

## ATIVACÃO DA VIA ALTERNATIVA DO COMPLEMENTO PELAS PROMASTIGOTAS DA LEISHMANIA DONOVANI (\*)

Rosane Hazelman CUNHA (1), Júnia CHAVES (2), Ione IRULEGUI (2) e Celidéia A. Coppi VAZ (3)

### RESUMO

Promastigotas da *Leishmania donovani* submetidas em condições favoráveis à ação do Complemento (C), ativado apenas pela via alternativa, apresentaram 90% de lise. Em nenhum experimento houve lise total, mesmo com uso de quantidade três vezes maior de C e período de incubação prolongado. As promastigotas resistentes à ação do C, apresentam-se sem alterações morfológicas evidentes, ao microscópio óptico comum.

### INTRODUÇÃO

A lise de protozoários<sup>10,14,15</sup>, bactérias<sup>2</sup> e fungos<sup>4</sup>, provocada pela ação de soro normal, tem sido bastante estudada por vários Autores. Esta atividade lítica do soro normal deve-se à ativação da via alternativa do sistema Complemento (C), sem interferência de anticorpos específicos. Segundo PILLEMER<sup>16</sup>, a via alternativa do C pode representar mecanismo de defesa contra invasão de organismos estranhos, operando mesmo antes da manifestação da resposta imune.

Outros Autores<sup>7</sup> sugerem que os fatores da via alternativa sejam filogeneticamente mais primitivos que o mecanismo imune propriamente dito, agindo em conjunto, como sistema primário de defesa inespecífico, nos animais zoológicamente mais simples.

Em muitos casos, a ativação do C produz destruição dos organismos invasores, sendo importante na resistência à infecção; tal fato foi demonstrado, entre outros, por BUDZKO & col.<sup>3</sup>, os quais verificaram aumento da parasitemia produzida pelo *Trypanosoma cruzi*, em camundongos depletados de C pelo fator de veneno da cobra *Naja naja*. Outras vezes, a ativa-

ção do C pode ser prejudicial ao hospedeiro, como ocorre na Babesiose provocada pela *Babesia rodhaini*; nesta doença, de acordo com CHAPMAN & WARD<sup>6</sup>, a ativação do C é essencial para a penetração do parasita nas hemácias e posterior desenvolvimento da parasitemia.

A lise das promastigotas da *Leishmania donovani* pelo soro normal foi verificada por vários Autores<sup>1,18,21</sup>, sem que, no entanto, fosse examinado anteriormente o papel do C neste processo lítico.

Isto nos levou a realizar o presente trabalho, que tem como finalidade verificar qual das vias de ativação do C é responsável pela lise das formas promastigotas do parasita.

### MATERIAL E MÉTODOS

**L. donovani** — Foi usada a cepa n.º 70, isolada de cão em 1973, em Minas Gerais, por Magno Dias e colaboradores, proveniente do Departamento de Parasitologia ICB/UFMG. É mantida neste laboratório há 10 meses em hamsters (*Mesocricetus auratus*), à partir dos quais foram obtidas as culturas; utilizamos promasti-

(\*) Financiado pelo CNPq.

(1) Bolsista do CNPq (Proc. n.º 105874-79)

(2) Instituto de Medicina Tropical de São Paulo — FM — USP

(3) Instituto de Ciências Biomédicas — USP

gotas de meio de cultura NNN, cuja fase líquida é constituída por meio de LIT<sup>(5)</sup>, com pH = 7,2.

**Complemento humano** — (SHN) — Foi usada mistura de soros, de dez doadores do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da FMUSP; os soros foram separados por centrifugação a 4°C e conservados a -70°C em alíquotas de 0,7 ml, descongeladas no momento do uso.

**Determinação das condições favoráveis à ação do C sobre *L. donovani*** — Número correspondente a  $5 \times 10^5$  promastigotas da *L. donovani*, retiradas do meio de cultura no 4.º dia de crescimento, foi determinado em câmara de Neubauer, após diluição em 0,1 ml de tampão gelatina veronal, contendo íons  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$  (CFT), preparado de acordo com MAYER & col.<sup>12</sup>. Quantidades diferentes de C (0,5 e 0,7 ml de SHN) foram adicionadas a número igual de promastigotas e o volume final das reações foi completado para 1 ml, com o tampão antes mencionado. As misturas foram incubadas em temperaturas correspondentes a 25 e 37°C durante vários intervalos de tempo (1 a 5, 10, 15, 30, 45, 120 e 180 minutos). Após decurso desses intervalos o número de promastigotas, tanto nas experiências feitas a 25 como a 37°C e respecti-

vos controles, foi novamente determinado em câmara de Neubauer.

Estudos complementares foram feitos, nos quais, igual número de promastigotas suspensas em 0,3 ml de tampão CFT foram incubadas com 2,5 ml de C, durante 48 horas, em ambas temperaturas.

Número igual de promastigotas, provenientes de cultura com 1 mês de crescimento, também foi submetido à ação do C, nas mesmas condições.

**Inibição da ação do C sobre as promastigotas da *L. donovani*** — Depois de fixado o volume de C a ser utilizado, realizamos experimentos semelhantes aos mencionados anteriormente. No entanto, nesses a ação do C foi abolida, tanto pela inativação a 56°C durante 1/2 hora, como pela clivagem do componente  $C_3$ , feita a 37°C, com fator de veneno da cobra *Naja naja* (CoF), purificado de acordo com MÜLLER-EBERHARD & FJELLSTRON<sup>13</sup>. Utilizamos também, com a mesma finalidade, devido à sua capacidade de reação a 37°C com o componente  $C_3$ , o Zimosan (polissacarídeo da membrana celular do *S. cerevisiae*), preparado segundo a técnica de PILLEMER & col.<sup>17</sup>. Essas experiências encontram-se resumidas no Quadro I.

Q U A D R O I

Condições utilizadas para inibir ação do complemento sobre promastigotas da *L. donovani*

5 x 10 <sup>5</sup> promastigotas	C (SHN)	C 56°C/30 minutos	CoF (0,3U/ml)	Zimosan (3 mg) (37°C)	Tampão CFT
0,1 ml	—	0,7 ml	—	—	0,2 ml
0,1 ml	0,7 ml	—	0,1 ml	—	0,1 ml
0,1 ml	0,7 ml	—	—	0,1 ml	0,1 ml

**Verificação da via de ativação do C, responsável pela lise das promastigotas de *L. donovani*** — Foi feita através da determinação da porcentagem de lise sofrida por  $5 \times 10^5$  formas parasitárias, incubadas a 25°C, durante 1 hora, em presença de 0,7 ml de C, e em condições favoráveis somente à ativação da via alternativa. Nessas experiências seguimos metodologia recomendada por FINE & col.<sup>9</sup> para bloqueio da via clássica de ativação do C e favorecimento da via alternativa, usamos EGTA (\*) em pre-

sença de íons  $Mg^{++}$ , pois, quelando íons  $Ca^{++}$ , o EGTA promove a dissociação do complexo  $C_1$ , impedindo a ação da via clássica e os íons  $Mg^{++}$  favorecem a ativação da via alternativa.

EDTA (\*\*), quelante de íons  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$ , inibidor portanto de ambas vias de ativação do C, também foi utilizado, bem como C, previamente tratado com EDTA e excesso de íons  $Mg^{++}$ , para restaurar as condições favoráveis à via alternativa.

(\*) Sigma Chemical Co.

(\*\*) Sigma Chemical Co.

Incluimos também experimentos feitos de modo similar, nos quais o SHN foi depletado previamente de Properdina, pela incubação a 17°C durante 1 hora, com Zimosan, de acordo

com PILLEMER & col.<sup>17</sup>.

O procedimento seguido nessas experiências acha-se resumido no Quadro II.

Q U A D R O II

Condições utilizadas para verificar a via de ativação do complemento responsável pela lise das promastigotas da *L. donovani*

5 x 10 <sup>5</sup> promastigotas	C (SHN)	100mM EGTA pH = 7,4	100mM EDTA pH = 7,4	30mM MgCl <sub>2</sub> pH = 7,4	80mM MgCl <sub>2</sub> pH = 7,4	Zimosan 3 mg (17°C/1h)	Tampão CFT
0,1 ml	0,7 ml	0,1 ml	—	0,1 ml	—	—	—
0,1 ml	0,7 ml	—	0,1 ml	—	—	—	—
0,1 ml	0,7 ml	—	0,1 ml	—	0,1 ml	—	—
0,1 ml	0,7 ml	—	—	—	—	0,1 ml	0,1 ml

**Confirmação da via de ativação do C** — Foi feita por imunoelctroforese do SHN tratado com EGTA e íons Mg<sup>++</sup> (bloqueio da via clássica), incubado com 10<sup>5</sup> promastigotas, durante 1 hora a 25°C, para confirmar a conversão do C<sub>3</sub> nativo presente no soro, em seus produtos de clivagem. A técnica utilizada foi a de FERRI & COSSERMELLI<sup>8</sup>, e o anti-soro específico anti-C<sub>3</sub> humano, preparado pelo método de MARDINEY & MÜLLER-EBERHARD<sup>11</sup>.

de promastigotas e C, a 37°C, mostrou que a motilidade do parasita diminui bastante, razão pela qual selecionamos para nosso trabalho temperatura correspondente a 25°C, na qual tal fato não ocorre. A 25°C, após 1 minuto de incubação do parasita e C, verificamos 60% de lise das promastigotas e, depois de 1 hora, 90%. O aumento do período de incubação, até 2 horas, não provocou alterações da porcentagem de lise, que se manteve constante, como se vê na Fig. 1.

RESULTADOS

**Determinação das condições favoráveis à ação do C sobre a *L. donovani*** — A incubação

de promastigotas e C, a 37°C, mostrou que a motilidade do parasita diminui bastante, razão pela qual selecionamos para nosso trabalho temperatura correspondente a 25°C, na qual tal fato não ocorre. A 25°C, após 1 minuto de incubação do parasita e C, verificamos 60% de lise das promastigotas e, depois de 1 hora, 90%. O aumento do período de incubação, até 2 horas, não provocou alterações da porcentagem de lise, que se manteve constante, como se vê na Fig. 1.

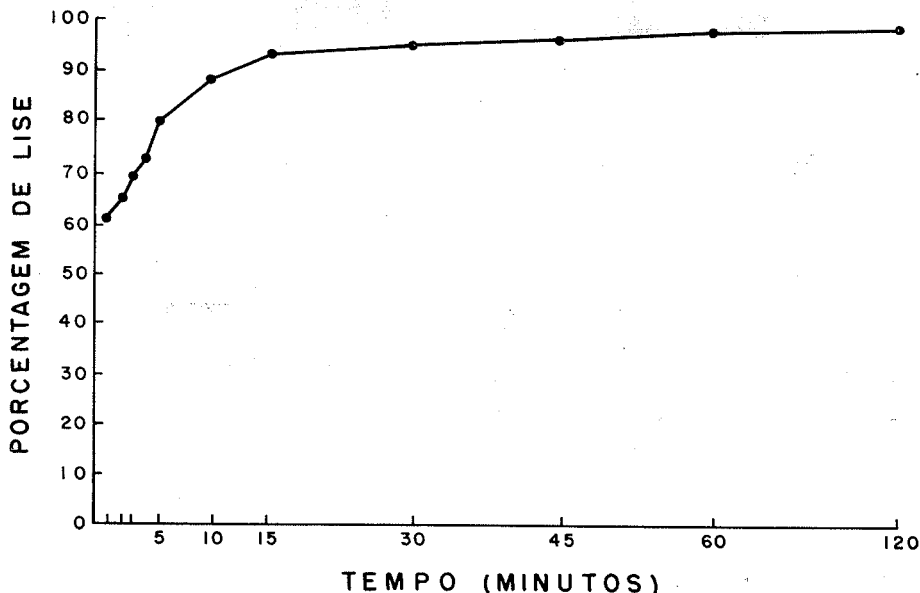


Fig. 1 — Porcentagem de lise das promastigotas da *L. donovani* sob ação do complemento humano, durante vários intervalos de tempo.

Promastigotas provenientes de cultura, com 1 mês de crescimento, submetidas às mesmas condições, mostraram mesma porcentagem máxima de lise, isto é, 90%, após 1 hora a 25°C.

Em nenhum experimento foi observada lise total. Além de promastigotas móveis e aparentemente viáveis, outras tornam-se imóveis ao microscópio óptico. É freqüente, também, o aparecimento de promastigotas vivas no inte-

rior de aglomerado de outras, sem nenhum movimento.

A Fig. 2 mostra o aspecto de formas não destruídas, ao lado de outras lisadas pelo C, após coloração com Giemsa.

As promastigotas resistentes não apresentam alterações morfológicas evidentes ao microscópio óptico, mesmo depois de coradas.

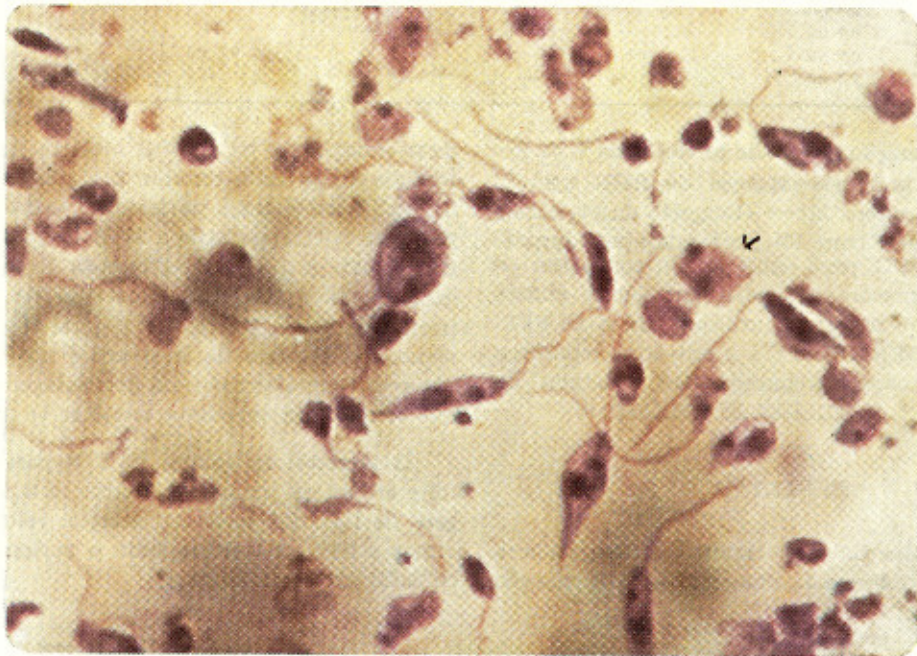


Fig. 2 — Promastigotas da *L. donovani* submetidas à ação do complemento ativado pela via alternativa, apresentando alterações morfológicas (Giemsa, 3000 X)

**Inibição da ação do C sobre as promastigotas de *L. donovani*** — A inativação do C devida ao aquecimento a 56°C durante 1/2 hora, inibiu totalmente a lise das promastigotas; o mesmo ocorreu quando o componente C<sub>3</sub> foi clivado pela ação do CoF, ou quando reagiu com Zimosan a 37°C.

Os resultados nos permitem afirmar que o fator do SHN responsável pela lise das promastigotas da *L. donovani* é realmente o Complemento.

**Verificação da via de ativação do C** — Quando usamos EDTA, ambas vias de ativação do C foram bloqueadas e a lise das promastigotas foi inibida totalmente. Quando adicionamos excesso de íons Mg<sup>++</sup> ao SHN quelado com

EDTA, ocorreu ativação da via alternativa e restauração da atividade lítica, responsável por lise de 90% das promastigotas. O tratamento do SHN com EGTA e íons Mg<sup>++</sup> (bloqueio da via clássica, e favorecimento da via alternativa) produziu a mesma porcentagem de lise.

A reação lítica mostrou-se, portanto, dependente apenas dos íons Mg<sup>++</sup>, e não dos íons Ca<sup>++</sup>, como se vê na Fig. 3.

Concluimos que a lise das promastigotas da *L. donovani* foi provocada pela ativação somente da via alternativa do Complemento.

O uso de SHN depletado de Properdina produziu a mesma porcentagem de lise das promastigotas, sugerindo que a ativação da via al-



ternativa no caso, pode ocorrer mesmo na ausência da Properdina, proteína essa apenas com função estabilizadora da atividade de  $C_3$  convertase<sup>19,20</sup>.

**Confirmação da via de ativação do C — A** imunoelectroforese do SHN tratado previamente com EGTA e ions  $Mg^{++}$  e incubado depois com promastigotas, revela linhas de precipitação correspondentes a fragmentos de  $C_3$  de maior mobilidade electroforética que  $C_3$  nativo, tal como está exemplificado na Fig. 4.

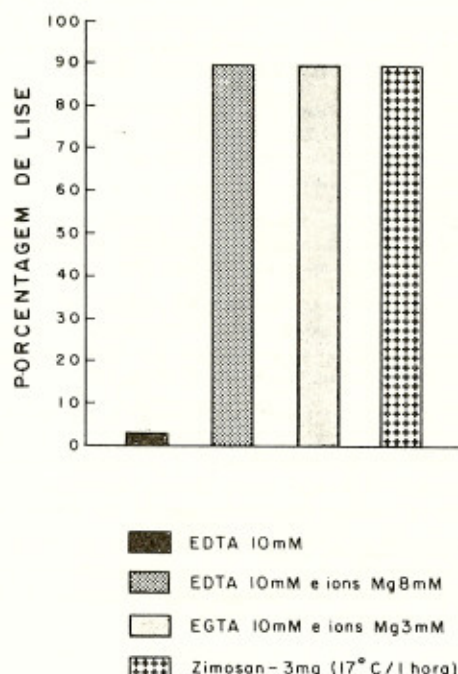


Fig. 3 — Porcentagem de lise das promastigotas da *L. donovani*, provocada pela ativação da via alternativa do Complemento humano.

## DISCUSSÃO

ZUCKERMAN & LAINSON em 1977<sup>22</sup>, supõem que o sistema Complemento do SHN seja o fator responsável pela destruição da maioria das promastigotas da *L. donovani*, inoculadas no vertebrado pelo inseto vector. Segundo estes mesmos Autores, as formas infectantes, capazes de invadir células fagocitárias do vertebrado, seriam aquelas não destruídas pela ação do Complemento.

SCHMUNIS & HERMAN<sup>18</sup>, por sua vez, observaram que promastigotas "arredondadas" não eram lisadas por soro normal de cobaio. Mesmo sem afastar a possibilidade de lise, em fase inicial, estes últimos Autores sugerem que tais formas "arredondadas" sejam resistentes à ação do soro de cobaio e que constituam parte fixa da população de promastigotas da *L. donovani*.

Nossos resultados confirmam a suposição de ZUCKERMAN & LAINSON, e demonstram que a lise das promastigotas da *L. donovani* provocada pelo SHN, é realmente reação dependente de C, ativado pela via alternativa.

Em nosso trabalho, nunca obtivemos lise total das formas parasitárias, o que nos leva a crer que, ao redor de 10% da população de promastigotas usadas seja resistente à ação do Complemento.

Este trabalho prosseguirá, visando determinar o potencial evolutivo e capacidade invasora das promastigotas da *L. donovani* resistente à ação do sistema Complemento humano.

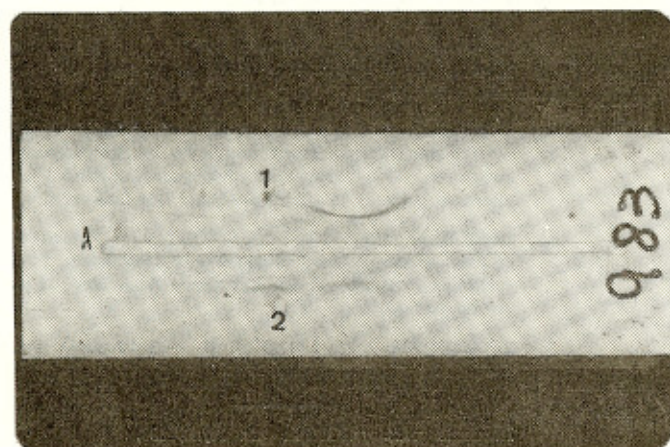


Fig. 4 — Imunoelectroforese do SHN tratado previamente com EGTA + ions  $Mg^{++}$  e incubado com promastigotas da *L. donovani*, durante 1 hora, a 25°C. Os produtos de clivagem de  $C_3$  apresentam maior mobilidade electroforética que  $C_3$  nativo.

1 = SHN  
2 = SHN + EGTA e  $Mg^{++}$  +  $5 \times 10^6$  promastigotas  
A = anti- $C_3$  humano

## SUMMARY

### Activation of the alternative pathway of Complement by promastigotes of *Leishmania donovani*

Promastigotes of *L. donovani* were lysed (90%) by action of Complement activated by the alternative pathway. Total lysis was never obtained in spite of the use of great amount of Complement and prolonged period of incubation. The resistant promastigotes presented no morphological alteration by optical microscopy.

Studies on the infective capacity of these resistant forms, as well as their evolutive potential are in progress.

## AGRADECIMENTOS

A Dra. Teresa A.E. Kliemann por ter cedido generosamente o soro hiperimune anti-C<sub>3</sub> humano; à Dra. Olisnei N. Mariano pela colaboração nas fotografias e ao Sr. Waldomiro Siqueira pelos gráficos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADLER, S. — Attempts to transmit Visceral Leishmaniasis to man. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 33: 419-446, 1940.
- BISNO, A. L. — Alternate complement pathway activation by group A Streptococci: Role of M — Protein. *Infection Immunity* 26: 1172-1176, 1979.
- BUDZKO, D. B.; PIZZIMENTI, M. C. & KIERSZENBAUM, F. — Effects of complement depletion in experimental Chagas' disease: Immune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *Infection Immunity* 11: 86-91, 1975.
- CALICH, V. L.; KIPNIS, T. L.; MARIANO, M.; FAVA NETO, C. & DIAS DA SILVA, W. — The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 12: 21-30, 1977.
- CAMARGO, E. P. — Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I — Origin of metacyclic Trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6: 93-100, 1964.
- CHAPMAN, W. E. & WARD, P. A. — *Babesia rodhaini*: requirement of complement for penetration of human erythrocytes. *Science* 196: 67-70, 1977.
- DAY, N. K. B.; GEWURZ, H.; JOHANNSEN, R.; FINSTAD, J. & GOOD, R. A. — Complement and complement — like activity in lower vertebrates and invertebrates. *J. Exp. Med.* 132: 941-950, 1960.
- FERRI, R. G. & COSSERMELLI, W. — Analyse immuno-electroforétique micro et macro méthodes. *Rev. Franç. Etud. Clin. Biol.* 9: 134-138, 1964.
- FINE, D. P.; MARNEY, S. R.; COLEY Jr., D. G.; SERGENT, J. S. & DES PREZ, R. M. — C<sub>3</sub> shunt activation in human serum chelated with EGTA. *J. Immunol.* 109: 807-809, 1972.
- KIERSZENBAUM, F.; IVANY, J. & BUDZKO, D. B. — Mechanism of natural resistance to Trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology* 30: 1-6, 1976.
- MARDINEY, M. R. & MÜLLER-EBERHARD, H. J. — Mouse B<sub>3</sub>C globulin: production of antiserum and characterization in the complement reaction. *J. Immunol.* 94: 877-882, 1965.
- MAYER, M. M.; OSLER, A. G.; BIER, O. G. & HEIDELBERGER, M. — The activating effect of Mg<sup>++</sup> and other cations on the hemolytic function of complement. *J. Exp. Med.* 84: 535-540, 1946.
- MÜLLER-EBERHARD, H. J. & FJELLSTRON, K. F. — Isolation of the anticomplementary protein from cobra venom and its mode of action on C<sub>3</sub>. *J. Immunol.* 107: 1666-1672, 1972.
- NOGUEIRA, N.; BIANCO, C. & COHN, Z. — Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 142: 224-229, 1975.
- ORTIZ-ORTIZ, L.; CAPIN, R.; CAPIN, N.; SEPULVEDA, B. & ZAMACONA, G. — Activation of the alternative pathway of complement by *Entamoeba histolytica*. *Clin. Exp. Immunol.* 34: 10-18, 1978.
- PILLEMER, L.; BLUM, L.; LEPOW, I. H.; ROSS, O. A.; TODD, E. W. & WARDLAW, A. C. — The Properdin system and immunity. I — Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin and its role in immune phenomena. *Science* 120: 279-285, 1954.
- PILLEMER, L.; BLUM, L.; LEPOW, I. H.; WURZ, L. & TODD, E. W. — The Properdin system and immunity. III — The Zymosan assay Properdin. *J. Exp. Med.* 103: 1-13, 1956.
- SCHMUNIS, G. A. & HERMAN, R. — Characteristics of so-called natural antibodies in various normal sera against culture forms of *Leishmania*. *J. Parasitol.* 56: 889-898, 1970.
- SCHREIBER, R. D.; PANGBURN, M. K.; LESAVRE, P. H. & MULLER-EBERHARD, H. J. — Initiation of the alternative pathway of complement: Recognition of activators by bound C<sub>3</sub>b and assembly of the entire pathway from six isolated proteins. *Immunology* 73: 3948-3952, 1978.
- TAUBER, J. W.; POLLEY, M. J. & ZABISKIE, J. B. — Non-specific complement activation by Streptococcal structures. II — Properdin: Independent initiation of alternate pathway. *J. Exp. Med.* 143: 1352-1366, 1976.
- ULRICH, M.; ORTIZ, T. D. & CONVIT, J. — The effect of fresh serum on the leptomonads of *Leishmania*. I — Preliminary report. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62: 825-830, 1968.
- ZUCKERMAN, A. & LAINSON, R. — *Leishmania*. *Parasitic Protozoa* 1: 57-133, 1977.