

INVESTIGAÇÕES SOBRE DETERMINANTES ANTIGÊNI-
COS DE SUPERFÍCIE DAS FORMAS EPIMASTIGOTAS
DE *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)

ELIZABETH MALAGUEÑO DE SANTANA



COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

UNICAMP AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PREÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: ELIZABETH MALAGUENHO DE SANTANA

Nº de Identificação: 735013

Endereço para Correspondência: Prolet^o Paes Cabral 75- CORDEIRO
Recife - PE

Curso: Imunologia

Nome do Orientador: Daria Repka

Título da Dissertação ou Tese: Investigações sobre determinantes antigênicos de superfície das formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi (Chagas, 19)

Data proposta para a Defesa: 24/10/77

(O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir desta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

1/1
Data

assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

12/10/77
Data

[Assinatura]
assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consulte, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o fornecimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a interessados.

1/1
Data

assinatura do aluno

ELIZABETH MALAGUEÑO DE SANTANA

INVESTIGAÇÕES SOBRE DETERMINANTES ANTIGÊNICOS DE SUPERFÍCIE
DAS FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909).

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para ob-
tenção do grau de Mestre

Orientador:

Profa. Dra. Daria Repka.

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Campinas

São Paulo - Brasil

1977

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A los que me enseñaron a luchar
por lo imposible

A quienes me apoyaron en todo
momento

A mis padres y hermanos
A mi esposo y compañero

AGRADECIMENTOS

Aos mestres Daria Repka e Humberto de Araujo Fangel pelos ensinamentos, orientação científica e sobretudo, pela solidariedade humana.

Aos Profs. do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, especialmente, aos Drs. F. Pestana de Castro e Marlene B. Serafim pela compreensão e incentivo.

Aos Profs. Luiz Augusto Magalhães, Angelo Pires do Prado e Francisco Gomes de Alcântara, pela discussão dos dados e valiosas sugestões.

Aos colegas do curso de pós-graduação, especialmente, àqueles que compõem o Grupo de Estudos da Imunologia das Doenças Parasitárias.

Aos colegas Ednir Salata e Celso Paulino, pelo fornecimento de soros humanos e de camundongos, utilizados neste trabalho.

nossos agradecimentos

A autora e a coordenação do curso de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Estadual de Campinas, agradecem os recursos fornecidos pelas seguintes Instituições:

Universidade Estadual de Campinas

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Conselho Nacional de Pesquisas

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior

Organização Mundial de Saúde
(Divisão de Imunologia)

Biblioteca Regional de Medicina

I. INTRODUÇÃO

O estudo da resposta imune ao *Trypanosoma cruzi*, em pacientes chagásicos ou em animais inoculados experimentalmente, tem demonstrado consistentemente a presença de anticorpos capazes de reagir com o *T. cruzi* ou com os seus extratos, tanto na fase aguda como na fase crônica da doença. Estes anticorpos podem ser detectados pelas técnicas de fixação de complemento (11, 9), hemaglutinação indireta (23) imunofluorescência (2, 5, 10), aglutinação direta (29, 37) e lise do parasita (24).

Um estudo detalhado do aparecimento de anticorpos, capazes de serem detectados por estas técnicas, durante a infecção experimental em coelhos foi realizado em 1973 por Gonzáles-Cappa (14). Este estudo demonstrou que, primeiramente, são detectadas aglutininas, seguidas de anticorpos líticos e depois por anticorpos detectados pelas técnicas de imunofluorescência, hemaglutinação e fixação de complemento. À semelhança das infecções bacterianas, as primeiras imunoglobulinas a serem suscitadas foram as do tipo IgM. Essas imunoglobulinas desaparecem após o 10º dia de infecção sendo substituidas por IgG cujos títulos permanecem elevados durante todo período de observação.

Interessante notar, no entanto, que estes anticorpos não possuem efeito demonstrável sobre as formas infectantes do parasita conforme observado já em 1945 por Muniz e Boriello (24) e recentemente, por Teixeira & Santos Buch (41). Estes autores, não conseguiram demonstrar qualquer efeito de linfócitos sensibilizados sobre as formas tripomastigotas.

Esta aparente ineficácia da resistência específica do hospedeiro ao *T. cruzi*, fenômeno demonstrado também para outras parasitoses, suscitou a elaboração de diferentes hipó

teses. Admite-se por exemplo, uma adsorção de proteínas do hospedeiro na superfície do parasita à semelhança do que ocorre com *Trypanosoma vivax* no qual foram detectados sialoglicoproteínas do hospedeiro (17). Tem-se admitido também, como foi proposto por Wilson (43), a existência de um efeito bloqueador ou neutralizador na resposta imune efetiva ao parasita pela produção conjunta de antígenos solúveis e particulados. Tem sido descrita a existência de antígenos solúveis no soro de ratos infectados experimentalmente com *T. cruzi*. (7, 39)

Para se estudar qualquer destas possibilidades, torna-se necessária a utilização de antígenos bem caracterizados e definidos, a fim de que se possa identificar contra que fração ou frações antigênicas do parasita estão sendo produzidos estes anticorpos.

À despeito das frequentes recomendações dos peritos da OMS (28, 45), ainda não foi possível abordar o problema devido, provavelmente, à complexidade antigênica do parasita e de seu ciclo evolutivo.

As informações disponíveis sobre os antígenos de *T. cruzi*, dizem respeito principalmente à obtenção de frações antigênicas mais ou menos complexas destinadas ao diagnóstico sorológico da doença (9, 13, 19, 21, 25, 30) ou bem, para a elucidação de antígenos comuns à *T. cruzi* de diversas origens (26, 27) ou, ainda, para a pesquisa de antígenos comuns entre as diferentes fases evolutivas do parasita. (18, 32)

Uma abordagem analítica é observada nos trabalhos de Gonçalves & Yamaha (15), os quais analisam imunoquimicamente um complexo polissacarideo obtido por extração com hidrato de cloral. Afchain & Capron (1), submetem à análise eletroforética um extrato solúvel em cloreto de sódio, encontrando 19 componentes antigênicos frente à soros de ratos imunes.

Nos diversos trabalhos realizados até o momento, os autores empregam diferentes técnicas, espécies animais e amostras de *T. cruzi*, dificultando a comparação das informações obtidas.

Com o intuito de realizar um estudo sistemático de antígenos do parasita, e cientes da importância dos antígenos de superfície no desenvolvimento da resposta imune, nosso laboratório iniciou em 1973 (31) um estudo imunológico de lisados de *T. cruzi*. Este estudo demonstrou que os sedimentos obtidos destes lisados eram ricos em antígenos de superfície. De Souza (40), demonstrou a possibilidade de isolar uma fração solúvel (FA) desse sedimento. Esta fração foi capaz de inibir os títulos aglutinantes de soros de coelhos e cobaias imunizados com lisados de *T. cruzi* e suscitar a formação de anticorpos aglutinantes quando inoculados em coelhos.

O significado biológico para a relação parasita-hospedeiro dos antígenos presentes na FA, não está esclarecido, não se sabendo por exemplo, se determinantes antigênicos idênticos ou similares aos do FA estariam presentes durante a infecção.

No presente trabalho, procuramos verificar se durante a infecção de camundongos por duas diferentes amostras de *T. cruzi* aparecem anticorpos capazes de reagir com os determinantes de superfície das formas epimastigotas contidos na FA.

II . MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de *T. cruzi*. A amostra Y de *T. cruzi* (39) nos foi cedida pelo Dr. Z. Brener, U.F.M.G., Belo Horizonte, Brasil. A amostra Nicaragua (NIC) nos foi cedida pelo Dr. F.A. Neva do N.I.H. Bethesda, Md. U.S.A.

Meio de cultura. O meio de Yaeger (L.I.T.), preparado de acordo com as indicações de Fernandes & Castellani (8), foi utilizado para o cultivo de *T. cruzi*. Porções de 20ml de inóculo eram semeados semanalmente em 100 ml de meio de cultura e mantidos a 28°. Nessas condições a cultura apresentava em média 95% de formas epimastigotas.

Suspensão padronizada de *T. cruzi*. As formas de cultura de *T. cruzi* com 7 dias de cultivo em meio LIT, foram lavadas 3 vezes a 1.085 g, durante 15 minutos a 4° com tampão TRIS-HCl pH 7,4 0,05 M. contendo 0,5% de glicose. A suspensão de parasitas era filtrada em papel e o número de parasitas ajustado para 3×10^6 parasitas/ml por contagem em câmara de Neubauer.

Obtenção do extrato bruto de *T. cruzi* (EBC). Os parasitas, contidos em 100 ml de cultura, foram lavados 3 vezes a 4° com solução gelada de Na Cl 0,15 M. durante 15 minutos a 1.400 g. Após a última lavagem, o sedimento obtido foi ressuspenso em 10 ml de água destilada gelada e imediatamente liofilizado. O EBC liofilizado, era mantido a -20° até o momento de uso.

Obtenção de EBC delipidado. O EBC delipidado foi obtido segundo de Souza (41). Porções de 25 mg de EBC foram lavadas sucessivamente durante 15 minutos a 3.000 g a 4° com 25 ml de acetona (2 vezes), mistura em partes iguais de éter e acetona

(2 vezes) e éter (2 vezes). O sedimento obtido foi secado com jato de ar e conservado no vácuo a 4° até o momento de uso.

Obtenção da fração contendo antígenos de superfície (FA). A FA foi obtido segundo de Souza (41). Porções de 25 mg de EBC após delipidação, foram tratados com 25 ml de NaCl 0,15 M durante 10 minutos em banho de gelo com agitação ocasional. O sedimento obtido após centrifugação a 12100 g durante 30 minutos a 4° foi tratado com 25 ml de solução de NaOH 0,1 M e mantido em banho de gelo durante 10 minutos. A seguir, a suspensão foi centrifugada nas condições descritas e o sobrenadante obtido, precipitado a pH 5,5 com HCl 0,1 M, mantendo-se em banho de gelo 15-20 minutos. O precipitado formado foi separado por centrifugação nas condições usuais e o sedimento foi dissolvido em tampão TRIS-HCl 0,05 M pH 8,1. Esta fração dissolvida foi centrifugada a 4° 12.100 g, durante 30 minutos, e o sobrenadante límpido, rotulado FA, foi concentrado em membrana ultrafiltrante Diaflo pM 10 (Amicon), sob pressão de Nitrogênio e imediatamente liofilizada.

Imune soros

1. soro anti *T. cruzi* obtido de formas de cultura (anti EBC). Suspensões lavadas de formas de cultura de *T. cruzi* contendo 30×10^6 parasitas por ml, lisados por congelamento e descongelamento sucessivos (3 vezes), serviram para imunizar 4 coelhos. Estes animais receberam inicialmente 1 ml do lizado por via intraperitoneal. Após 7 dias, receberam inoculações intradérmicas de 0,5 ml da mesma suspensão a intervalos de 3 dias, durante 3 meses. Uma semana após a última inoculação, os animais foram sangrados e os soros obtidos, após inativação a 56° por 30 minutos, foram mantidos a -20° até o momento de uso.

2. soros anti *T. cruzi* obtidos de camundongos com infecção experimental. Estes imune soros foram obtidos de diferentes lotes de camundongos Swiss inoculados com amostras Y ou Ni

caragua (NIC) de *T. cruzi*. Os soros anti amostra NIC (a-NIC) foram obtidos de animais inoculados com 0,2 ml de sangue contendo 10^3 tripomastigotas. A cada 7 dias, durante 8 semanas, um lote de 15 animais era sangrado a branco. O sangue era deixado coagular em um período máximo de 2 horas a temperatura ambiente. A seguir, o soro era separado e realizado o controle da presença de formas tripomastigotas. Os soros que não apresentavam parasitas, foram misturados, inativados a 56° e mantidos a -20° até o momento de uso.

Os soros anti amostra Y (a-Y), nos foram cedidos pelo prof. E. Salata da U.N.E.S.P. e obtidos pela inoculação de 0,2 ml de sangue contendo 200 tripomastigotas. A coleta do sangue e obtenção dos imune soros foi semelhante à técnica empregada para obtenção dos imune soros anti-NIC.

3. soros anti - FA. Coelhos foram inoculados no coxim plantar com 0,5 ml em partes iguais de FA (2mg prot./ml) e adjuvante de Freund completo. Vinte dias após, foram inoculados por via intraperitoneal com 1 ml de FA suspensa em 1 ml de NaCl 0,15 M. Após 7 dias, foram feitas, semanalmente durante 20 semanas consecutivas, injeções intradérmicas de 0,5 ml de FA (1 mg prot./ml). A seguir, os animais receberam inoculações intravenosas de 1 ml de FA (1 mg prot./ml) com intervalos de 3 dias, durante 2 meses. Decorridos 10 dias da última inoculação, os animais foram sangrados. Os soros obtidos foram inativados a 56° e mantidos a -20° até o uso.

4. soros humanos de pacientes chagásicos. Estes soros foram obtidos no laboratório de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Ciências Médicas .UNICAMP. Todos apresentaram reações positivas de imunofluorescência frente a epimastigotas de amostra Y de *T. cruzi*.

Reação de aglutinação. Aliquotas de 20 ul de suspensão padronizada de *T. cruzi* foram misturadas, em lâminas escavadas, a

igual volume das diluições seriadas dos imunesoros e a 20 ul de tampão TRIS HCl 0,05 M. pH 7,2 adicionado de 0,5% de glicose. A mistura foi agitada suavemente com movimentos rotatórios e deixada em câmara úmida durante 1 hora a temperatura ambiente. A leitura da reação foi realizada ao microscópio ótico com objetiva 40/0,65 e ocular 8x. Como controle, foram incubados, nas mesmas condições, 20 ul de suspensão padronizada de *T. cruzi*, e 40 ul de tampão. O título aglutinante foi expresso pelo inverso da última diluição que apresentou reação positiva.

Inibição da reação de aglutinação. Alíquotas de 20 ul de FA em concentrações conhecidas foram incubadas com 20 ul das diluições dos soros por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, 20 ul da mistura foram transferidos para lâminas escavadas que continham 20 ul de suspensão padronizada de *T. cruzi* e volume semelhante de tampão. Após incubação de 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida, a leitura da reação era realizada em condições semelhantes à da reação de aglutinação. Os resultados foram expressos pelo inverso da última diluição que apresentou reação de aglutinação.

Reação de imunofluorescência. Foi empregada a técnica de imunofluorescência segundo Camargo (5), alterando o tempo de incubação indicado para 30 minutos. Os conjugados utilizados nas diferentes reações foram: Soro de cabra anti-IgG de camundongos e soro de cabra anti-gama globulina humana foram obtidos da Hyland Laboratories (U.S.A.); soro de carneiro anti-IgG de coelho obtido em nosso laboratório. Todos os conjugados foram previamente titulados em reações em bloco.

Inibição da reação de Imunofluorescência. As reações de inibição foram realizadas incubando a temperatura ambiente durante 1 hora, 20 ul de FA em concentrações conhecidas com 20 ul das diluições dos diferentes soros. A seguir, 10 ul de cada mistura foram transferidos para lâminas contendo formas epi

mastigotas tratadas pelo formol. A reação para verificação de imunofluorescência foi processada como indicado acima.

Atividade enzimática da FA. A determinação da atividade enzimática foi realizada segundo a técnica de Anson (3) modificada. Aliquotas de 0,5 ml de FA (1 mg prot/ml.) e 0,5 ml de hemoglobina bovina (80 mg/ml) foram misturadas e incubadas a 37° por 2 horas. Como controles da reação foram incubados 2 tubos, 1 dos quais continha apenas 0,5 ml de FA e outro somente 0,5 ml de hemoglobina bovina. Após incubação, foi adicionado a todos os tubos 1 ml de TCA a 5%. A seguir, aos tubos controles foram adicionados FA ou hemoglobina. Como branco de reação, foi preparado um tubo no qual misturou-se 1 ml de TCA 5%, 0,5 ml de hemoglobina bovina e 0,5 ml de FA. Todos os tubos foram incubados por 15 minutos a 45°. Após este tempo, foram centrifugados a 1.700 g durante 15 minutos a 4° e os sobrenadantes foram lidos a 280 nm. O resultado da atividade enzimática foi expresso em delta (Δ) D.O., diferença da leitura entre o tubo de reação e o tubo controle contendo FA.

Inibição da atividade enzimática. A inibição da atividade enzimática foi realizada incubando 0,1 ml de inibidor com 0,4 ml de FA em concentração conhecida. A seguir, a reação para determinar atividade enzimática era processada. Como controle, foram realizadas conjuntamente uma série de reações sem o inibidor.

Hemoglobina bovina. Hemácias provenientes de 1000 ml de sangue bovino foram lavadas com NaCl 0,15 M a 1.000 g durante 15 minutos a 4°. A papa de hemácias obtida, foi dialisada com agitação constante contra 5.000 ml de água destilada durante 48 horas a 4°. O material dialisado foi centrifugado a 12.100 g durante 30 minutos e o sobrenadante (hemoglobina), liofilizado e mantido a -20° até o momento de uso.

Concentração do antígeno ou frações antigênicas. Quando necessário, o antígeno ou frações antigênicas eram concentrados em membranas ultrafiltrantes pM 10, sob pressão de Nitrogênio (10psi). Durante o período de filtração, o material era mantido em banho de gelo.

Dosagem de proteínas. As proteínas totais foram dosadas pelo método de Folin Ciocalteu modificado por Lowry et.al.(20) e ou absorvância a 280nm. ou 220nm em espectrofotômetro Zeiss M4 Q III utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico.

Inibidores enzimáticos. Foram utilizados Di-isopropil fosfluoridrato (DFP) obtido da Sigma Chemical Company e Iodoacetamida obtida da National Biochemical Company.

Solventes orgânicos. Os solventes orgânicos continham a designação de quimicamente puro. A acetona foi redestilada a 56º neste laboratório. O éter livre de peróxidos, por lavagens sucessivas com solução saturada de sulfato ferroso e livre de álcoois e de água pela adição de sódio metálico, foi redestilada a 35º em presença de sulfato ferroso seco. Os solventes eram mantidos a -20º até o momento de uso.

Soluções tampões. As soluções tampões foram preparadas de acordo com as instruções de Gomori (12) de modo a se obter o pH desejado quando diluído a 1/10.

III . RESULTADOS

I. Reações de FA com os imune soros

A possível presença de anticorpos capazes de reagir com a FA em soros de animais infectados experimentalmente com o *Trypanosoma cruzi*, foi pesquisado através das reações de inibição de aglutinação e de imunofluorescência. Para isso, os soros obtidos semanalmente de lotes de camundongos inoculados com a amostra Y ou NIC foram titulados por ambas as técnicas.

Os resultados obtidos nas reações de aglutinação, indicaram a presença de antígenos comuns a ambas amostras visto que reações heterólogas foram observadas. (Fig. 2)

A titulação destes soros, indicou uma evolução cíclica nos níveis de anticorpos capazes de reagir com as formas epimastigotas tanto no sistema homólogo como heterólogo. (Figs. 1 e 2) Títulos máximos de aglutinação foram observados nos soros obtidos na infecção pela amostra Y no 28º dia e no 49º dia de infecção. Nos soros de animais infectados com amostra NIC, títulos máximos foram detectados entre o 28º e 42º dia e no 56º dia (Fig. 1).

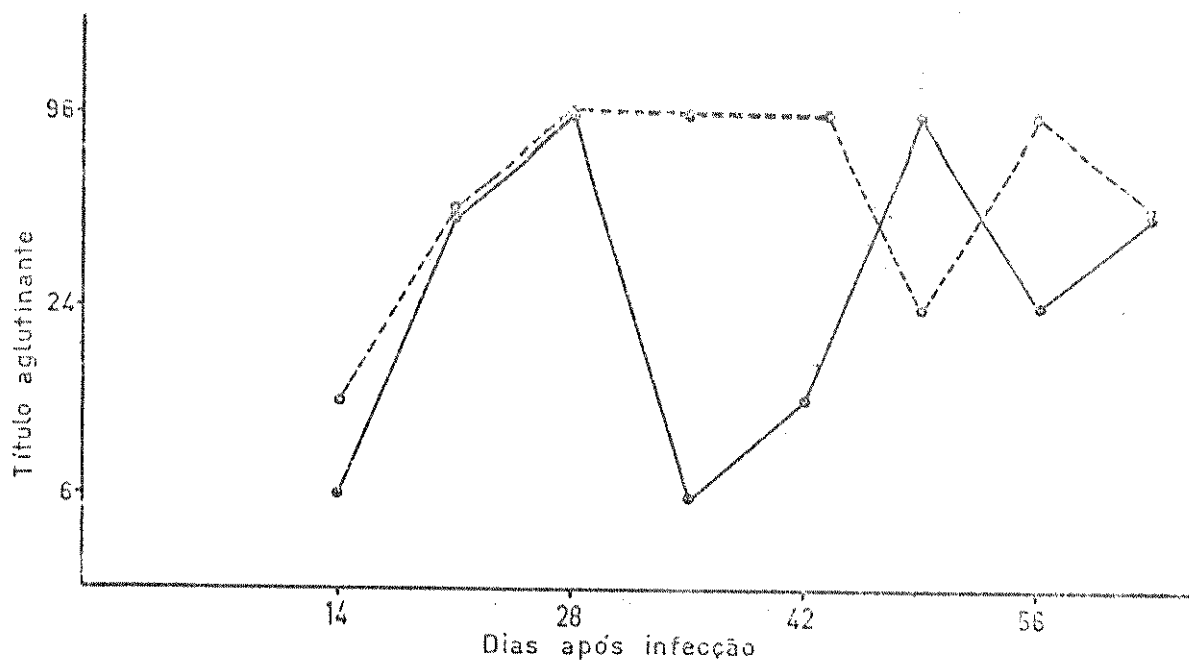


Fig. 1. Reações de aglutinação dos soros a-NIC (—○—) e a-Y (---○---) com amostras homólogas de *T. cruzi*

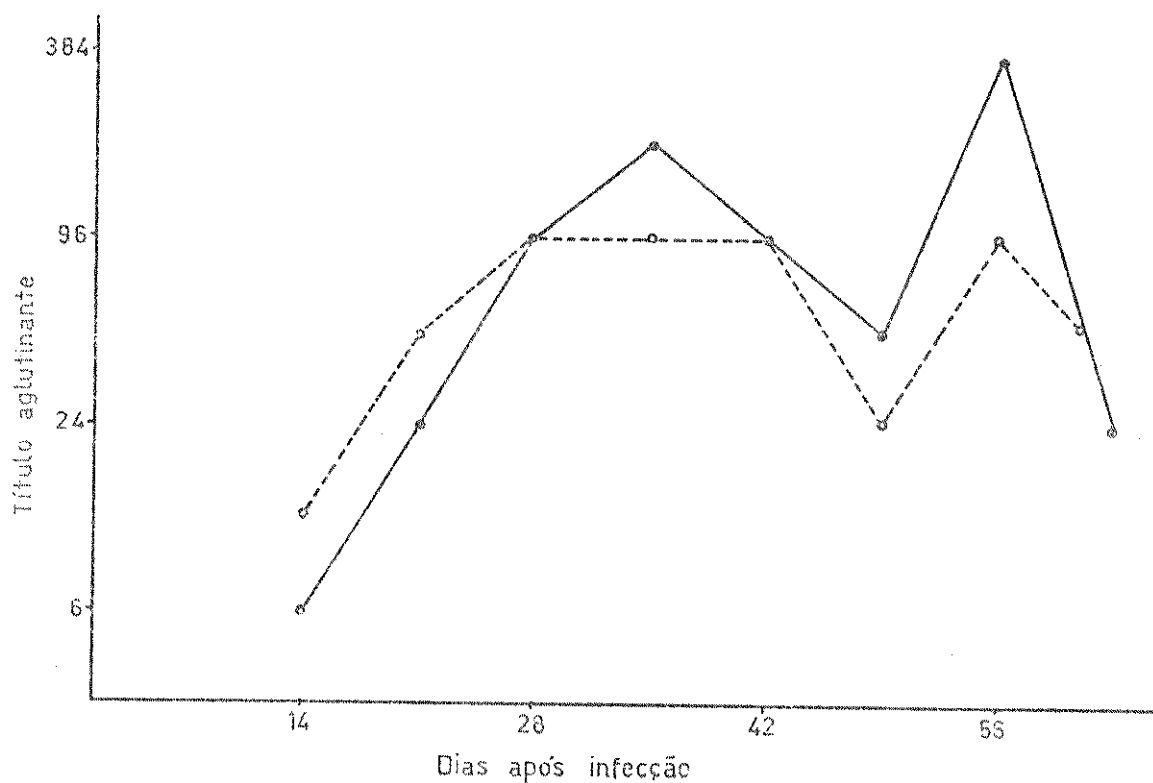


Fig. 2. Reações de aglutinação das amostras Y (—○—) e NIC (---○---) com os soros a-NIC nos diferentes períodos de infecção.

As reações de inibição da aglutinação destes soros pela FA, indicaram que anticorpos suscitados durante a infecção em camundongos, são capazes de reagir com esta fração (Figs. 3 e 4). Nestas reações foram utilizadas diferentes concentrações de FA e os resultados obtidos indicaram inibição em concentrações superiores a 100 ugr. No entanto, concentrações finais superiores a 300 ugr. não foram capazes de inibir totalmente a aglutinação das diferentes amostras de soros. A inibição da aglutinação no sistema homólogo foi inferior à observada no sistema heterólogo.

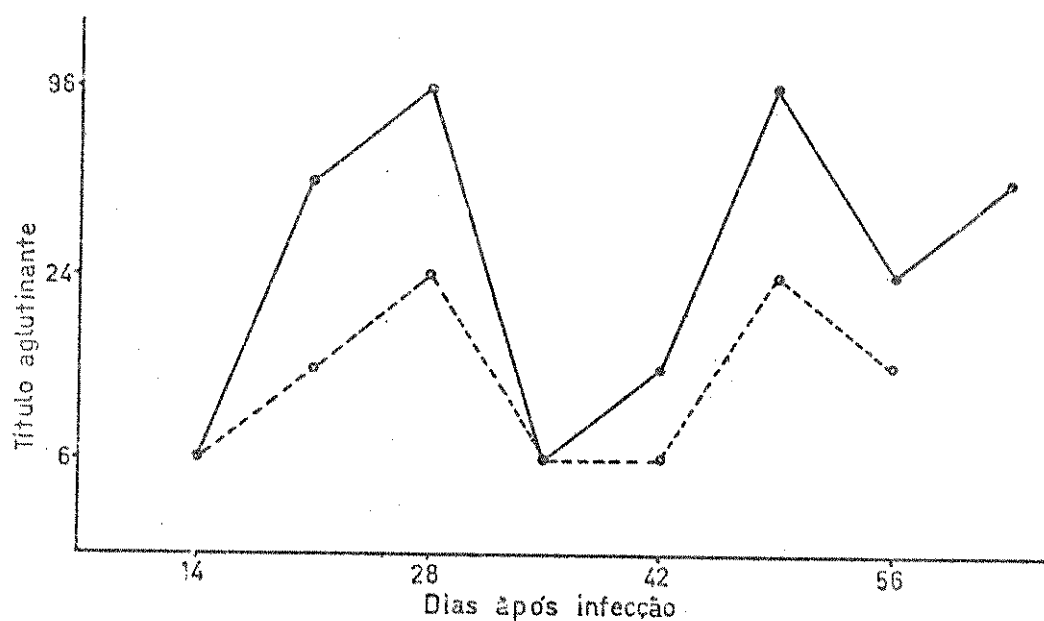


Fig.3. Reação de aglutinação da amostra Y com soros a-Y, obtidos em diferentes períodos de infecção, na ausência (●—●) ou na presença (○---○) de 150 µgr de FA.

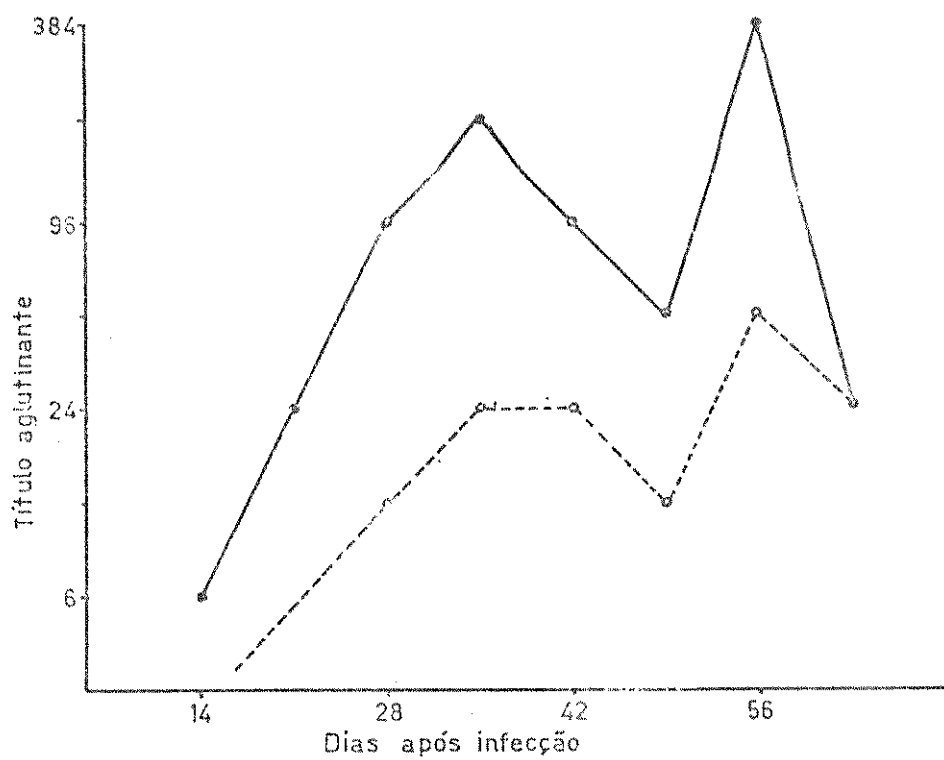


Fig. 4. Reação de aglutinação da amostra Y com soros a-NIC, obtidos em diferentes períodos de infecção, na ausência (—○—) ou na presença (---○---) de 150M de FA.

A titulação destes soros pelas reações de imunofluorescência, utilizando soro anti gama globulina 7 S, indicou que aparentemente a evolução dos níveis de anticorpos detectados por este antisoro também é cíclica. Títulos máximos de anticorpos foram detectados entre 28º e 42º e no 63º dias de infecção nos soros a-Y com epimastigota homólogo. Nos soros a-NIC, testados com amostra Y, os títulos mais altos foram encontrados entre 42º e 56º dia (Fig. 5). A comparação dos níveis de anticorpos obtidos com as duas amostras, sugere que os soros a-NIC possuem maiores níveis de anticorpos capazes de reagir com as formas epimastigotas.

A FA em diferentes concentrações, não foi capaz de inibir as reações de imunofluorescência destes soros.

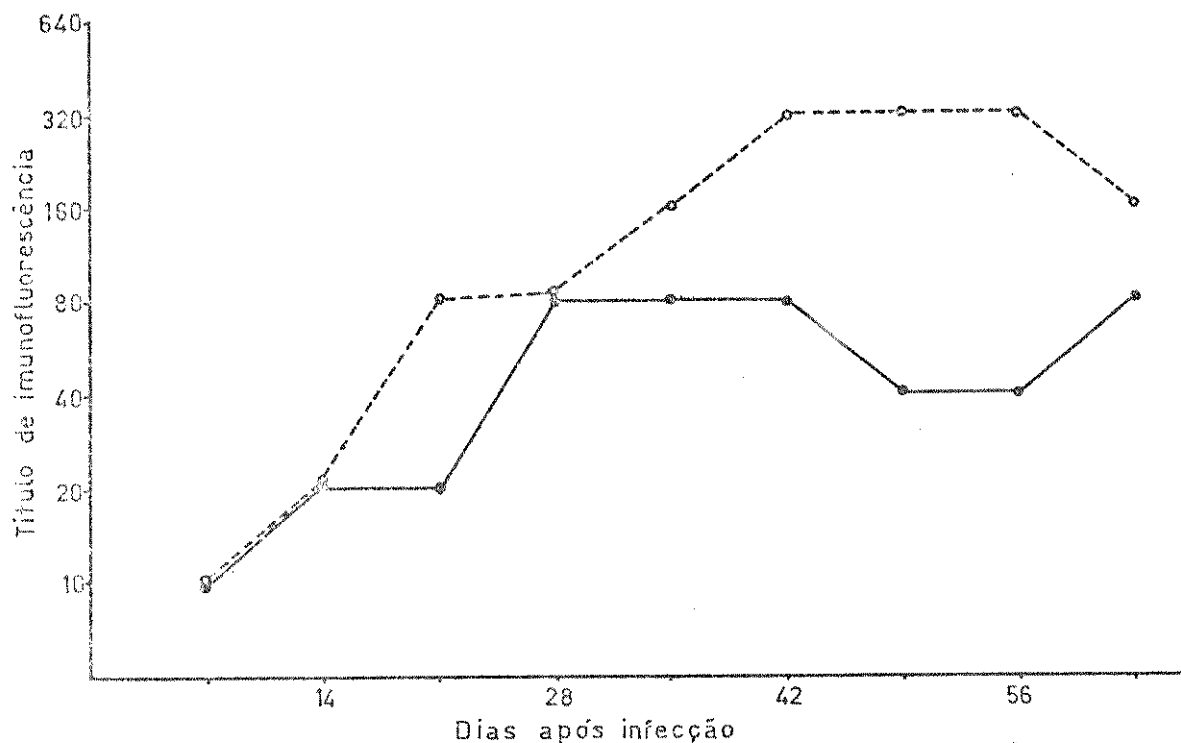


Fig. 5. Reações de imunofluorescência de epimastigotos da amostra Y testados com soros de camundongo a-Y(—●—) ou a-NIC.(---●---)

A comparação das curvas de titulação de anticorpos pelas técnicas de imunofluorescência e aglutinação, indicou, que no decorrer da infecção não há correspondência entre os títulos obtidos por uma ou outra técnica. As figuras 6 e 7 mostram a existência de períodos em que há acentuada diminuição dos títulos aglutinantes, enquanto os títulos obtidos por imunofluorescência permanecem inalterados ou levemente aumentados.

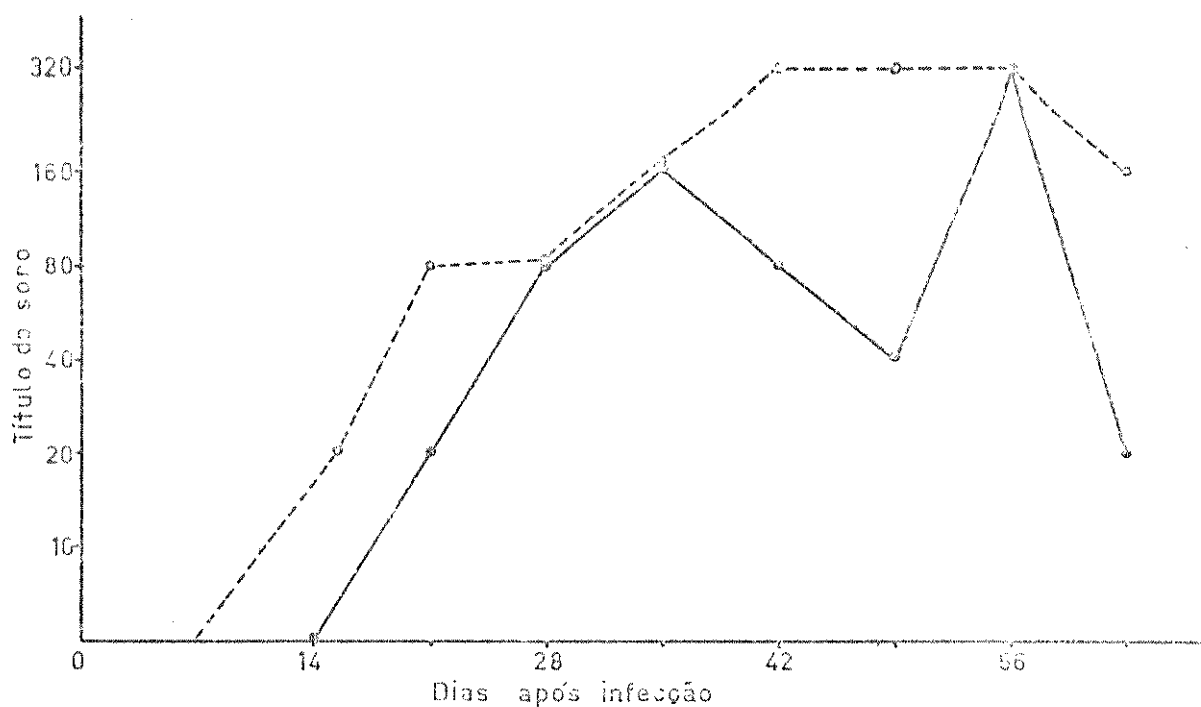


Fig. 6. Comparação dos títulos de anticorpos a-NIC, detectados pelas reações de imunofluorescência (---o---) e aglutinação (—o—) utilizando amostra Y.

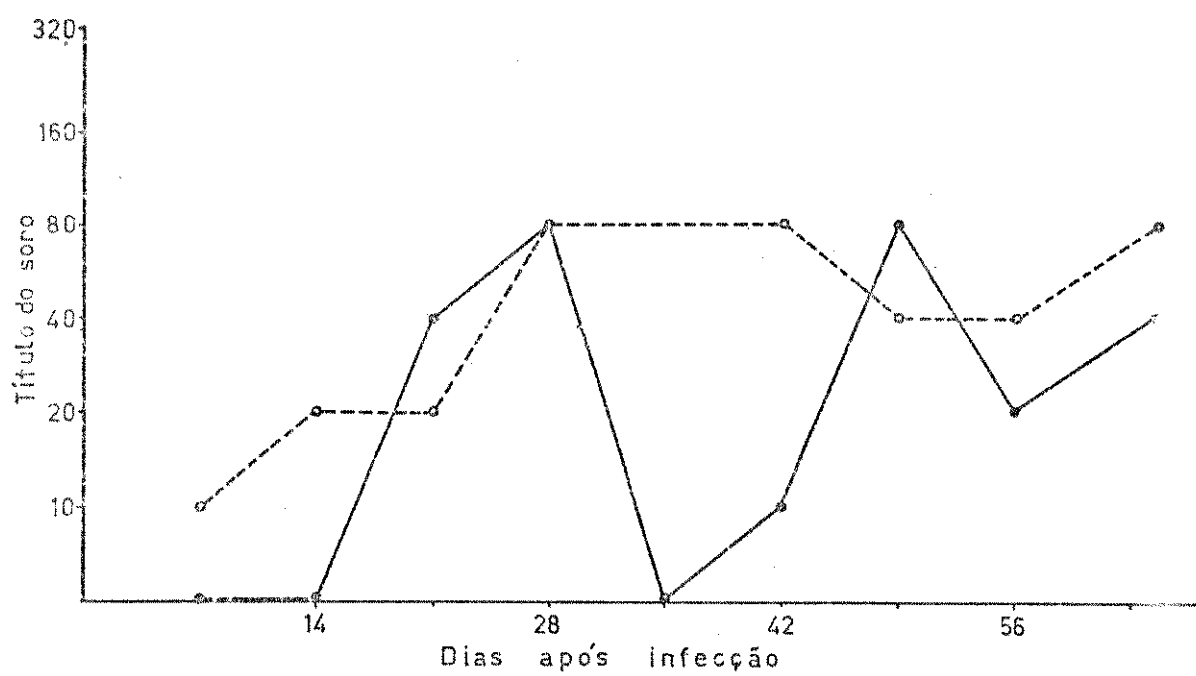


Fig. 7. Comparação dos títulos de anticorpos a-Y detectados pelas reações de aglutinação(●—●) e imunofluorescência(○---○) utilizando amostra Y.

A capacidade da FA inibir as reações de aglutinação e de imune fluorescência de 10 diferentes soros humanos com reação de imune fluorescência positiva para *T. cruzi*, foi investigada. Estes soros foram previamente titulados por ambas técnicas, utilizando-se como antígeno formas epimastigotas de amostra Y. Os resultados obtidos pela técnica de imune fluorescência, indicaram títulos entre 1/160 e 1/640 superiores aos encontrados por reação de aglutinação (de 1/24 e 1/196).

Concentrações de 100 ugrs. de FA não foram capazes de inibir estas reações.

Os soros de coelhos a-EBC apresentaram títulos aglutinantes sensivelmente maiores (entre 1/1.000 e 1/2.000) aos apresentados nas reações de imune fluorescência (1/160 e 1/320). Os testes de inibição com FA indicaram que ela é capaz de inibir as reações de aglutinação, porém, não foram observadas inibições nas reações de imune fluorescência quando empregadas concentrações de 500 ugr. a 1.000 ugrs. (Fig. 8)

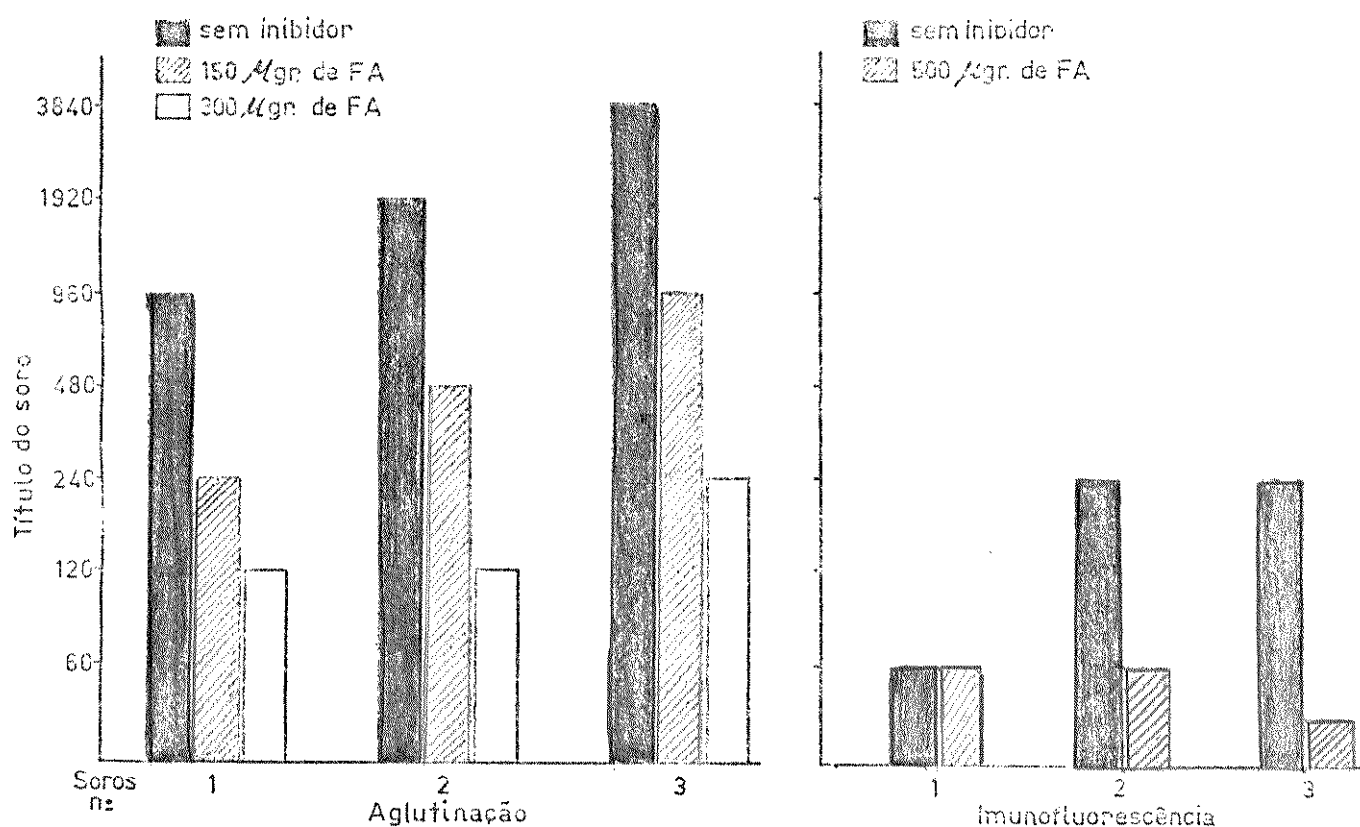


Fig. 8. Titulação dos soros anti FA e inibição da reação de aglutinação e de imunofluorescência pela FA.

A comparação entre os títulos obtidos nas reações de imunofluorescência e aglutinação com diferentes soros anti *T. cruzi*, assim como a incapacidade da FA para inibir as reações de imunofluorescência, sugeriram uma possível ação do formol sobre alguns determinantes antigênicos de superfície do *T. cruzi*, ou que determinantes antigênicos diferentes eram detectados por estas duas técnicas.

A fim de elucidar uma ou outra possibilidade, foram realizadas reações de aglutinação utilizando suspensões padronizadas de *T. cruzi* tratados com formol neutro em condições semelhantes às utilizadas para as reações de imunofluorescência. Como controle, foram realizadas simultaneamente aglutinações com parasitas vivos.

Os soros de camundongos assim como os soros humanos mesmo em diluições baixas (1:2) não foram capazes de aglutinar os parasitas tratados pelo formol.

A comparação dos títulos aglutinantes obtidos com os soros de coelhos anti EBC e anti FA empregando-se parasitos formolados e não formolados, indicaram uma queda nos títulos aglutinantes quando eram empregadas as formas epimastigotas tratadas pelo formol. (Fig. 9)

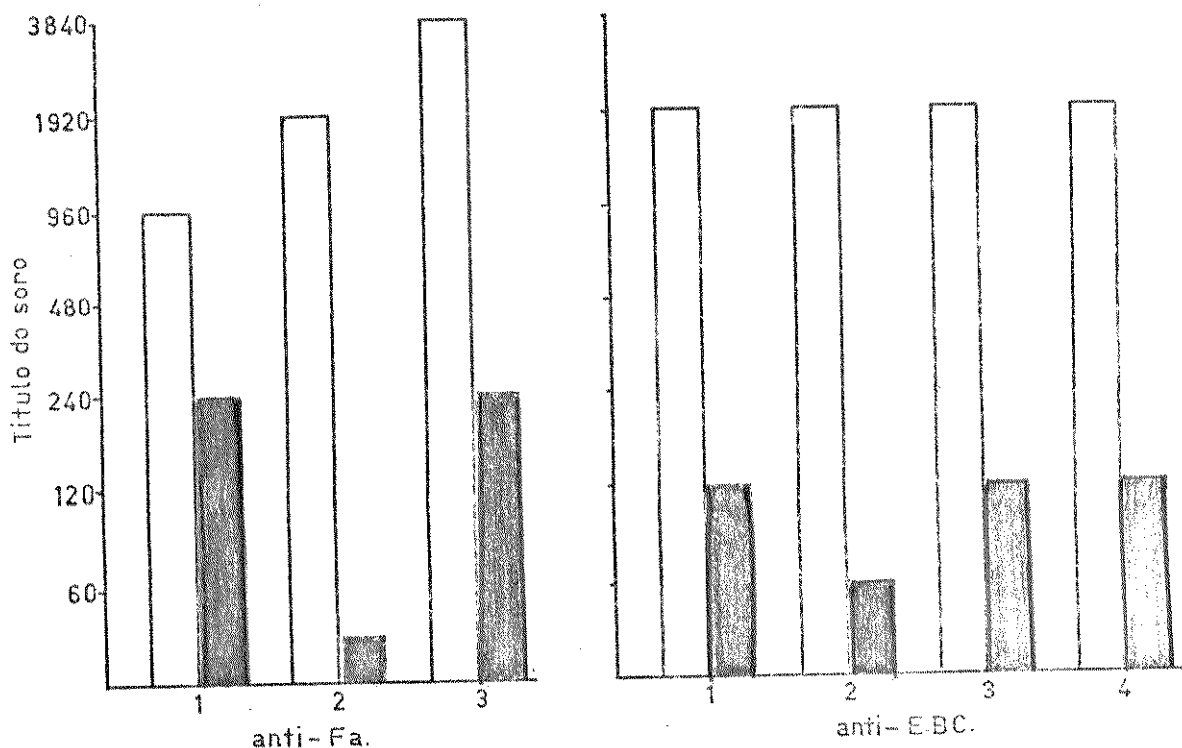


Fig. 9. Reações de aglutinação com soros anti FA e anti EBC com parasitos vivos (□) e tratados pelo formol (■)

II. Estudo da atividade enzimática da FA

Perdas significativas no teor proteico de FA, após congelamento e descongelamento sucessivos sem que, no entanto, houvesse alterações significativas na capacidade dessa fração em inibir a aglutinação dos diferentes imunesoros anti *T. cruzi*, sugeriu a presença de enzimas proteolíticas na fração. A presença de enzimas foi investigada através da técnica de Anson modificada, utilizando-se hemoglobina bovina como substrato (40 mg) e FA na concentração de 500 ugs.

Os resultados obtidos em diferentes partidas, indicaram uma atividade proteolítica da FA sobre hemoglobina bovina bem como uma autodigestão. (Tabela 1)

Tabela 1. Atividade proteolítica de diferentes partidas de FA (500 ugr) sobre Hemoglobina bovina (40 mg).

Partida	Absorvância dos sobrenadantes 280 nm.		Δ D.O.
	Tubo reação FA+hemoglobina	Tubo controle FA + tampão	
1	0,420	0,080	0,340
2	0,520	0,200	0,320
3	0,500	0,150	0,350
4	0,510	0,150	0,360

A possibilidade de inibir esta atividade proteolítica foi investigada, utilizando como inibidores Iodoacetamida (IA) e di-isopropil fosfofluoridrato (DFP). Os resultados (Tabela 2), indicaram que IA na concentração de 200 nM

inibia esta atividade. O DFP na concentração de 2mM não foi capaz de atuar sobre as enzimas existentes na FA. Maiores concentrações de DFP não foram testadas.

Tabela 2. Inibição da atividade enzimática da FA sobre hemo globina bovina com IA e DFP.

Inibidor	Absorvância dos sobrenadantes 280 nm.		
	Tubo reação FA+hemoglobina	Tubo controle FA + tampão	Δ D.O.
IA 20 mM	0,320	0,260	0,060
IA 2 mM	0,420	0,160	0,260
DFP 2 mM	0,500	0,220	0,280
	0,520	0,200	0,320

A presença de enzimas capazes de digerir componentes da FA sem alterar significativamente a capacidade de inibir reações de aglutinação dos diferentes imune soros, sugeriu a possibilidade de utilizar o fenômeno de autodigestão para obtenção de fragmentos com baixo peso molecular, contendo determinantes antigênicos da superfície da epimastigota. Esta possibilidade foi estudada incubando a 37° durante 60 e 120 minutos concentrações conhecidas de FA. Após este período, o material foi submetido a ultrafiltração sob atmosfera de Nitrogênio em membrana ultrafiltrante pM 10. Como controles de reação foram utilizados FA concentrado logo após a sua obtenção (tempo 0) e FA aquecida previamente a 56° durante 30 minutos e a seguir, incubada a 37° por 120 minutos.

As proteínas totais das frações concentradas foram determinadas assim como a capacidade de inibir as reações de aglutinação. As frações ultrafiltradas foram lidas no compri

mento de onda de 220 e 280 nm. e a seguir, liofilizadas e dialisadas contra água destilada durante 18 horas. Após diálise, novas leituras foram realizadas nos mesmos comprimentos de onda (Tab. 3) e determinada a capacidade de inibir a reação de aglutinação (Tabela 4).

Tabela 3. Absorvância dos ultrafiltrados obtidos por autodigestão.

Tempo de autodigestão (minutos)	Absorvância			
	Antes da diálise		Após a diálise	
	220 nm.	280 nm.	220 nm.	280 nm.
0	0,170	0,083	0,168	0,080
60	0,280	0,105	0,280	0,110
120	0,560	0,270	0,240	0,110
120 após inativação	0,145	0,072	0,150	0,080

Tabela 4. Reações de aglutinação do soro a-EBC Nº 2 após tratamento com os produtos de autodigestão da FA.

Inibidor	Diluições do imune soro				
	1:96	1:192	1:384	1:760	1:1420
Concentrados de					
0 minuto	+	+	-	-	-
60 minutos	+	+	±	-	-
120 minutos	+	+	+	-	-
120 minutos após inativação	+	+	-	-	-
Ultrafiltrados de					
0 minuto	+	+	+	+	-
60 minutos	+	+	±	-	-
120 minutos	+	+	+	-	-
120 minutos após inativação	+	+	+	+	-
Controle sem inibidor	+	+	+	+	-

IV . DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por Souza (40), demonstraram que a FA era capaz de inibir as reações de aglutinação de soros hiper imunes. Contudo, os anticorpos obtidos em imunizações experimentais podem não corresponder em especificidade aos obtidos no decorrer de uma infecção, já que os métodos de imunização e extração de antígenos podem alterar os determinantes, ocultando alguns ou expondo outros (44).

Os dados obtidos no presente trabalho, mostraram que durante a infecção no camundongo, seja com a amostra Y seja com a amostra NIC, aparecem anticorpos capazes de aglutinar as formas epimastigotas de uma e de outra amostra indicando que esses anticorpos são específicos para determinantes presentes na superfície de ambas as amostras. Esses determinantes, comuns a ambas as amostras, se acham representados na FA uma vez que ela foi capaz de inibir as reações de aglutinação.

Os títulos aglutinantes durante o processo de infecção sofreram uma variação cíclica, sugerindo a existência de estímulos periódicos. Essas variações, embora semelhantes em seu aspecto geral, ocorrem em períodos diferentes da infecção causada por uma ou outra amostra. As duas amostras diferem significativamente quanto à patogenicidade e periodicidade de picos de parasitemia (35). É provável que estas diferenças no padrão de evolução de aglutininas durante a infecção sejam reflexo das diferenças temporais de episódios de parasitemia.

O aspecto cíclico parece concordar com as observações de Möeller et. al. (22) que descrevem resposta cíclica de células formadoras de anticorpos IgM, como resposta a uma única dose de LPS de *E. coli*. Padrão semelhantes foi des

crito também por Romball et.al. (34) para células formadoras de anticorpos IgG como resposta a doses únicas de agregados de imunoglobulinas. Este padrão de resposta é interpretado como sendo um mecanismo regulador de anticorpos para antígenos persistentes (42).

A FA inibiu consistentemente a ação das aglutininas em quaisquer período da infecção, sugerindo uma alta especificidade e o fato de que a FA foi incapaz de inibir as reações de imunofluorescência desses soros, praticamente elimina a possibilidade da ocorrência de uma adsorção inespecífica de imunoglobulinas pela FA.

Apesar das reações de aglutinação não permitirem uma quantificação precisa do fenômeno de inibição, o conjunto de dados obtidos utilizando-se esta reação mostra que a FA possui determinantes do epimastigota contra os quais são suscitados anticorpos específicos durante a infecção experimental no camundongo. É conhecido, de longa data, que durante a infecção são suscitados anticorpos que reagem com extratos de epimastigotas (25) ou com essas formas íntegras (10, 29). Reações cruzadas entre os antígenos das diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* foram demonstrados através das reações de imunofluorescência utilizando-se soros de camundongos infectados com *T. cruzi* (18, 31). No entanto, não foi ainda descrita a obtenção de uma fração solúvel contendo determinantes de superfície correspondente àqueles anticorpos. Embora a fração FA não esteja completamente caracterizada, os resultados sugerem que ela possa vir a desempenhar um papel importante para o estudo da estrutura antigênica de superfície do *T. cruzi*.

A utilização das reações de imunofluorescência, para a titulação dos anticorpos produzidos pelos camundongos durante o desenvolvimento da infecção, mostrou uma evolução de títulos de anticorpos diferentes das observadas através das reações de aglutinação. A comparação das curvas obtidas, mostrou que durante os períodos em que haviam baixos títulos de anticorpos aglutinantes ocorriam altos títu

los de anticorpos detectados pela imunofluorescência. Essa dissociação sugere fortemente que determinantes antigênicos diferentes estão sendo detectados por uma ou outra técnica e que anticorpos contra esses diferentes determinantes são produzidos em diferentes períodos de infecção. Em concordância com esta hipótese, a FA nas concentrações utilizadas, não foi capaz de inibir as reações de imunofluorescência.

A investigação da ação do formol mostrou que este reagente é capaz de bloquear o determinante correspondente a FA enquanto que, aparentemente, não altera aqueles detectados pela reação de imunofluorescência. A ação do formol sobre as reações de aglutinação das formas epimastigotas descritas inicialmente por Hauschka(16) ainda não encontrou uma explicação satisfatória. Contudo, recentemente (Scott (36) baseado no princípio de que uma grande variedade de aldeídos provoca vesiculação de superfícies celulares, descreve um método de isolamento de membranas plasmáticas de macrófagos mediante tratamento destas células com formaldeído de 25 a 250 mM. Estes dados, permitem a suposição de que, sob a ação do formol, sejam expostos determinantes situados mais profundamente na superfície do parasita, determinantes estes, detectados pela reação de imunofluorescência indireta.

Os soros humanos apresentaram títulos baixos nas reações de aglutinação e altos títulos nas reações de imunofluorescência. Esses dados eram esperados, portanto foram utilizados soros de pacientes em fase crônica e é sabido que altos títulos de aglutinação são encontrados apenas na fase aguda. A FA não foi capaz de inibir as reações de aglutinação ou de imunofluorescência desses soros, indicando que ela não possui os determinantes antigênicos que correspondem àqueles anticorpos. Este fato, no entanto, não invalida a possibilidade de que determinantes antigênicos contidos na FA estejam representados durante a infecção humana. Pode-se supor que a semelhança do observado em camundongos, ocorreram períodos de ausência de anticorpos capazes de reagir

com a FA em presença de altos títulos de imunofluorescência.

Trabalhos de Repka et.al. (32), demonstraram atividade proteolítica em lisados de extratos brutos de *T. cruzi* em diferentes faixas de pH. Posteriormente, Costa (6) trabalhando com uma fração solúvel em NaCl 0,15 M obtida de EBC, demonstrou atividade proteolítica em pH 7 sobre a hemoglobina bovina e outros substratos. Essa atividade proteínica não foi inibida pelo DFP mas, era inibida pela IA.

Nossos resultados revelaram uma atividade proteolítica em pH 7 sobre a hemoglobina bovina. As experiências realizadas com inibidores, demonstraram que a FA era inibida, também, por IA e não pelo DFP. Apesar de termos obtido inibição somente com concentrações mais elevadas de IA, podemos admitir coincidências com os resultados obtidos por Costa (6), não se podendo por isso afastar a possibilidade de que uma mesma enzima proteolítica se ache distribuída na fração solúvel e na FA. Contudo, o método de obtenção da FA que envolve sucessivos tratamentos com ácidos e bases, permite supor que esta enzima esteja fortemente associada aos determinantes de superfície.

Os dados referentes à ação desta enzima sobre os determinantes de superfície, indicaram a possibilidade de obtenção de fragmentos de baixo peso molecular, que sejam capazes de inibir a reação de aglutinação de soros hiperimunes. Os ultrafiltrados dos digestos contêm componentes de pequeno peso molecular (entre 5 e 10.000) e devem conter uma quantidade muito pequena de núcleos aromáticos visto que seu teor proteico não pode ser estimado pelos reagentes do Lowry (20) e houve uma baixa absorvância a 280 nm. Talvez, o baixo peso desses componentes explique a pequena inibição das reações de aglutinação observadas. Seria necessário testar maiores concentrações deste material para permitir uma competição efetiva pelo sítio combinatório do anticorpo. Torna-se necessário uma investigação mais profunda desse mate

rial de baixo peso molecular e da atividade proteolítica as sociada a FA a fim de se poder avaliar a importância desses achados para o conhecimento dos determinantes de superfície do *T. cruzi*.

V . RESUMO E CONCLUSÕES

Uma fração designada FA contendo antígenos de superfície das formas epimastigotas foi estudada com o sentido de verificar se alguns determinantes antigênicos presentes naquela fração estariam representados durante a infecção pelo *T. cruzi*.

Soros de 10 pacientes humanos em fase crônica e soros de camundongos obtidos de diferentes períodos de infecções experimentais com duas amostras (Y e NIC) foram estudadas utilizando-se as técnicas de inibição de aglutinação e inibição da imunofluorescência.

Os resultados obtidos indicam que:

1. Os soros humanos em fase crônica não foram capazes de reagir com a FA;
2. A FA possui determinantes de superfície da epimastigota que se acham representados durante a infecção experimental de *T. cruzi* em camundongos;
3. A evolução dos títulos de anticorpos detectados pelas reações de imunofluorescência, foi diferente daquela detectada pela reação de aglutinação. A FA embora iniba as reações de aglutinação, das formas epimastigotas vivas , não inibe as reações de imunofluorescência, sugerindo que estas reações detectam diferentes determinantes antigênicos;
4. Existe uma atividade proteolítica, associada a FA, capaz de degradar a hemoglobina bovina ou os antígenos presentes na FA.

VI . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Afchain, D. & Capron, A. - Analyses immunoélectrophoretique des antigènes solubles de *Trypanosoma cruzi* applications à la trypanosomiase expérimentale de la souris. Gaz. Med. Bahia, 71(1): 7-15, 1971.
2. Alvarez, M.; Cerisola, J.A. & Rohwedder, R.N. - Test de immunofluorescencia para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Primer Congreso Latinoamericano de Parasitologia. Stgo. de Chile, Resúmenes, p.32. 1967.
3. Anson, M.L. - The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. 22:79, 1938.
4. Batista, S.M. & Santos, V.M. - Methyl antigen from *Schizotrypanum cruzi* culture. Hospital Rio de Janeiro, 56: 1045-51, 1959.
5. Camargo, M.E. - Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *T. cruzi* in a slide test. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo 8(5): 227-234, 1966.
6. Costa, M. G. - Atividade proteinásica dos lisados de *T. cruzi* (Chagas, 1909). Campinas, 1977. Tese Inst.de Biol. Univ. de Campinas.
7. Dzbeniski, T.H. - Exoantigens of *Trypanosoma cruzi* in vivo. Tropenmed. Parasit. 25(4): 485-491, 1974.

8. Fernandes, J.F. & Castellani, O. - Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol., 18: 195-202, 1966.
9. Fife, E.H. & Kent, J.F. - Protein and carbohydrate complement fixing antigens of *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 9: 512-517, 1960.
10. ----- & Muschel, L.H. - Fluorescent antibody technic for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 101: 540-543, 1959.
11. Guerreiro, C. & Machado, A. - Da reação de Bordet Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento de diagnóstico. Brasil. Med. 27: 225-226, 1913.
12. Gomori, G. - Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (Eds.) Methods in enzymology I: 138-146. Academic Press Inc. Publ. N.Y., 1955.
13. Gonzales-Cappa, M.S.; Schmuniz, G.A.; Travesa, D.E.; Yanovsky, J.F.; Etcheverry, M.E. & Garavelli, H.I. - Nueva técnica para la preparación de antígenos del *T. cruzi*. I. Efecto de la presión sobre el antígeno fijador de complemento. Rev. Soc. Argentina Biol. 42: 78-84, 1966.
14. -----; Vattuone, N.H.; Menes, S. & Schmuniz, G.A. - Humoral antibody response and Ig characterization of the specific agglutinins in rabbits during experimental American trypanosomiasis. Exp. Parasitol. 34: 32-39, 1973.
15. Gonçalves, J.M. & Jamaha, T. - Immunochemical polysaccharide from *Trypanosoma cruzi*. J. Trop. Med. Hyg. 72(2):39-44, 1969.

16. Hauschka, T.S.; Goodwin, M.B.; Palmquist, J. & Brown, E. Immunological relationship between seven strains of *Trypanosoma cruzi* and its application in the diagnosis of Chagas' disease. Amer. J. Trop. Med., 30: 1-16, 1950.
17. Ketteridge, D. - *Trypanosoma vivax*: Surface interrelationships between host and parasite. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 66: 324, 1972.
18. Kloetzel, J.; Camargo, M.E. & Giovaninni, V.L. - Antigenic differences among epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool. 22 (2): 259-261, 1975.
19. Knierim, F. & Saavedra, P. - Técnica de la reacción de hemaglutinación aplicada al diagnóstico serológico de las parasitosis. Bol. Chile Parasitol. 21: 29-44, 1966.
20. Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, R.J. & Randal, R. J. - Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
21. Maekelt, G.A. - Die komplementbildungsreaktion der chagas krankheit. Z. Tropenmed Parasit., 2: 152-186, 1960.
22. Möeller, E. & Greaves, M.F. - In Cell interaction and receptor antibodies in immune response. C.O. Makela , Cross, A. and Koseimen eds. p. 101. Academic Press. N. Y., 1971.
23. Muniz, J. - On the value of "conditioned hemolysis" for the diagnosis of American Trypanosomiasis. A comparative study with complement fixation and sensitized erythrocytes agglutination tests. Hospital Rio de Janeiro, 38: 685-691, 1950.

24. Muniz, J. & Boriello, A. - Estudo sobre a ação lítica de diferentes sôros sobre as formas de cultura e sangui-nicolas de *Schizotrypanum cruzi* . Rev. Brasil. Biol . 5: 563-576, 1945.

25. ----- & Freitas, G. de - Contribuição para o diag-nóstico da doença de Chagas pelas reações de imunida-de. II Isolamento de polissacarídeos de *Schizotrypanum cruzi* e de outros tripanosomídeos, seu comportamento nas reações de precipitação, de fixação de complemen-to e de hipersensibilidade. Os testes de floculação (sublimado e formol-gel). Rev. Brasil. Biol., 4: 421-438, 1944.

26. Nussensweig, V.; Deane, M.L. & Kloetzel, J. -Differences in constitution of strains of *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 14: 221-232, 1963.

27. ----- & Goble, F.C. - Further studies on the antigenic constitution of strains of *T. cruzi*. Exp. Parasitol., 18(2): 224-230, 1966.

28. Organización Mundial de la Salud - Imunología y enferme-dades parasitárias. Informe de un comité de expertos de la. O.M.S., Serv. Inf. Tec., 315, 1965.

29. Packchanian, A. - Agglutination and precipitation tests for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection (Cha-gas' disease). J. Immunol. 29: 84-85, 1935.

30. Pedreira de Freitas, J.L. & Almeida, J.O. - Nova técnica de fixação de complemento para a molestia de Chagas . Reação quantitativa com antígeno gelificado de cultu-ras de *Trypanosoma cruzi*. Hospital, Rio de Janeiro, 35: 787-800, 1949.

31. Repka, D. - Contribuição ao estudo imunológico das formas de cultivo do *Trypanosoma cruzi*. Campinas, 1973. Tese Inst. Biol. Univ. de Campinas.
32. Repka, D. & Kier, J. - The humoral response to Chagas' disease. Symposium on immunity to the mammalian trypanosomatids. In: Abstracts of the 49th annual meeting of the American Society of Parasitologists. N.Orleans, 1975.
33. ----- ; Rangel, H.A. & Costa, M.G. - Atividade proteolítica de extratos de *T. cruzi*. Resumos da XXIV Reunião Anual da SBPC., Cien. e Cult. 24(6): 296, 1972.
34. Romball, C.G. & Weigle, W.O. - A cyclical appearance of antibody producing cells after a single injection of serum protein antigen. J. Exp. Med. 138(6): 1426-1442, 1973.
35. Salata, E. - Proteínas séricas de camundongos infectados com amostras Y ou Nicaragua de *Trypanosoma cruzi*. Campinas, 1977. Tese Inst. Biol. Univ. Campinas.
36. Scott, R.E. - Plasma membrane vesiculation; a new technique for isolation of plasma membranes. Science, 149 (4266): 743-745, 1976.
37. Senekjic, H.A. - Flagellar and somatic agglutinogens of *Trypanosoma cruzi*. Proc. Amer. Fed. Clin. Res. 1: 33, 1943.
38. Silva, L.H.P. & Nussensweig, V. - Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin. e Biol. S. Paulo, 20: 191-208, 1953.

39. Siqueira de, A.F.; Ferrioli, F. & Cavalheiro, J. - Um antígeno solúvel presente no soro de ratos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Nota previa. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 8: 148, 1966.
40. Souza, O. de - Obtenção de uma fração solúvel de superfície de *Trypanosoma cruzi*. Tese Inst. Biol. Univ. Campinas (em redação).
41. Teixeira, A.R.L. & Santos-Buch, C.A. - The experimental Chagas' disease. I preparation of *T. cruzi* antigens and humoral antibody response to these antigens. J. Immunol. 113(3): 859-869, 1974.
42. Weigle, W.O. - Cyclical antibody production and immune response. Adv. Immunol. 21: 87-112, 1975.
43. Wilson, R.J.M. - Soluble antigens as blocking antigens. In: Parasites in the immunized host. Mechanism of survival. Ciba Foundation Symposium 25: 185-203, 1974.
44. William, C.A. & Chase, M.W. eds. - Antigens. In: Methods in immunology and immunochemistry 1: 1-196, 1967. Acad. Press. N.Y.
45. World Health Organization. Memoranda. Immunology of Chagas' disease. Bull. World. Org., 50: 459-472, 1974.