem-se alguns fatores que contribuem para tal deposição (47). Dentre esses está, em primeiro lugar, a insuficiência do mecanismo defensivo do rim, exercido pelo mesângio, responsável pelo " clareamento " dos imunocomplexos;o aumento da pressão hidrostática, no glomérulo, facilita, - também, a deposição dos complexos; o aumento da permeabilidade vascular, conseqüente a liberação de aminas vaso-ativas, localmente, contribui também, para a deposição dos - complexos. A liberação dessas aminas é determinada tanto - pela ativação do sistema do complemento, como pela própria deposição dos imunocomplexos. A concentração baixa, porém-permanente de imunocomplexos, é fator determinante da deposição desses complexos. Finalmente, devem ser ainda considerados os indivíduos que desenvolvem a nefropatia, devido a fatores genéticos, e que são catalogados como portadores de " predisposição genética ".

De acôrdo com a persistência de imunocom -

plexos presentes na circulação, poderá desenvolver-se -
glomerulonefrite aguda ou crônica. Quando o estímulo anti-
gênico se faz lentamente, por injeções repetidas do anti-
geno, desenvolve-se glomerulonefrite crônica, com grande -
quantidade de imunocomplexos depositados.

São três os padrões de comportamento de -
animais submetidos ao estímulo antigênico (47):

1. resposta exagerada na formação de anti-
corpos. O excesso desses anticorpos determina a formação -
de imunocomplexos, de grande peso molecular, insolúveis, e
sua deposição em determinados pontos do organismo. Em con-
dições habituais, esses imunoagregados são rapidamente -
eliminados pelos fagócitos:

2. não há formação de anticorpos e não -
haverá, como consequência, condições para o desenvolvimen-
to de uma reação imunológica:

3. formação discreta ou moderada de anti -
corpos, surgindo na circulação, imunocomplexos solúveis, -
com excesso de antígeno livre, que vão se depositar na -
membrana basal glomerular, provocando o aparecimento das -
lesões renais.

A consequência da deposição dos imunocom -
plexos será o estabelecimento de uma série de aconteci -
mentos, tais como a atração de linfócitos não sensibiliza -
dos e a ativação dos sistemas do complemento e da coagula-
ção intra-vascular, provocando as lesões glomerulares -
(4,7,23,33,38,43,47).

Alguns mecanismos de lesão glomerular, por-
processos de natureza imunológica, são já conhecidos. Há -

evidência experimental de que a ativação do sistema do complemento desempenhe importante papel nesse particular (4, 7, 19, 21, 26, 33, 34, 35, 39).

A ativação fisiológica do complemento, no tecido, se faz através de, pelo menos, duas vias, ambas compreendendo a ativação de C'3. Na via clássica, a ativação de C'1 por imunocomplexos (C'1q unindo-se ao anticorpo) leva a formação da C'3 convertase ($\overline{\text{C}'14b,2a}$), que catalisa a ativação de C'3. A ativação de C'3 pode, também, ocorrer pela via alternativa, ou do sistema properdina, a partir de lipopolisacarídeos. Ambas as vias geram a formação de dois fragmentos: C'3b, o maior deles, desempenha importante papel na gênese das glomerulonefrites; C'3a, o outro fragmento, através da sua atividade anafilotóxica, facilita a fixação dos imunocomplexos na membrana basal glomerular, em virtude do aumento da permeabilidade da parede capilar que acarreta. Esse fragmento promove, também, a atração de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos, responsáveis pela fagocitose dos imunocomplexos. Lesão celular por liberação de enzimas lisosômicas e captação de informações antigênicas, através de linfócitos não sensibilizados atraídos, são devidas, também, a esse fragmento que promove, ainda, a ativação do fator XII (Hageman), desencadeando, por agregação plaquetária, ativação do sistema de coagulação.

O fragmento C'3b facilita a imunocitoaderência, aumentando a capacidade de fagocitose e, também, ativando o fator da properdina, perpetua o mecanismo de lesão. Além disso, o fragmento C'3b une-se a partículas

ativadoras liberando, em consequência, C'3a e C'5a. Esses dois peptídeos produzem edema, por liberação de histamina, a partir dos mastócitos, e por aumento da permeabilidade da parede capilar. Haverá, em seguida, ativação de todo o sistema do complemento, até à formação de C'9, que por sua vez, através da liberação de hidrolases, pelos polimorfonucleares neutrófilos, conduz à lise celular. Com isso, haverá liberação de componentes celulares, os quais poderão desempenhar o papel de neo-antígenos. Esses, a seu termo, podem produzir novos mecanismos imunológicos, com perpetuação da ação lesiva.

Além disso, há também ativação, pelo sistema do complemento, do fator Hageman (15,32,33), com consequente desencadeamento do sistema intrínseco da coagulação, resultando na formação da fibrina. Se, concomitantemente, não houver suficiente ação fibrinolítica pela plasmina, haverá formação de tecido fibroso no glomérulo (48). O fator Hageman ativa a cininogenase que, ativando o sistema das cininas plasmáticas, produz aumento da permeabilidade vascular, favorecendo a deposição dos imunocomplexos (15). Há evidências de que, a plasmina ativaria o sistema do complemento, através da via clássica, o que resultaria em mais uma forma de auto-perpetuação da nefropatia (30).

Os resultados histológicos, ao microscópio óptico, tanto nos animais inoculados há 6 meses com Trypanosoma cruzi, quanto nos inoculados há 1 ano, demonstram alterações renais localizadas principalmente nos glomérulos. Essas alterações são traduzidas pelo espessamento da membrana basal e pela presença de material PAS positivo -

depositado no interstício, entre as alças capilares dos glomérulos. Os resultados da imunofluorescência, revelam a presença de imunoglobulina, complemento e fibrinogênio, na membrana basal do glomérulo, na maioria dos animais inoculados experimentalmente com Trypanosoma cruzi. O estudo morfológico, ao microscópio eletrônico, confirma e amplia os conhecimentos concernentes às alterações morfológicas da membrana basal dos glomérulos, obtidas pela microscopia óptica. Correlacionando esses três resultados, pode-se admitir que as alterações morfológicas da membrana basal constituem uma decorrência da presença de imunocomplexos em sua intimidade, os quais seriam responsáveis pelo estabelecimento da nefropatia em grande parte dos animais inoculados com Trypanosoma cruzi.

Nas condições em que trabalhamos, a demonstração da presença de antígenos específicos livres ao nível do glomérulo, foi negativa. Isso faz supor que o antígeno específico esteja agregado, formando complexos, e não sob a forma livre. Entretanto, é possível que o teste de anticorpos específicos dos soros utilizados não tenha sido suficientemente potente para revelar a presença de antígenos livres de Trypanosoma cruzi nos glomérulos.

Estudos posteriores devem ser realizados, incluindo observações no homem. O estudo das funções renais, também, deve constituir objetivo de estudos posteriores sobre a nefropatia, não somente em animais experimentalmente inoculados com Trypanosoma cruzi, quanto em seres humanos portadores da doença de Chagas.

V. CONCLUSÕES

1. Ratos experimentalmente inoculados com Trypanosoma cruzi, e estudados após 6 meses ou 1 ano, apresentam lesões renais, principalmente glomerulares, numa alta incidência:
2. As lesões glomerulares, verificadas à microscopia óptica e à microscopia eletrônica, evidenciam, sobretudo, alterações da membrana basal, caracterizadas por grande espessamento e perda focal da sua individualidade, além de depósitos de substância PAS positiva nas áreas do mesângio:
3. As técnicas de imunofluorescência mostram que essas alterações decorrem de mecanismos de natureza imunológica, dentre os quais o da deposição de imunocomplexos sobre a membrana basal parece ser o mais importante.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Allison, A.C.; Hendrickse, R.G.; Edington, G.M.;
Houba, V.: De Petris, S. & Adeniyi, A.: Immune -
complexes in the nephrotic syndrome of African -
children. *Lancet* 1:1232-1237, 1969.
- 2- Andrade, A.Z.: Andrade, S.G. & Sadigursky, M.: -
Renal changes in patients with hepatosplenic -
Schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20: 77-83,
1971.
- 3- Andrade, Z.A. & Iabuki, K.: A nefropatia do cala-
zar, *Rev. Int. Med. Trop. São Paulo.* 14:51-54, 1972
- 4- Berger, J.; Noel, L.M. & Yanerva, H.: Complement-
deposition in the kidney, In: Hamburger, J.: Cros-
nier, J. & Maxwell, M.H.: *Advances in Nephrology*,
Year Book Medical Publishers, Chicago, 4:37-48,-
1974.
- 5- Berger, M.; Birch, L.M. & Conte, N.F.: The nephro-
tic syndrome secondary to acute glomerulonephri-
tis during falciparum malaria. *Ann. Int. Med.*; 67-
1163-1171, 1967.
- 6- Berggren, W.H. & Weller, T.H.: Immuno-electrophore-
tic demonstration of specific circulating antigen
in animals infected with schistosoma mansoni.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 16: 606-612, 1967.
- 7- Berthoux, F.C.; Carpenter, C.B.; Traeger, J. & -
Merrill, J.P.: The C3 nephritic factor (C3 NeF)-

- and the heat labile complement inactivator (HLCI) in chronic hipocomplementemic mesangioproliferative glomerulonephritis. In Hamburger, J.; Crosnier, J. & Maxwell, M.H.: *Advances in Nephrology*, Year Book Medical Publishers, Chicago, 4:91-108, 1974.
- 8- Boonpucknavig, S.; Boonpucknavig, V. & Bhamarapratvat, N.: Immunopathological study of Plasmodium berthei-infected mice. Immune complex nephritis. *Arch. Path.* 94: 322-330, 1972.
- 9- Boonpucknavig, V.; Boonpucknavig, S. & Bhamarapratvat, N.: Plasmodium berthei infection in mice. An ultrastructural study of immune complex nephritis. *Am. J. Pathol.* 70: 89-99, 1973.
- 10- Braunstein, G.B.; Lewis, E.J.; Galvane, E.G.; Hamilton, A. & Bell, W.L.: The nephrotic syndrome associated with secondary syphilis. An Immune deposit disease. *Am. J. Med.* 48: 643-648, 1970.
- 11- Bright, R.: *London Medical Gazette*, 12: 378, 1833. Cit Cameron, J.S.: Bright's disease today: pathogenesis and treatment of glomerulonephritis- I, II, - III. *Br. Med. J.* 4: 87-90, 160-163, 217-220, 1972.
- 12- Brito, T.; Hoshino-Shimizu, S.; Amato Neto, V.; Duarte, I. S. & Penna, D.O.: Glomerular involvement in human Kala-azar a light, immunofluorescent and electron microscopic study based on kidney biopsies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 9-18, 1975.
- 13- Brener, Z.: Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. Tese de Docência-

livre apresentada à Faculdade de Odontologia e Farmácia da Un. de M.G., Belo Horizonte, 1961.

- 14- Burkholder, P.M.: Immunology and immunohistopathology of renal diseases. In Becker, E.L.: Structural basis of renal disease, Hoeber Medical Division, New York, 197-237, 1968.
- 15- Cameron, J. S.: Bright's disease today: pathogenesis and treatment of glomerulonephritis - I,II,III. Br.Med.J. 4: 87-90, 160-163, 217-220, 1972.
- 16- Carvalhal, S.; Saad, F.A. & Modesto, N. P.: Considerações sobre a patogênese da moléstia de Chagas. Rev. Goiana Med. 19 : 1-20, 1973.
- 17- Escherich & Schick .Cit. Earle, D.P.: Glomerulonephritis, In Beeson, P.B.: Textbook of Medicine, W. B. Saunders Company, Philadelphia-London, 11th edition, 822, 1963.
- 18- Falcão, H.A. & Gould, D.B.: Immune complex nephropathy in Schistosomiasis. Ann. Int.Med. 83 -148 - 154, 1975.
- 19- Fearon, T.D.; Ruddy, S.; Knostman, J.D.; Carpenter, C.B. & Austen, K.F.: The functional significance of complement. In Hamburger, J.; Crosnier, J. & Maxwell, M.H.: Advances in Nephrology, Year Book Medical Publishers, Chicago 4: 15-35, 1974.
- 20- Habib, R.: Glomerulopathies. In Royer, P.; Habib, R., Mathieu M. & Broyer, M.: Pediatric Nephrology, Walsh, A. & W. B. Saunders Company, Philadelphia-London, 205-214, 1973.

- 21- Habib, R.; Loirat, C.; Gubler, Mc & Levy, M.; Morphology and serum complement levels in membranoproliferative glomerulonephritis. In Hamburger, J.; - Crosnier, J. & Maxwell, M. H.:Advances in Nephrology, Year Book Medical Publishers, Chicago, 4:109 - 136, 1974.
- 22- Herdman, R.C.; Hong, R.; Michael, A.F. & Good, R.-A.: Light chain distribution in immune deposits on glomeruli of kidneys in human renal diseases.J.Clin. Invest. 46: 141-145, 1967.
- 23- Herdman, R.C. & Urizar, R.E.: Coagulopathy in renal disease including hemolytic-uremic syndrome. In Rubin, M.I.: Pediatric Nephrology, Williams and - Wilkins Company, Baltimore, 189-216, 1975.
- 24- Krishman, C.& Kaplan, M.H.: Immunopathologic studies of systemic lupus erythematosus. II. Antinuclear reaction of globulin eluted from homogenate - and isolated glomeruli of kidneys from patients - with lupus nephritis. J.Clin. Invest. 46- 569-579,- 1967.
- 25- Lambert, P.H. & Houba, V.: Immune complexes in parasitic diseases. Progress in Immunol. 5: 57-67. - 1974.
- 26- Lambert, P. H.; Perrin, L.H.; Mahien, P.;Nydegger, U.E.& Miescher, P.A.: Activation of complement in human nephritis.In Hamburger, J.; Crosnier, J.& Maxwell, M.H.; Advances in Nephrology, Year Book - Medical Publishers, Chicago 4: 79-90, 1974.

- 27 - Lehman, D. H.; Wilson, C. B. & Dixon, F. J.; Extra-glomerular immunoglobulin deposits in human nephritis. Am. J. Med. 58: 765-786, 1975.
- 28 - Lindemann, W.: Ann. Inst. Pasteur 14: 49, 1900. Cit. Unanue, E.R. & Dixon, F.J.: Experimental glomerulonephritis: immunological events and pathogenetic mechanisms. Adv. in Immunology 6: 1-90, 1967.
- 29 - Masugi, M. Cit. Earle, D. P.: Glomerulonephritis, In Beeson, P. B.: Textbook of Medicine, W.B. Saunders Company, Philadelphia- London, 11th edition, 822, 1963.
- 30 - McCluskey, R. T.: Immunologic mechanisms in renal disease. In Heptinstall R. H.: Pathology of the kidney, Little, Brown and Company, Boston, 1: 273-317, 1974.
- 31 - McCluskey, R.T. & Klassen, J.: Immunologically mediated glomerular, tubular and interstitial renal disease. N. Engl. J. Med. 288: 564-569, 1973.
- 32 - McCluskey, R.T.; Vassalli, P.; Gallo, G. & Baldwin, D. S.: An immunofluorescent study of pathogenic mechanisms in glomerular disease. N. Engl. J. Med. 274: 695-700, 1966.
- 33 - Merrill, J. P.: Glomerulonephritis. N. Engl. J. Med. 290: 257-266; 313-319; 374-381, 1974.
- 34 - Michael, A.F. & McLean, R. H.: Evidence for activation of the alternate pathway in glomerulonephritis. In Hamburger, J.; Crosnier, J. & Maxwell, M. H.: Advances in Nephrology, Year Book Medical

Publishers, Chicago 4: 49-66, 1974.

- 35 - Muller- Eberhard, H. J.: The complement system -
and nephritis. In Hamburger, J.; Crosnier, J. & -
Maxwell, M. H.: Advances in Nephrology 4: 3-13, -
1974.
- 36 - Nagle, R. B.; Ward, P.A. ; Lindsley, H.B.; Sadun, -
E. H.; Johnson, A.J.; Berkaw, R.E. & Hildebrandt, -
P. K.; Experimental infections with African Try -
panosomes. VI. Glomerulonephritis involving the -
alternate pathway of complement activation. Am. J. -
Trop. Med. Hyg. 23 : 15-26, 1974.
- 37 - Pereira da Silva, L.H. & Nussenzweig, V.: Sobre -
uma cepa do Trypanosoma cruzi altamente virulenta
para o camundongo branco. Folia Clin. Biol. 20:191-
208, 1953.
- 38 - Peters, D.K. & Williams, D.G.; Complement and -
mesangiocapillary glomerulonephritis; the role of
complement deficiency in glomerulonephritis. In -
Hamburger, J.; Crosnier, J. & Maxwell, M.H.: Ad -
vances in Nephrology, Year Book Medical Publi -
shers, Chicago 4: 79-90, 1974.
- 39 - Peters, D.K. & Williams, D.G.: Complement in di -
seases of the kidney. In Rubin, M.I.: Pediatric -
Nephrology, Williams and Wilkins Company, Baltimo -
re, 177-188, 1975.
- 40 - Queiroz, F.P.; Brito, E.; Martinelli, R. & Rocha -
H.: Nephrotic syndrome in patients with Schistosoma
mansoni infection.

- Am. J. Trop. Med. Hyg. 22: 622-628, 1973.
- 41 - Sadun, E. H.; Johnson, A. J.; Nagle, R.B. & Dux -
bury, R. E.: Experimental infections with Afri -
can Trypanosomes. V. Preliminary parasitological,
clinical, hematological, serological, and patholo -
gical observations in Rhesus Monkeys infected -
with *Trypanosoma rhodesiense*. Am. J. Trop. Med. -
Hyg. 22: 323-330, 1973.
 - 42 - Silva, L.C.; Brito, T.; Camargo, M.E.; Boni, D.R.
Lopes, J.D. & Gunji, J.: Kidney biopsy in the hepa -
tosplenic form of infection with *Schistosoma man -*
soni in man. Bull. Wld. Hlth. Org. 42: 907-910, 1970.
 - 43 - Spiro, R. G.: Biochemistry of the renal glomerular
basement membrane and its alterations in diabetes
mellitus. N. Engl. J. Med. 288: 1337-1342, 1973.
 - 44 - Teixeira, A.R.L. & Santos-Buch, C.A.: The immuno -
logy of experimental Chagas' disease. I. Prepara -
tion of *Trypanosoma cruzi* antigens and humoral -
antibody response to these antigens. J. Immunol. -
113: 859-869, 1974.
 - 45 - Teixeira, A. R. L. & Santos-Buch, C.A.: The immu -
nology of experimental Chagas' disease. II. Delayed
hipersensitivity to *Trypanosoma cruzi* antigens.
Immunology 28: 401-410. 1975.
 - 46 - Teixeira, A. R. L.; Teixeira, M.L. & Santos -Buch,
C. A.: The immunology of experimental Chagas' -
disease. IV. Production of lesions in rabbits -
similar to those of chronic Chagas' disease in -

- man. Am. J. Pathol. 80: 163-178, 1975.
- 47 - Unanue, E. R. & Dixon, F. J.; Experimental glomerulonephritis: immunological events and pathogenetic mechanisms. Adv. in Immunology 6: 1-90, 1967.
- 48 - Vassalli, P. & Mc Cluskey, R. T.: The pathogenic role of the coagulation process in rabbit Masugi-nephritis. Am. J. Pathol. 45: 653-665, 1964.
- 49 - Von Pirquet, C.E. : Arch. Internal Med. 7 :259, - 1911, Cit. Unanue, E.R. & Dixon, F. J.: Experimental glomerulonephritis: immunological events - and pathogenetic mechanisms. Adv. in Immunology - 6: 1 - 90, 1967.
- 50 - Ward, P.A. & Kibukamusoke, J. W.: Evidence for - soluble immune complexes in the pathogenesis of - the glomerulonephritis of quartan malaria. Lancet 1: 283-285, 1969.