

Detecção de complexos imunes circulantes na hanseníase utilizando C¹q humano e eqüino

TERESA A E. KLEEMANN (*)

RUBENS GUIMARAES FERRI (**)

JUNIA CHAVES (***)

IONE IRULEGUI (****)

CELIDÉIA A. COPPI VAZ (*****)

Com assistência técnica de Zóla Telles Wullert de Souza

RESUMO — Observou-se a presença de complexos imunes circulantes (IC) em soros de pacientes de hanseníase virchowiana com e sem eritema nodoso. Estes IC foram detectados por sua reação com o componente CA do complemento, após prévia concentração dos IC por poletileno-glicol (PEG) e solubilização em tampão borato. A presença dos IC foi confirmada por redução e alquilação dos IC seguida de nova difusão contra C₁q.

Termos índice: Hanseníase. Complexos Imunes C¹q.

INTRODUÇÃO

A presença de IC circulantes já foi observada por alguns autores em soros de pacientes de hanseníase (7, 9, 11), especialmente durante o estado de reação do tipo eritema nodoso; também foi verificada, por imunofluorescência, em áreas da derme de pacientes em reação, a presença de imunoglobulinas e complemento (12).

A finalidade deste trabalho é detectar os IC circulantes em soros de hansenianos virchowianos com e sem eritema nodoso, utilizando a propriedade que possuem alguns desses complexos de formar precipitados, em gel difusão, com o componente C₁q do complemento (13). Estes precipitados não se formam quando os IC são reduzidos e alquilados (1). Para a detecção dos IC foi utilizado C₁q obtido de soro humano e de soro de cavalo.

(*) Pesquisador científico, Divisão de Hansenologia e Dermatologia Sanitária, Instituto de Saúde, São Paulo, Brasil.

(**) Professor Adjunto, Departamento de Microbiologia e Imunologia (Centro de Pesquisas Imunoquímicas), Instituto de Ciências Biomédicas, USP.

(***) Professor Assistente, Departamento de Medicina Tropical e Dermatologia, Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, USP.

(****) Professor Assistente, Departamento de Medicina Preventiva, Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, USP.

(*****). Biologista, Centro de Pesquisas Imunoquímicas, ICB, USP.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros — Foram estudados 9 soros de pacientes virchowianos sem eritema nodoso e virgens de sulfonoterapia e 14 soros de pacientes virchowianos com eritema nodoso; 12 destes pacientes estavam sob tratamento com talidomida e corticoesteróides e 2 eram virgens de tratamento anti-hansênico e anti-reacional. Os soros foram rapidamente separados a 4°C, filtrados em "Millipore" (0,2 µm) e conservados a -70°C para evitar a possibilidade de agregação de componentes séricos.

Foram estudados 4 soros normais e um "pool" de soros normais que receberam o mesmo tratamento dispensado aos soros patológicos.

Preparação de C₁q humano e eqüino — Foram utilizadas 2 preparações de C₁q obtido de soro humano normal nas concentrações de 1,7 mg/ml e 2,5 mg/ml respectivamente e uma preparação de C₁q obtido de soro de cavalo (*Equus caballus*) cuja concentração foi de 7,3 mg/ml. Para o preparo do C₁q humano foram utilizados aproximadamente 800 ml de soro humano de vários doadores e para o preparo do C₁q de cavalo 800 ml de soro provenientes de 2 cavalos. A técnica utilizada foi a de Winchester & Agnello (13), já aplicada pelos presentes autores (5), empregando-se DNA tipo I e DNase tipo ST (Sigma). A identificação e atividade das preparações de C₁q humano foram verificadas por imunodifusão contra anti-C₁q humano (Bioware) e aglutinação de partículas de látex recobertas por fração II (6,8). Para controle positivo foi empregada gamaglobulina humana (Behringwerke) agregada que, por imunoeletroforese, revelou IgG e impureza de IgA e IgM; a agregação foi feita pelo calor, de acordo com o método de Muller-Eberhard & Kunkel (10). A concentração final utilizada

foi de 1 mg de proteína/ml, que contém cerca de 2/3 de agregados de 90-1105, segundo estes Autores. A IgG humana sob forma monomérica também na concentração protéica de 1 mg/ml, serviu como controle negativo.

Concentração dos IC — A concentração dos IC foi feita por precipitação dos soros por polietilenoglicol (PEG) 6.000 (Sigma) segundo técnica de Zubler et al. (14). Após tratamento com PEG, na concentração final de 4%, os precipitados foram separados em 2 alíquotas, sendo uma dissolvida em tampão borato 13118,3 (14) e a outra dissociada em tampão glicina-HCl p112,8, segundo Bout et al. (4). Após esses tratamentos o material foi centrifugado utilizando-se os sobrenadantes, os quais, se não empregados imediatamente, foram conservados a -70°C. Os soros normais receberam o mesmo tratamento, isto é, o precipitado por PEG, dividido em 2 alíquotas dissolvidas respectivamente em tampão borato ou glicina.

Imunodifusão em gel de agarose — Para verificar a presença de IC nos precipitados obtidos com PEG a 4% e solubilizados, foi feita a difusão dos mesmos contra C₁q. Estas reações de precipitação por C₁q permitem identificar complexos imunes. A imunodifusão foi realizada de acordo com a técnica de Winchester & Agnello (13). A agarose foi preparada na concentração de 0,6%, porém, em solução salina tamponada (P.B.S.), ILO,11 EDTA 0,01 M pH7,2, pois nas condições de Winchester & Agnello obtêm-se reações positivas com soros normais ou mesmo IgG monomérica como observam estes Autores.

Redução e alquilação dos IC — Os IC precipitados pelo PEG, suspensos em tampão borato, foram submetidos, segundo Agnello et al. (1), a processo de redução com 2-mercaptoetanol (Sigma)

0,1 M, feita durante 24 horas, seguida de alquilação por diálise contra 2-iodoacetamida (Sigma) 0,1 M. A redução foi feita com a finalidade de diferenciar a reação devida a IC daquelas devidas a endotoxinas. Todas as preparações, após este tratamento, foram experimentadas contra C1q por gel difusão.

RESULTADOS

Dos 14 soros de pacientes com eritema nodoso, 12 deram reação com C1q em gel difusão, e dos 9 sem eritema nodoso, apenas 2 formaram linha de precipitação com C1q, sugerindo a presença de complexos imunes circulantes.

Os IC precipitados por PEG reagiram com C1q quando dissolvidos em tampão borato; quando tratados com tampão glicina não reagiram, fato que

indica a dissociação dos IC. Os soros normais após tratamento com PEG não reagiram com C1q, dissolvidos ou dissociados em tampão borato e tampão glicina respectivamente (Fig. 1). Após redução e alquilação dos IC presentes nos soros não houve reação contra C1q (Fig. 2). Houve exceção do soro de um paciente com eritema nodoso que, mesmo após redução e alquilação, continuou reagindo com C1q, não devendo a reação ser devida à presença de IC. C1q de soro de cavalo, preparado da mesma maneira que C1q humano (8), foi também experimentado em gel difusão contra um soro normal e 3 provenientes de pacientes com reação hansênica. Observaram-se linhas de precipitação com os soros patológicos, mas não com soro normal, sendo estas linhas, entretanto, de menor intensidade do que aquelas observadas quando foi utilizado C1q humano (Fig. 3).

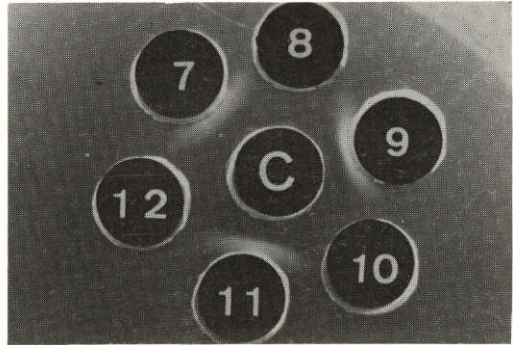
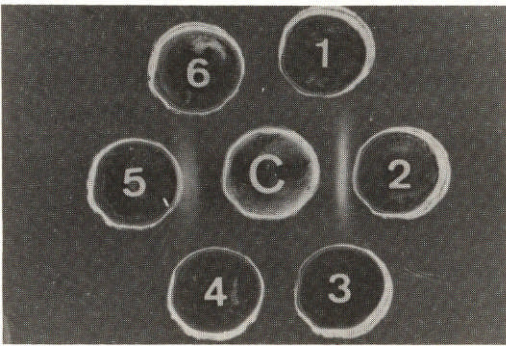


Fig. 1 — Reação contra C1q humano (1,7 mg/ml)

C — C1q.

- 1 — IgG humana monomérica.
- 2 — IgG humana agregada.
- 3 — Soro humano normal tratado com PEG e tampão borato.
- 4 — O mesmo soro tratado com PEG e tampão glicina.
- 5 — Soro de paciente em reação tratado com PEG e tampão borato.
- 6 — O mesmo soro tratado com PEG e tampão glicina.
- 7 — Soro de paciente em reação tratado com PEG e tampão borato.
- 8 — O mesmo soro tratado com PEG e tampão glicina.
- 9 — Soro de paciente em reação tratado com PEG e tampão borato.
- 10 — O mesmo soro tratado com PEG e tampão glicina.
- 11 — Soro de paciente em reação tratado com PEG e tampão borato.
- 12 — O mesmo soro tratado com PEG e tampão glicina.

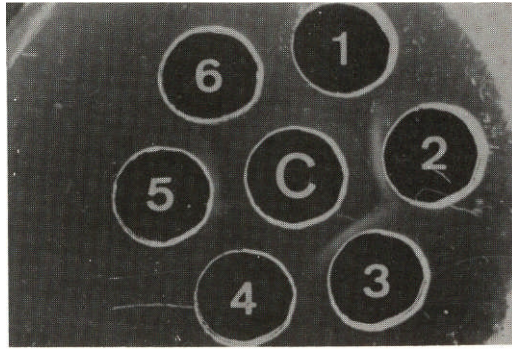


Fig. 2 — Reação contra C1q humano (2,5 mg/ml)

C — C¹q

1 — IgG humana monomérica.

2 — IgG humana agregada.

3 — Soro de paciente em reação tratado com PEG e tampão borato.

4 — O mesmo soro após redução e alquilação.

5 — Soro de paciente em reação tratado com PEG e tampão borato.

6 — O mesmo soro após redução e alquilação.

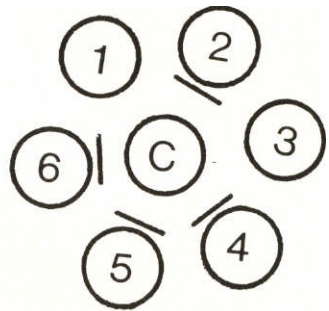
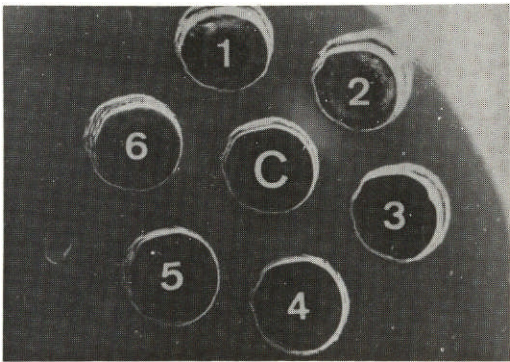


Fig. 3 — Reação contra C¹q eqüino (7,1 mg/ml)

C — C₁q eqüino.

1 — IgG humana monomérica.

2 — IgG humana agregada.

3 — Soro humano normal tratado com PEG e tampão borato.

4 — Soro de paciente em reação tratado com PEG e tampão borato.

5 — Soro de paciente em reação tratado com PEG e tampão borato.

6 — Soro de paciente em reação tratado com PEG e tampão borato.

(Nota: à direita está o esquema da fotografia em virtude da falta de nitidez das linhas de precipitação)

DISCUSSÃO

Através do processo de redução confirmou-se a presença de IC em soros de pacientes virchowianos e especialmente em soros de pacientes com reação hansênica.

A natureza dos complexos aqui estudados, que reagem com C_q, não é ainda suficientemente conhecida.

O fato do soro de um paciente ter apresentado reação positiva contra CA mesmo após redução sugere a presença de endotoxinas, talvez antígenos liberados pelo *Mycobacterium, leprae*. Este resultado indica ser necessário cuidadoso critério na interpretação das reações positivas com C_q em casos de hansenianos. Os trabalhos já mencionados (7, 9, 11) não referem redução e alquiação dos supostos IC.

Após o tratamento dos IC com tampão borato, observou-se solubilização parcial do material; este foi centrifugado utilizando-se o sobrenadante que deu reações positivas com C_q, confirmando assim a presença de IC. Os IC precipitados pelo PEG foram dissociados pelo tampão glicina, não revelando linhas de precipitação.

Os resultados obtidos indicam que o C_q de cavalo também pode ser utilizado para a detecção de IC circulantes. Na verdade, experimentamos uma única

preparação de C_q de cavalo e esta forneceu linhas bem menos intensas que o C_q preparado de soro humano, apesar de sua maior concentração.

A reação do tipo eritema nodoso apresenta aspectos clínicos, histopatológicos e imunológicos que sugerem deposição de complexos antígeno-anticorpo. Bonomo & Dammaco (3) observaram casos de reação hansênica com crioglobulinemia do tipo IgG e IgM e sugerem que algumas manifestações que aparecem no tipo virchowiano, tais como o comprometimento renal e o próprio eritema nodoso, possam ser devidas à deposição de IC.

Gelber *et al.* (7) estudaram a precipitação dos IC de soros de hansenianos antes, durante e após o surto reacional e sugerem que a presença dos IC esteja relacionada ao surto.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a presença de IC circulantes principalmente nos soros de pacientes com eritema nodoso. O estudo seriado dos soros de um grupo de pacientes em diferentes fases do eritema nodoso e da relação entre a presença de IC e terapia anti-reacional, especialmente com a talidomida, bem como o estudo da natureza dos IC, seriam de grande importância para melhor conhecimento da imunopatogênese do eritema nodoso hansênico, com seu variado quadro clínico.

Agradecimentos: — A Dra. Maria Zélia Camargo, Diretora Técnica do Hospital Padre Bento, pelo fornecimento de soros de pacientes em reação. A dna. Hercilia Costa Quirino, pela colheita de soros.

SUMMARY

Presence of soluble immune complexes (IC) was observed in sera of Virchowian hanseniosis patients; some of these patients presented active erythema nodosum. These IC were detected by their reactivity with the C_q component of the complement. The IC were previously precipitated by polyethylene-glycol (PEG) and dissolved in borate buffer. The presence of IC was confirmed by reduction with 2-mercapto-ethanol and alquillation with 2-iodoacetamide followed by new C_q reactions and no precipitin lines were obtained.

Key words: Hanseniosis, Immune complexes, C¹_q.

REFERENCIAS

1. AGNELLO, V.; GABRIEL JR, A.; MINDY TAI, B.A. Detection of immune complexes. *J. Invest. Derm.*, 67(3) :339-345, 1976.
2. AGNELLO, V.; WINCHESTER, R.J.; KUNKEL, H.G. Precipitin reactions of the Clq component of complement with aggregated gamma-globulin and immune complexes in gel diffusion. *Immunology*, 19:909-919, 1970.
3. BONOMO, L. & DAMMACCO, F. Immune complex cryoglobulinaemia in lepromatous leprosy: a pathogenetic approach to some clinical features of leprosy. *Clin. Exp. Immunol.*, 9:175-181, 1971.
4. BOUT, D.; SANTORO, F.; CARLIER, Y.; CAPRON, A. Imuno-complexos na esquistossomose. III. Caracterização das imunoglobulinas e dos antígenos implicados no IC. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 19(1) :35-38, 1977.
5. CHAVES, J.; FERRI, R.G.; KLIEMANN, T.A.E.; IRULEGUI, I. Complexos imunes circulantes na doença de Chagas experimental. Identificação de antígenos parasitários nos complexos. [No prelo]
6. EWALD, R.W. & SCHUBART, A.F. Agglutinating activity of the complement component C₁q in the F-II latex fixation test. *J. Immunol.*, 97(1):100-106, 1966.
7. GELBER, R.H.; EPSTEIN, W.V.; FASAL, P.; DRUTZ, D.J. Detection of circulating immune complex-like activity in the sera of patients with erythema nodosum leprosum. In: LEPROSY RESEARCH CONFERENCE, 7th, Menlo Park Ca., 1972. *Program* apud *Int. J. Lepr.*, 40(2):218-219, 1972.
8. JUNQUEIRA, L.C.; BIGNOLAS, G.; FERRI, R.G.; CHAVES, J.; KLIEMANN, T.A.E. Staining of Clq protein from human and horse complement with dye Sirius Red. [No prelo]
9. MORAN, C.J.; RYDER, G.; TURK, J.L.; WATERS, M.F.R. Evidence for circulating immune complexes in lepromatous leprosy. *Lancet*, 2(7777): 572-573, 1972.
10. MULLER EBERHARD, H.J. & KUNKEL, H.G. Isolation of a thermolabile serum protein which precipitates gamma-globulin aggregates and participates in immune hemolysis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 106(2):291-295, 1961.
11. ROJAS-ESPINOSA, O.; MENDEZ- NAVARRETE, I.; ESTRADA-PARRA, S. Presence of Clq-reactive immune complexes in patients with leprosy. *Clin. Exp. Immunol.*, 12:215-223, 1972.
12. WEMAMBU, S.N.C.; TURK, T.L.; WATERS, M.F.R., REES, R.J.W. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the Arthus phenomenon. *Lancet*, 2:933-935, 1969.
13. WINCHESTER, R.J. & AGNELLO, V. Detection of immune complexes by direct precipitation with C₁q or I.M rheumatoid factors. *Ann. Rheum. Dis.*, 36(suppl.) :35-36. 1977.
14. ZUBLER, R.H.; PERRIN, L.H.; CREIGHTON, W.D.; LAMBERT, P.H. Use of polyethylene glycol (PEG) to concentrate immune complexes from serum or plasma samples. *Ann. Rheum. Dis.*, 36(suppl.) :23-25, 1977.

Recebido para publicação em outubro de 1978.