

## ANÁLISE ANTIGÊNICA DE DIFERENTES CEPAS DO *TRYPANOSOMA CRUZI* (\*)

Sonia G. ANDRADE (1), Virginia ANDRADE (1), Francisco Dário ROCHA FILHO (2) e Manoel BARRAL NETTO (1)

### RESUMO

Foi feita análise imunoeletroforética dos extratos antigênicos de três diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* que, pelos seus caracteres morfológicos e histopatológicos, representam os protótipos de três diferentes tipos de cepas: Tipos I (cepa Peruana), II (12SF) e III (Colombiana).

A análise foi feita contra soros hiper-ímmunes obtidos em coelhos sensibilizados com os mesmos antígenos, de mistura com o Adjuvante de Freund. A análise de cada antígeno foi feita contra o antissoro homólogo (obtido pela sensibilização com a mesma cepa) e contra os antissoros heterólogos. Verificou-se para cada cepa estudada, nítidas diferenças do padrão imunoeletroforético em relação ao número, distribuição e intensidade das linhas de precipitação. Os soros anti-Peruana e anti-12SF quando reagiram com os antígenos heterólogos mantiveram o mesmo padrão observado em sua reação com o antígeno homólogo. O soro anti-Colombiana, entretanto, mostrou padrões diferentes quando reagiu com os antígenos heterólogos. Os resultados sugerem que existem componentes comuns nas três cepas, que diferem quanto à sua imunogenicidade e que a cepa Colombiana tem, além disto, componentes próprios, que diferem das demais. Parece interessante a verificação de que cepas de diferentes tipos também diferem quanto aos seus componentes antigênicos.

### INTRODUÇÃO

Vários estudos têm demonstrado que a composição antigênica de extratos de *Trypanosoma cruzi* pode diferir de uma cepa para outra<sup>7,8, 10,11,12,13</sup> porém estas diferenças antigênicas parecem não estar relacionadas com a procedência da cepa ou com o tipo de hospedeiro vertebrado do qual a mesma foi inicialmente isolada<sup>7,13</sup>.

No presente trabalho procuraremos analisar antigenicamente três cepas do *T. cruzi* que, pelo seu comportamento no animal experimental, apresentam caracteres bastante distintos de acordo com vários parâmetros tais como seus caracteres morfológicos e histopatológicos.

Estas cepas são: Peruana, 12SF e Colombiana, as quais serviram também de protótipo para a classificação feita anteriormente por um dos Autores, utilizando esses mesmos caracteres<sup>3,4</sup>.

A análise antigênica foi feita pela dissociação imunoeletroforética dos seus diversos componentes, sendo cada cepa analisada em relação a um soro hiperímune homólogo e contra soros heterólogos obtidos em coelhos sensibilizados pelas diferentes cepas.

Os resultados foram interpretados de acordo com o padrão das linhas de precipitação, não se tendo a preocupação de enquadrar as cepas

(\*) Trabalho realizado com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e "UNDP/WB/WHO Special Program R.T.T.D."

(1) Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia

(2) Aluno do Curso de Pós Graduação (Mestrado) em Patologia Humana da Universidade Federal da Bahia, Brasil

nos padrões imunológicos anteriormente estabelecidos por outros Autores<sup>11,12,13</sup>, em relação à capacidade de absorver as aglutininas de um soro padrão.

## MATERIAL E MÉTODOS

As cepas cujos antígenos foram estudados são as cepas Peruana (Tipo I) (13), 12 SF (Tipo II) (3) e Colombiana (Tipo III) (6). Os elementos utilizados para a classificação em tipos, constam de trabalhos anteriores<sup>3,4</sup>. Estas cepas vêm sendo mantidas através passagens sucessivas em camundongos, com passagens intermediárias em triatomíneos. Foram recentemente isoladas em meio de cultura monofásico de WARREN<sup>14</sup>.

### Obtenção dos antígenos hidrossolúveis —

As formas de cultivo em meio de Warren, contendo 90 a 95% de epimastigotas foram utilizadas para obtenção do antígeno hidrossolúvel de acordo com a técnica usada por AFCHAIN<sup>1</sup>, sendo lavadas em soluto de Hanks (4 vezes a 2.000 g/15 minutos), congeladas e descongeladas sucessivamente por 10 vezes, centrifugadas a 26.000g por 1 hora a 4°C e o sobrenadante submetido a diálise contra água destilada por 20 horas a 4°C e a seguir liofilizado. Foi feita a dosagem proteica de cada antígeno pelo método de LOWRY & col.<sup>9</sup> com os seguintes resultados: antígeno de cepa Peruana — 72 mg/ml; antígeno de cepa 12 SF — 48 mg/ml e antígeno da cepa Colombiana — 60 mg/ml.

**Obtenção dos soros hiperimunes** — Para a obtenção dos anti-soros, coelhos adultos foram imunizados com antígeno liofilizado de mistura com adjuvante de Freund completo; o antígeno foi utilizado na proporção de 2 mg dissolvidos em 0,5 ml de salina e acrescentados de 0,5 ml de adjuvante de acordo com método usado por AFCHAIN<sup>1,2</sup>. Foram utilizados dois coelhos para sensibilização com cada antígeno, sendo aplicada uma dose semanal por via intramuscular, durante 12 semanas. Os soros obtidos foram concentrados após liofilização em 1/3 do volume inicial.

**Análise imunoeletroforética** — O antígeno de cada cepa foi analisado contra o anti-soro homólogo e contra os antissoros heterólogos, antes e após absorção com as diferentes cepas. A absorção dos antissoros com os diferentes antígenos foi feita de acordo com a técnica

descrita por GONZALEZ CAPPÀ & KAGAN<sup>7</sup> em que 1 mg de antígeno é incubado com 0,1 ml de soro imune por 1 hora a 37°C, por 12 horas a 4°C e em seguida centrifugado a 800 g por 10 minutos, usando-se os sobrenadantes para os testes.

A imunoeletroforese foi feita de acordo com a microtécnica utilizada por AFCHAIN<sup>1</sup>; empregando gel de agarose a 1% (3,5 ml de gel por lâmina de 7,5 X 2,5), tampão veronal pH 8,4 e corrente de 20V/lâmina durante 2 horas e meia. Os antígenos foram utilizados em concentrações idênticas, de 1 mg/15 microl, e em volumes de 30 microl; os antissoros concentrados foram usados em volumes de 0,3 ml por lâmina.

## RESULTADOS

### 1. Análise de cada antígeno contra o soro hiperimune homólogo —

A análise imunoeletroforética do antígeno de cada cepa, contra o soro hiperimune obtido em coelho sensibilizado contra o mesmo antígeno, demonstrou a dissociação dos componentes antigênicos através de um número variável de linhas de precipitação observando-se nítidas diferenças na distribuição e na intensidade destas linhas, bem como na migração dos diversos componentes quando foram comparadas as três cepas, como pode ser visto na Fig. 1.

### 2. Análise dos diversos antígenos contra os soros hiperimunes heterólogos: (Figs. 2 e 3)

- A reação dos antígenos das cepas 12 SF (Tipo II) e Colombiana (Tipo III) com o soro anti-Peruana (Tipo I) revelou padrão semelhante ao obtido quando este mesmo antissoro reagiu com o antígeno de cepa homóloga (Peruana).
- A reação dos antígenos das cepas Peruana e Colombiana contra o soro anti-12 SF (Tipo II) também determinou um padrão semelhante ao observado quando este mesmo antissoro reagiu com a cepa homóloga (12 SF).
- A análise dos antígenos das cepas Peruana e 12 SF contra o soro anti-Colombiana (Tipo III) revelou padrões diferentes aos obtidos com este mesmo antissoro quando reagiu com a cepa ho-

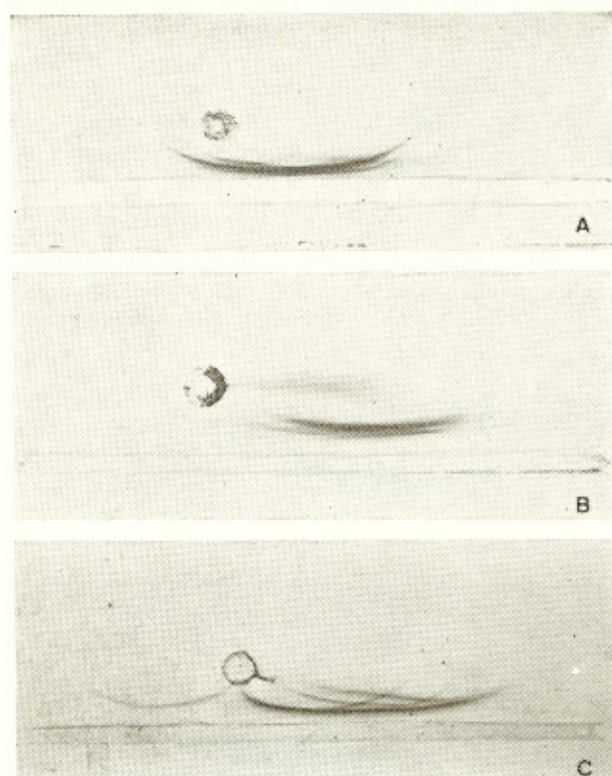


Fig. 1 — Resultado da análise imunoelctroforética do antígeno de cada cepa em relação ao anti-soro específico (homólogo): A — Antígeno da cepa Peruana X soro anti-Peruana; B — Antígeno da cepa 12SF X soro anti-12SF; C — Antígeno da cepa Colombiana X soro anti-Colombiana.

móloga (Colombiana). As linhas de precipitação foram em menor número do que as obtidas com o antígeno homólogo e houve também diferenças na localização das linhas obtidas.

troforética feita em relação ao seu próprio antígeno.

#### COMENTÁRIOS

- d. Conclusão: os soros hiper-ímmunes anti-Peruana e anti-12SF quando reagem com quaisquer das cepas heterólogas, revelam padrão idêntico ao que se obtém quando cada um destes antíssoros reage com a cepa homóloga (padrão de antíssoro). O antíssoro específico contra a cepa Colombiana (Tipo III) não revela o mesmo padrão quando analisado em relação às cepas Peruana (Tipo I) e 12 SF (Tipo II).

3. Análise após absorção dos antíssoros com cada antígeno — Os antíssoros submetidos a absorção com os antígenos das cepas heterólogas deram resultados negativos à análise imuno-

Cepas do *T. cruzi* de diferentes tipos quanto aos seus caracteres morfológicos e histopatológicos, apresentaram à análise imunoelctroforética de seus componentes antígenicos, padrões diferentes quanto à intensidade e distribuição das linhas de precipitação, bem como na migração dos componentes. A reação dos antíssoros com antígenos heterólogos revelou a presença de componentes comuns porém dotados de diferentes graus de imunogenicidade. Em relação às cepas Peruana e 12 SF, pôde-se demonstrar um padrão de antíssoro, fato este já assinalado anteriormente em relação a outras cepas por GONZALEZ CAPPA & KAGAN<sup>7</sup> que consideram os diferentes padrões imuno-

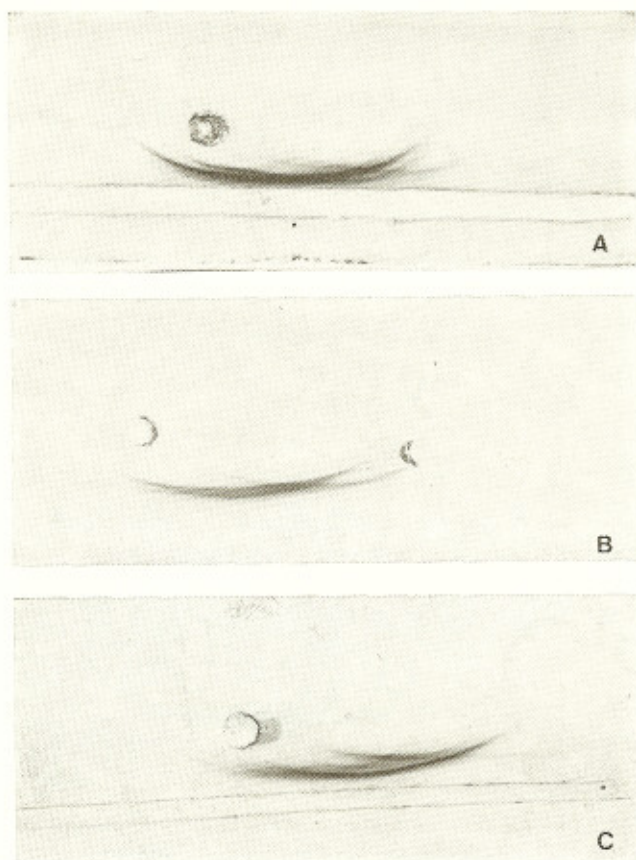


Fig. 2 — Resultado das reações à análise imunoeletroforética dos antígenos das três cepas em relação a um mesmo anti-soro (soro anti-Peruana), observando-se padrões semelhantes com o mesmo anti-soro: A — Antígeno de cepa Peruana X soro anti-Peruana; B — Antígeno de cepa 12SF X soro anti-Peruana; C — Antígeno da cepa Colombiana X soro anti-Peruana.

eletroforéticos não dependentes da cepa usada para a obtenção do soro imune, mas da resposta do animal imunizado, isto é, de cada soro em particular. Observou-se entretanto, no presente trabalho, que o soro anti-Colombiana apresenta diferenças nas linhas de precipitação à imunoeletroforese, quando analisado contra os antígenos heterólogos. Esta observação pode significar que, além dos componentes comuns, também existem componentes antigênicos diferentes. A absorção dos antissoros, com os diferentes antígenos, determinou a negatização das reações feitas após a absorção. Este fato fala contra a presença de componentes diferentes, mas não afasta de todo esta possibilidade desde que, o método que foi utilizado para a absorção, poderia ter determinado a sepa-

ração pela centrifugação de alguns dos componentes, de maneira inespecífica.

MEDINA & CHAVES<sup>10</sup> conseguiram detectar diferenças à análise imunoeletroforética entre cepas do *T. cruzi* isoladas na Venezuela e a cepa Y. Por este mesmo método, AFCHAIN<sup>1</sup> não conseguiu estabelecer diferenças entre três cepas por ele analisadas, as quais, entretanto, não foram estudadas comparativamente em relação a outros parâmetros. Este mesmo Autor descreveu nas cepas que estudou a existência de um componente de acentuada imunogenicidade que chamou de componente 5<sup>1,2</sup>. O estudo das cepas Peruana, 12 SF e Colombiana também revelou área de maior concentração das linhas de precipitação, correspondente ao com-

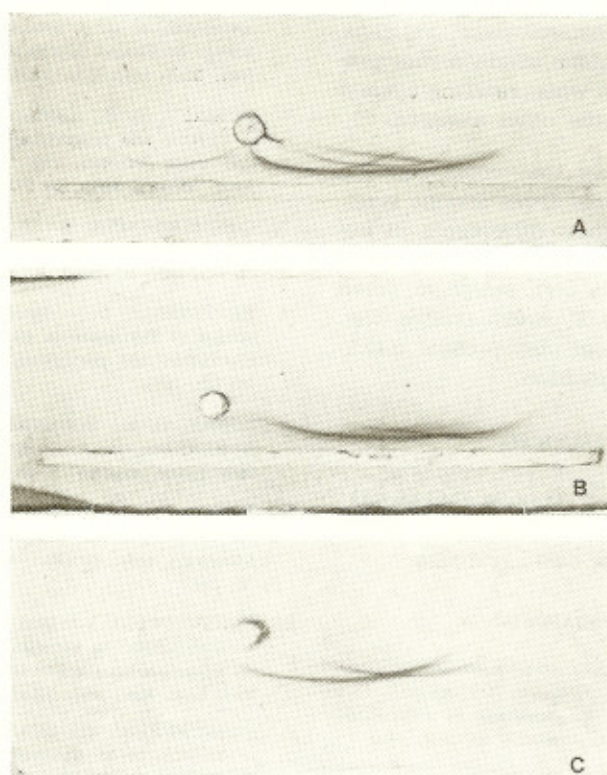


Fig. 3 — Análise dos antígenos das três cepas em relação ao soro anti-Colombiana: A — Antígeno da cepa Colombiana X soro anti-Colombiana; B — Antígeno da cepa Peruana X soro anti-Colombiana; C — Antígeno da cepa 12SF X soro anti-Colombiana. Os padrões imunoelectroforéticos foram diferentes, não reproduzindo o padrão do anti-soro.

ponente 5, embora não inteiramente superponíveis.

O presente trabalho permite demonstrar a existência de diferenças de composição antigênica entre cepas que diferem em relação a vários outros parâmetros. Até que ponto estas diferenças na composição antigênica podem estar relacionadas com os diversos aspectos das lesões tissulares e com o tipo de resposta do hospedeiro, ainda não está esclarecido. O tipo de lesão que se desenvolve no hospedeiro é, naturalmente, o reflexo da interação hospedeiro-parasito. Para esta resposta, a imunogenicidade parasitária deve ser importante fator. Como exemplos desta resposta imunológica, temos os aspectos observados principalmente na fase crônica da doença experimental<sup>5</sup> onde têm sido descritas lesões aparentemente relacionadas à deposição de complexos imunes como, por exemplo, a necrose arteriolar (arterite necro-

tisante), que é mais freqüente na infecção pela cepa Colombiana.

## SUMMARY

### Antigenic analysis of different strains of *Trypanosoma cruzi*

Clear-cut differences of number, distribution and precipitating lines were observed in the immunoelectrophoretic pattern of three different strains of *Trypanosoma cruzi*: Peruvian strain, 12SF and Colombian strains. They represented different types which were grouped separately according to morphologic and histopathologic criteria. Their soluble antigens were used to obtain hyperimmune sera in rabbits. Each antigen was analysed against either its own antiserum or heterologous sera.

Peruvian and 12SF strain anti-sera showed the same immunoelectrophoretic pattern with

both isologous and heterologous antigens. However, the anti-Colombian strain serum presented different patterns when reacting against its proper antigens and the other antigens.

Results are suggestive that cross reacting antigens are present in the three strains studied and that they may show differences in immunogenicity. Colombian strain, on the other hand, has in addition its own antigenic determinants. So, different *T. cruzi* strains that differ in so many aspects also present differences in antigenic composition.

### AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Prof. Moysés Sadigursky, pela revisão final do manuscrito e pela execução da parte fotográfica deste trabalho.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFCHAIN, D. — Le caractère antigénique des Trypanosomatidae heteroxenes de l'homme: *Trypanosoma* (S.) *cruzi*, *Trypanosoma* (T:) *B. gambiense* et *Leishmania donovani*. [Thèse]. França, Academie de Lille, 1976.
2. AFCHAIN, D. & CAPRON, A. — Analyse immunoelectrophoretique des antigenes solubles de *Trypanosoma cruzi*. Application à la trypanosomiase experimentale de la souris. Gaz. Méd. Bahia 71: 7-15, 1971.
3. ANDRADE, S. G. — Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. Rev. Pat. Trop. 3: 65-121, 1974.
4. ANDRADE, S. G. — Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strains in some types. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 18: 140, 1976.
5. ANDRADE, S. G. & ANDRADE, Z. A. — Patologia da doença de Chagas experimental de longa duração. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 10: 180-187, 1968.
6. FEDERICI, E. E.; ABELMANN, W. B. & NEVA, F. A. — Chronic and progressive myocarditis and myositis in C<sub>3</sub>H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. & Hyg. 13: 272-280, 1964.
7. GONZALEZ-CAPPA, S. M. & KAGAN, I. — Agar gel and immunoelectrophoretic analysis of several strains of *Trypanosoma cruzi*. Exper. Parasitol. 25: 50-57, 1969.
8. KETTERIDGE, D. — Differentiation of newly isolated strains of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* by agglutination and precipitation reactions. Acta Trop. 32: 173-189, 1975.
9. LOWRY, O. H.; ROSENBOUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. — Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265, 1951.
10. MEDINA, M. & CHAVES, J. — Gel diffusion and immunoelectrophoretic analysis of some Venezuelan *Trypanosoma cruzi* strains. Acta Cient. Venezol. 21: 65-67, 1970.
11. NUSSENZWEIG, V.; DEANE, L. M. & KLOETZEL, J. — Diversidade na constituição antigênica de amostras do *Trypanosoma cruzi* isoladas do homem e de gambás. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 4: 409-410, 1962.
12. NUSSENZWEIG, V.; DEANE, L. M. & KLOETZEL, J. — Differences in antigenic constitution of strains of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. 14: 221-232, 1963.
13. NUSSENZWEIG, V. & GOBLE, F. — Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* by agglutination and precipitation reactions. Parasitol. 18: 224-230, 1966.
14. WARREN, L. G. — Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I — Effect of culture age and substrate concentration rate. J. Parasit. 46: 529-539, 1960.

Recebido para publicação em 23/6/1980.