

DETERMINAÇÃO DO ANTICORPO EVI NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

LEILA MARIA MACHADO VIEIRA, ALBA REGINA MACHADO VIEIRA, FRANCISCO MANES ALBANESI FILHO,
PEDRO DI MARCO CRUZ, GERALDO BATISTA DA CUNHA, EUZENIR NUNES SARNO

Anticorpos EVI foram pesquisados no soro de 25 portadores de cardiopatia chagásica acompanhados no ambulatório e em 58 pessoas provenientes de área endêmica, a maioria delas sem sintomas.

Anticorpo EVI foi encontrado em 93,10% de pacientes com doença cardíaca e em 96,61% dos demais, quando se utilizou tecido homólogo. O papel dos anticorpos EVI na doença de Chagas ainda não está esclarecido, embora o presente trabalho sugeriu ser um epifenômeno decorrente da desmodulação da pessoa imune pela infecção crônica.

Observações experimentais sugerem que o comprometimento agudo do coração na doença de Chagas está relacionado com a invasão parasitária do miocárdio. No entanto, não temos uma explicação bem definida quanto ao envolvimento crônico. Acredita-se que, em sua gênese, haja participação de mecanismo imunológicos.

Os chagásicos possuem anticorpos que reagem com extrato de coração, conforme foi demonstrado em 1960 por Kozma e col.¹ Entretanto, esses anticorpos não são específicos de cardiopatia chagásica, podendo ser encontrados na doença reumática, após o infarto do miocárdio e no pós-operatório de cirurgia cardíaca².

Em 1972, Trezza³ demonstrou, por meio de imunofluorescência indireta, a presença de anticorpo antimiocárdio, que se fixava ao nível sarcolemal-subsarcolemal, no endotélio e adventícia dos vasos, em 32,8% dos chagásicos. Porém, observou também esses achados em 56,2% dos valvopatas reumáticos operados e em 6,4% de normais. Cossio e col.⁴ em 1974 descrevem, por meio de imunofluorescência indireta, a existência de anticorpos com alta especificidade para os portadores de cardiopatia chagásica. Esses anticorpos passaram a ser conhecidos como EVI, por reagirem com endocárdio, interstício e vasos sanguíneos do coração e com o interstício de músculo esquelético, quando se utilizaram tecidos de rato como substratos.

Diversos trabalhos verificaram a especificidade desses anticorpos para a doença de Chagas, sugerindo a existência de um componente auto-imune nessa enfermidade⁵⁻⁹. Os auto - anticorpos são considerados indicadores de processos de auto-imunidade².

Recentemente, Cossio¹⁰ relatou que esses achados só eram observados quando se empregaram, como substratos, tecidos de animais, pois a utilização de coração humano como substrato tornou negativos todos os soros de pacientes chagásicos.

O objetivo deste trabalho é estudar a presença dos anticorpos EVI na cardiopatia chagásica crônica, em pacientes de ambulatório, comparando sua frequência em um grupo observado em área endêmica e em outro, de centro urbano situado fora da área endêmica, sua resposta a diferentes substratos testados e, finalmente, a observação de seu comportamento frente ao substrato representado pelo coração humano.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados, por meio de imunofluorescência indireta, 87 soros provenientes de 58 pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica, residentes na cidade de Piumhy, no sudoeste do Estado de Minas Gerais (distante 248 Km de Belo Horizonte e vizinho do município de Bambuí, onde em 1943 foi criado o primeiro posto avançado de estudos sobre

Trabalho do Setor de Cardiomiopatia do Serviço de Cardiologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto - UERJ e da Disciplina de Patologia Geral da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ.

doença de Chagas) e de 29 pacientes acompanhados no ambulatório do Setor de Cardiomiopatia do HUPE UERJ, diagnosticados com base em alterações clínicas, eletrocardiográficas, radiológicas e positividade de dois ou mais dos seguintes testes sorológicos: fixação de complemento (Reação Guerreiro-Machado), hemaglutinação e imunofluorescência indireta.

Como grupo de controle, foram utilizados 20 soros provenientes de indivíduos normais da zona endêmica de Plumhy e 20 soros de componentes do corpo técnico-administrativo do HUPE-UERJ.

Foram colhidos, por punção venosa, 10 ml de sangue de cada indivíduo. Após separação, os soros, contendo azida sódica a 0,1%, foram estocados a -20°C .

Como substratos para observação dos auto-anticorpos, foram empregados músculo esquelético, fígado e coração de rato e estômago de camundongo. Os animais utilizados eram albinos e com 4 a 6 semanas de vida, sacrificados após anestesia com éter, sendo os tecidos retirados imediatamente, clivados em fragmentos menores disposto em blocos embebidos em Tissue-Tek (Ames, OCT-Compound) e congelados em nitrogênio líquido, sendo, estocados até o uso. Posteriormente, foram obtidos em crióstato (Cryo-Cut II American Optical), cortes de e micrômetros de espessura empregando-se lâminas de vidro previamente siliconizadas.

Após secar ao ar, à temperatura ambiente, por 20-30 minutos, as secções foram incubadas com os soros previamente diluídos a 1/10 por 30 minutos, em câmara úmida a temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas por 30 minutos em tampão fosfato pH 7,4 e incubadas com anti-IgG fluoresceinada (Behringwerk-Marburg-Germany) diluído a 1/10 por 30 minutos. Finalmente, foram lavadas em tampão fosfato pH 7,4 por 30 minutos e montadas com Elcanol (polivinil-álcool-Sigma) entre lâmina e lamínula.

Todos os soros foram também testados empregando-se com substrato o coração humano, com o mesmo método descrito anteriormente.

A leitura foi realizada por dois observadores, de forma independente em microscópio de luz ultravioleta Leitz Dialux.

Como critério de leitura foi utilizado o proposto por Khoury e Col.¹²: grupo I - padrão EVI característico (coloração do endocárdio, vaso e interstício); grupo II - fraca intensidade EVI ou falta de coloração em uma das três estruturas; grupo III - falta do padrão vascular e grupo IV,- evidenciados somente os vasos do substrato fígado.

RESULTADOS

Dos 29 soros provenientes de portadores de cardiopatia chagásica acompanhados no HUPE-UERJ, 27 (93,10%) coraram estruturas vasculares, 19 coraram endocárdio (fig. 1), vasos (fig. 2) e interstício de músculo esquelético (fig. 3) e corresponderam ao tipo I de Khoury e col. Oito

corresponderam ao tipo II e 2 soros foram negativos em todos os tecidos de animais testados.

Dos 58 soros provenientes de pacientes de Plumhy 57 (96,61%) coraram estruturas vasculares, 50 coraram endocárdio, vasos e interstício de músculo esquelético correspondendo ao tipo I e 7 corresponderam ao tipo II. Um soro foi negativo em todos os tecidos de animais testados.

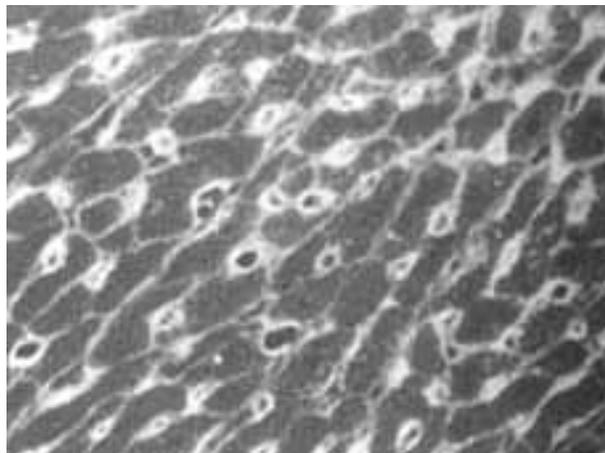


Fig.1- Anticorpos EVI em músculos cardíacos de rato. Imunofluorescência indireta 250 X.

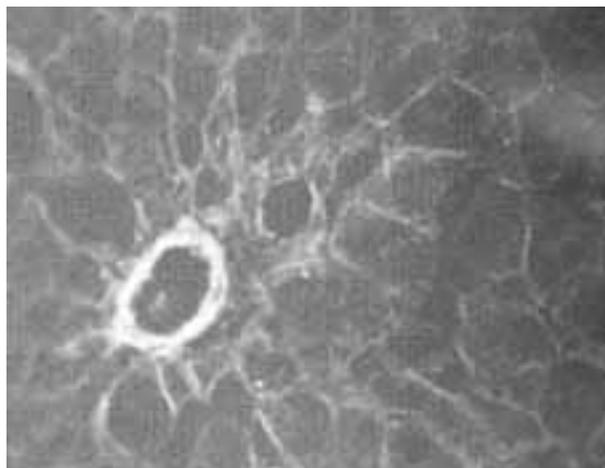


Fig.2 - Anticorpos EVI em vasos de fígado de rato. Imunofluorescência indireta 250 X.

Entre os 87 pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica, encontramos o padrão EVI tipo I em 69 pacientes (79,3%) e tipo II em 18 pacientes (20,7%), sendo negativo em apenas 3 pacientes (3,4%). Quando comparamos os pacientes quanto à procedência encontramos maior proporção de pacientes tipo I em área endêmica, sendo menor a proporção de tipo II e a dos negativos.

Nos controles hospitalares, nenhum foi positivo para EVI, enquanto que nos provenientes de Plumhy 3 foram positivos com padrão semelhante ao do grupo I.

Todos os soros que foram positivos em tecidos animais foram negativos quando testados em coração humano.

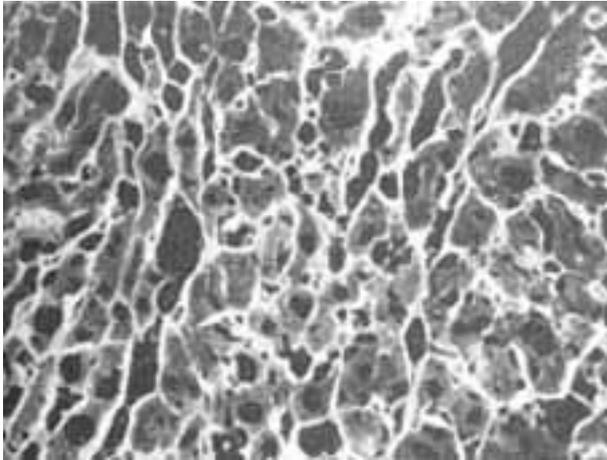


Fig.3 - Anticorpos em músculo esquelético de rato. Imunofluorescência indireta 250 X.

COMENTÁRIOS

A cardiopatia chagásica, por seus efeitos incapacitantes e repentinos, é um dos principais problemas de saúde pública em certas áreas de nosso país.

Em 1974, Cossio e Col⁴ descreveram a presença, em 95% dos casos de cardiopatia chagásica crônica, de gamaglobulina circulante, que reagia com endocárdio, interstício e vasos sanguíneos do coração além de estruturas vasculares do interstício de músculo, esquelético de ratos. Esse fator endocárdio - vascular-intersticial, conhecido como fator EVI, fixa complemento e é absorvido por formas epimastigotas de *T. cruzi*, sugerindo provável reação cruzada entre antígenos presentes em ambas estruturas. Este mesmo achado foi observado em 44,4% de pacientes assintomáticos, porém, infectados por *T. cruzi*, não sendo encontrado em outras doenças cardíacas nem em pacientes normais^{5,7}.

A especificidade dos anticorpos EVI para a cardiopatia chagásica foi, posteriormente, confirmada por vários autores⁶⁻⁹. Szarfman e col.¹¹, estudando 60 soros de pacientes com diversas doenças infecciosas, tais como malária, leishmaniose, equinococose, amebíase, toxoplasmose, triquinose e tripanossomíase africana, provenientes de áreas não endêmicas da doença de Chagas, observaram baixa prevalência do fator EVI, encontrado em somente 2 casos (3,3%) em portadores de malária e leishmaniose cutânea. Confirmaram, assim, a grande especificidade desses anticorpos para a tripanossomíase americana. Estes achados estão de acordo com os apresentados por Cossio e Col⁴, em 100% dos casos de miocardite chagásica aguda, em 95,23% (20/21) dos pacientes com cardiopatia chagásica crônica e em 44,4% (19/47) dos casos de assintomáticos com reação sorológica positiva para doença de Chagas.

Khoury e Col.¹², em 1978, ressaltaram a importância da pesquisa do fator EVI no diagnóstico mais preciso da cardiopatia, afirmando inclusive, que deveria ser investigada a participação do *T. cruzi*, sempre que fosse

observado positividade a nível de vasos, em testes de rotina para outros auto-anticorpos. Devemos mencionar que Pearson e col.¹³, em 1974, encontraram anticorpos dirigidos para componentes vasculares, em 6,6% dos 5000 testados para a pesquisa de fator antinuclear em seções de fígado de camundongo. Esses anticorpos são da classe IgG, fixam complemento e estão associados principalmente às doenças do tecido conectivo especialmente à artrite reumatóide, à síndrome de Reiter e à artrite reumatóide, à síndrome de Reiter à artrite reumatóide juvenil pelo vírus da hepatite B.

Mesmo em indivíduos saudáveis, poderemos observar a presença de anticorpos antiestruturas; vasculares (AVA) conforme foi descrito por Cossio e col.⁵.

Verificamos, que os soros que continham anticorpos EVI, também coravam estruturas vasculares em outros órgãos, conforme já foi demonstrado por outros autores^{4,8,12}. Entretanto, encontramos nesses soros anticorpos que coravam estruturas musculares lisas no estômago e fibrilas localizadas nas bordas dos túbulos renais, portanto, anticorpos antimúsculo liso (AML). Assim, parece que, no soro de pacientes chagásicos, existam anticorpos dirigidos para componentes musculares. A especificidade destes anticorpos, ainda não foi determinada, porém, é interessante ressaltar que a actina se encontra amplamente distribuída em tecidos animais e talvez isso seja o responsável pela positividade em tecido muscular, bem como em outros tecidos onde sejam encontradas fibrilas contráteis (paredes vasculares, túbulos renais, etc.). Entretanto, a positividade característica de pequenos vasos coronários, intensamente corados por soro de pacientes com cardiopatia chagásica e negativos quando testamos outros soros com anticorpos antimúsculo liso, são peculiares da cardiopatia chagásica.

Após infecção pelo *T. cruzi*, são produzidos anticorpos contra laminina e não contra qualquer outro componente conhecido da membrana basal ou tecido conectivo. Tais anticorpos não estão presentes no soro de pessoas normais, em pacientes submetidos a intervenções cirúrgicas ou em portadores de processos inflamatórios e neoplásicos, bem como nos acometidos por malária, toxoplasmose e artrite reumatóide¹⁴.

Sterin-Borda e col.¹⁵ demonstraram que a adição do fator EVI "in vitro" à preparação de músculo atrial do rato ocasionava aumento dos batimentos da preparação e que a introdução no meio de bloqueador beta-adrenérgico impedia essa aceleração, enquanto os bloqueadores alfa-adrenérgicos e anti-histamínicos não alteravam a resposta da preparação. Essa experiência demonstra que o fator EVI é capaz de apresentar uma função fisiológica, acelerando os batimentos da musculatura atrial de ratos.

Sabe-se que os pacientes EVI positivos apresentam, revestindo a fibra cardíaca, uma imunoglobulina autóloga e complemento. A ligação sarcolemal parece dificultar o processo de difusão de elementos nu-

tritivos, provocando alterações isquêmicas e metabólicas que podem ser observadas à luz da microscopia eletrônica^{16,17}.

Os nossos resultados concordam com os relatados por Cossio¹⁰, quando utilizava coração humano como substrato, com o qual todos os soros foram negativos para os anticorpos EVI.

O papel desempenhado pelos anticorpos presentes no soro desses pacientes ainda não está esclarecido. Por não reagirem com estruturas teciduais humanas, torna-se ainda mais difícil apontar qualquer papel patogênico dos mesmos na cardiopatia chagásica.

As lesões observadas limitam-se à destruição progressiva das fibras miocárdicas pauciparasitadas, gerando um tecido cicatricial não funcionante, o que acarreta o sintomas clínicos da doença.

Em outras condições mórbidas, os auto-anticorpos estão presentes, sem que se possa visibilizar qualquer correlação entre esses e as lesões patológicas que acarretam, como é o caso da cirrose biliar primária na qual, em 90% dos casos, observamos anticorpos antimitocôndrias ou nas hepatopatias crônicas, nas quais encontramos, em 50% dos casos, anticorpos antimúsculos lisos.

Os auto-anticorpos podem ser um dos mecanismos de modulação da resposta imune e a possibilidade de que nos processos inflamatórios crônicos ocorra uma desregulação desse sistema deve ser considerada. Por outro lado, antígenos parasitários bacterianos ou mesmo virais podem ser o estímulo para uma policlonal, justificando o aparecimento de clones latentes, o que explicaria a variedade de anticorpos presentes nesses pacientes.

SUMMARY

The presence of EVI antibodies were searched for in the sera of patients with Chagas' disease. Twenty-nine samples were obtained at the out-patient clinic for cardiac disease and 58 came from subjects living in endemic areas, most of them without symptoms. EVI antibodies were found in 93.10% of the patients with cardiac disease and in 96.61% in the others, when heterologous tissue was used as substrate. However, none of them were positive when human heart tissue was used as substrate.

The role of EVI antibodies in Chagas' disease is not yet very clear. The present study suggests its presence to be an epiphenomenon secondary to some disturbance in the modulation of the immune response due to chronic infection.

REFERÊNCIAS

1. Kozma, C.; Jaffé, R.; Jaffé, W. - Estudo experimental sobre a patogenia das miocardites. *Arq. Bras. Cardiol.* 13:155, 1960.
2. Andrade, Z. A.; Andrade, S. G. - Patologia in: Brenner, Z. e Andrade, Z., *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979. p. 169.
3. Trezza, E. - Anticorpos antimiocárdio demonstrados por imunofluorescência indireta no soro de Portadores de doença de Chagas crônica. Correlação entre os resultados sorológicos e as alterações eletrocardiográficas. São Paulo, 1972. (Tese Botucatu).
4. Cossio, P. M.; Diez, C.; Szarfman, A.; Kreutzer, E.; Candiolo, B. Arana, R. M. - Chagasic Cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, 49: 13, 1974.
5. Cossio, P. M.; Laguens, R. P.; Diez, C.; Szarfman, A.; Segal, A.; Arana, R. M. - Chagasic Cardiopathy Antibodies Reacting with Plasma Membrane of Striated Muscle and Endothelial Cells. *Circulation*, 50: 1252, 1974.
6. Bottazzo, G. F.; Florin-Christensen, A.; Fairjar, A.; Swam, G.; Doniach, D.; Stewart, U. G. - Classification of smooth muscle autoantibodies detected by immunofluorescence. *Clin. Pathol.* 29: 403, 1976.
7. Cossio, P. M.; Diez, C.; Laguens, R. P.; Arana, R. M. - Imunopatologia de la enfermedad de Chagas. Hechos y perspectivas. *Medicine (B. Aires)* 40 (Supl. 1): 222, 1980.
8. Huabach, R. M.; Sulzer, A. J.; Kajan, I. G. - Evaluation of an autoimmune type antibody in the sera of patients with Chagas disease. *Parasitol.* 62: 523, 1976.
9. Trezza, E.; Tucci, P. J. P.; Buffolo, E.; Montenegro, U. R. G. - Anticorpos antimiocárdio na doença de Chagas crônica. Correlação entre a sorologia e a eletrocardiografia. *Arq. Bras. Cardiol.* 28: 327, 1975.
10. Cossio, P. - Auto-imunidade humoral na Doença de Chagas. VIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Imunologia, Novembro 1972. Mesa-Redonda Imunologia da Doença de Chagas.
11. Szarfman, A.; Khoury, E. L.; Cossio, P. M.; Arana, R. M.; Kagan, I. G. - Investigation of the EVI Antibody in Parasitic Diseases Other. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 19, 1975.
12. Khoury, E. L.; Cossio, P. M.; Szarfman, A.; Marcos, J. C.; Mortes, O. G.; Arana, R. M. - Immunofluorescent Vascular Pattern Due to EVI Antibody of Chagas Disease, *Am. J. Clin. Pathol.* 69: 62, 1978.
13. Pearson, D. A.; Leatherwood, C. M.; Sharp, J. T. - Anti-vascular antibody. *Ann. Rheum. Dis.* 33: 371, 1974.
14. Szarfman, A.; Terranova, p.; Rennard, S.; Foidart, J. M.; Lima, M. F.; Scheinman, H.; Martin, G. R. - Antibodies to laminin in Chagas Disease. *J. Exp. Med.* 155: 1161, 1992.
15. Sterin-Borda, L.; Cossio, P. M.; Gimeno, A. L.; Diez, C.; Laguens, R. P.; Meckert, P. C.; Arana, R. M. - Effect of Chagasic sera for the rat isolated atrial preparation: immunological, morphological and functional aspects. *Cardio. Vas.* 10: 613, 1976.
16. Cossio, P. M.; Laguens, R. P.; Kreutzer, E.; Diez, C.; Segal, A.; Arana, R. M. - Chagasic Cardiopathy- Immunopathologic and morphologic studies in myocardial biopsies. *Am. J. Path.* 86: 533, 1977.
17. Laguens, R. P.; Cossio, P. M.; Diez, C.; Segal, A.; Vasques, C.; Kreutzer, E.; Khoury, E.; Arana, R. M. - Immunopathologic and morphologic: studies of skeletal muscle in disease. *Am. X Path.* 80: 153, 1975.