

ANTÍGENOS "PARTICULARES" A CEPAS DO *TRYPANOSOMA CRUZI*: DEMONSTRAÇÃO POR IMUNOELETROFORESE BIDIMENSIONAL

MARIZA GONÇALVES MORGADO*
MICHEL VAN HOEGAERDEN**
BERNARDO GALVÃO-CASTRO*

Os extratos solúveis das cepas Y, São Felipe e Colombiana do Trypanosoma cruzi foram analisados contra seus antissoros homólogos e heterólogos por imunoeletroforese bidimensional e imunoeletroforese bidimensional com gel intermediário.

Os resultados revelaram a existência de pelo menos 35 linhas de precipitação na cepa Y (32 de migração anódica e três de migração catódica), 24 linhas de precipitação anódica na cepa São Felipe e 22 na cepa Colombiana. Estas duas últimas cepas não apresentaram antígenos de migração catódica. Estes antígenos de migração catódica foram considerados "particulares" a cepa Y uma vez que quando testados contra antissoros heterólogos não observamos linhas de precipitação.

Através do uso da imunoeletroforese bidimensional com gel intermediário foram evidenciados cinco antígenos particulares à cepa Y quando comparada à São Felipe e oito quando comparada à cepa Colombiana. A cepa São Felipe mostrou um único antígeno particular quando comparada à cepa Colombiana porém, não se evidenciou nenhum antígeno particular quando a cepa São Felipe foi analisada contra o antissoro da cepa Y. A cepa Colombiana não demonstrou nenhum antígeno particular nem quando comparada à cepa Y nem à São Felipe.

Nossos resultados revelam que cepas pertencentes a diferentes tipos quanto ao comportamento morfológico e histopatológico também demonstram uma acentuada diferença quanto a seus componentes antigênicos.

As diferentes formas clínicas da doença de Chagas e a variedade no comportamento morfológico do *Trypanosoma cruzi* em animais experimentais sugerem a existência de populações antigenicamente distintas deste parasita.

* Instituto Oswaldo Cruz, Caixa Postal 926, 20000 Rio de Janeiro, Brasil.

** Consultor da Organização Mundial da Saúde.

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (Projeto nº 780618) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Recebido para publicação em 29 de setembro e aceito em 13 de outubro de 1981.

Nussenzweig, Deane e Kloetzel (1963) estabeleceram relações imunotaxonomias entre diversas cepas do *T. cruzi* provenientes de casos humanos, triatomíneos e animais silvestres utilizando as técnicas de aglutinação e precipitação em gel. Estes autores constataram a existência de tipos imunológicos distintos que se caracterizavam pela capacidade de absorverem total ou parcialmente as aglutininas de um soro padrão. Posteriormente, Nussenzweig e Goble (1966), observaram que estes tipos não estavam relacionados nem com a fonte do parasita nem com sua distribuição geográfica.

Analisando cepas do *T. cruzi* quanto a seus caracteres morfológicos e histopatológicos, Andrade (1974) propôs a existência de três tipos que se distinguiram pela parasitemia, virulência e tropismo tissular entre outros parâmetros. Comparando por imunoeletroforese simples o extrato solúvel das cepas Peruana, São Felipe e Colombiana, pertencentes a cada um dos três tipos, Andrade et al (no prelo) verificaram que estas cepas também diferiam quanto a seus componentes antigênicos.

Visto que as técnicas de imunodifusão e imunoeletroforese simples têm um limitado poder de resolução, principalmente se tratando de um sistema antigênico complexo como o dos tripanosomatídeos, utilizamos as técnicas de imunoeletroforese bidimensional e imunoeletroforese bidimensional com gel intermediário para analisarmos a composição antigênica do extrato solúvel de formas epimastigotas das cepas Y, São Felipe e Colombiana do *T. cruzi* pertencentes respectivamente aos tipos I, II e III da classificação de Andrade (1974).

Este trabalho demonstra a existência de antígenos "particulares" às cepas estudadas.

O termo antígeno "particular" foi utilizado ao invés de específico uma vez que não foi demonstrada a ausência destes antígenos em outras cepas existentes do *T. cruzi*.

MATERIAL E MÉTODOS

Tripanosomas

Foram utilizadas as cepas Y (Pereira da Silva & Nussenzweig, 1953), São Felipe-12 (Andrade, 1974) e Colombiana (Frederici, Obelmann & Neva, 1964) do *T. cruzi* mantidas em meio de cultura LIT (Camargo, 1964) através de repiques sucessivos a cada dois dias obtendo-se deste modo cerca de 98% de formas epimastigotas com uma concentração média de 10^8 parasitas por mililitro.

Preparo dos antígenos

Culturas contendo 10^{11} parasitas foram lavadas seis vezes em salina tamponada com fosfato pH 7,2 (PBS), por centrifugação a 1.500g durante 15 minutos a 4°C. O sedimento final foi ressuspenso em PBS e os parasitas foram rompidos por ultrassom utilizando-se cinco exposições de três minutos em banho de gelo com uma potência de 95 W. Posteriormente centrifugou-se cada amostra a 100.000g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore de 0,45 e 0,22 μ m sendo as amostras mantidas a -20°C até o uso.

A dosagem de proteínas de cada amostra foi feita segundo Lowry et al (1951), utilizando-se a soro-albumina bovina como padrão.

Obtenção dos antissoros

Os antissoros foram obtidos em coelhos Nova Zelândia através de imunização por via subcutânea segundo dois esquemas. No primeiro foram utilizadas doses de 5,0mg de proteínas totais de cada antígeno enquanto que no segundo os animais receberam 1,5mg de proteínas totais na 1ª e 2ª dose e 5,0mg de proteínas totais na 3ª e 4ª dose.

Na imunização primária o antígeno foi emulsionado em adjuvante completo de Freund. Após seis semanas injetou-se mais duas doses com intervalos de uma semana e mais uma quarta dose após um mês. Utilizou-se nas três últimas doses o adjuvante incompleto de Freund. Os coelhos foram sangrados pela veia marginal da orelha no 5º, 7º e 9º

dia após a 3ª e 4ª imunização. O sangue foi deixado coagular a 37°C por uma hora e a 4°C durante a noite. Posteriormente foi centrifugado a 1.500g durante 10 minutos e o soro estocado a -20°C até o uso.

Os soros foram testados por imunodifusão (Ouchterlony, 1958) e imunoeletroforese (Grabar & Williams, 1953). Fez-se um *pool* dos melhores antissoros obtidos para cada cepa do *T. cruzi* e estes foram então titulados por imunofluorescência indireta (Carmargo, 1966) utilizando-se o soro anti-imunoglobulina de coelho conjugado ao isotiocianato de fluoresceína obtido da Hew Hyland Co.

Imunoeletroforese bidimensional (Clark & Freeman, 1968)

Placas de vidro de 85x 60x1,5mm foram parcialmente (15x60x1,5mm) cobertas com 1,5ml de agarose 1,2% em tampão tris-barbital pH 8,6 e força iônica 0,02. Colocou-se 0,25 mg de proteínas do antígeno no orifício situado próximo à extremidade catódica da placa e procedeu-se à primeira eletroforese com 10V/cm a 4°C durante 45 ou 60 minutos. Na eletroforese em segunda dimensão incorporou-se no gel os antissoros obtidos contra cada cepa, variando-se o volume de acordo com o título de anticorpos obtido por imunofluorescência indireta. Nesta segunda corrida foram utilizadas 2V/cm a 4°C durante 18 horas.

Imunoeletroforese bidimensional com gel intermediário (Axelsen, Krøll & Weeke, 1973)

A primeira eletroforese foi feita de acordo com a descrição anterior. Após esta corrida introduziu-se um gel intermediário contendo o antissoros heterólogo e um gel superior contendo o antissoros homólogo. Para aumentar a resolução da técnica introduzimos uma camada de gel sem antissoros entre o gel intermediário e o superior. A eletroforese em segunda dimensão foi conduzida aplicando-se 2V/cm a 4°C durante 16 a 18 horas.

Rocket imunoeletroforese (Laurell, 1966)

Lâminas de microscopia de 76 x 26 x 1,0mm foram recobertas com 3,5ml de agarose 1,2% em tampão tris-barbital pH 8,6 e força iônica 0,02 contendo os antissoros obtidos contra cada cepa de *T. cruzi*. Foram feitos três orifícios em cada lâmina onde colocamos soro bovino em diferentes concentrações, meio de cultura e os antígenos solúveis de cada cepa. A eletroforese foi feita em direção ao anodo utilizando-se 10V/cm a 4°C durante três horas.

Em todas as técnicas de imunoeletroforese utilizadas as placas foram lavadas em PBS durante 48 horas e água destilada por 24 horas. Após a secagem as placas foram coradas durante 10 minutos com Coomassie Brilliant Blue R-250.

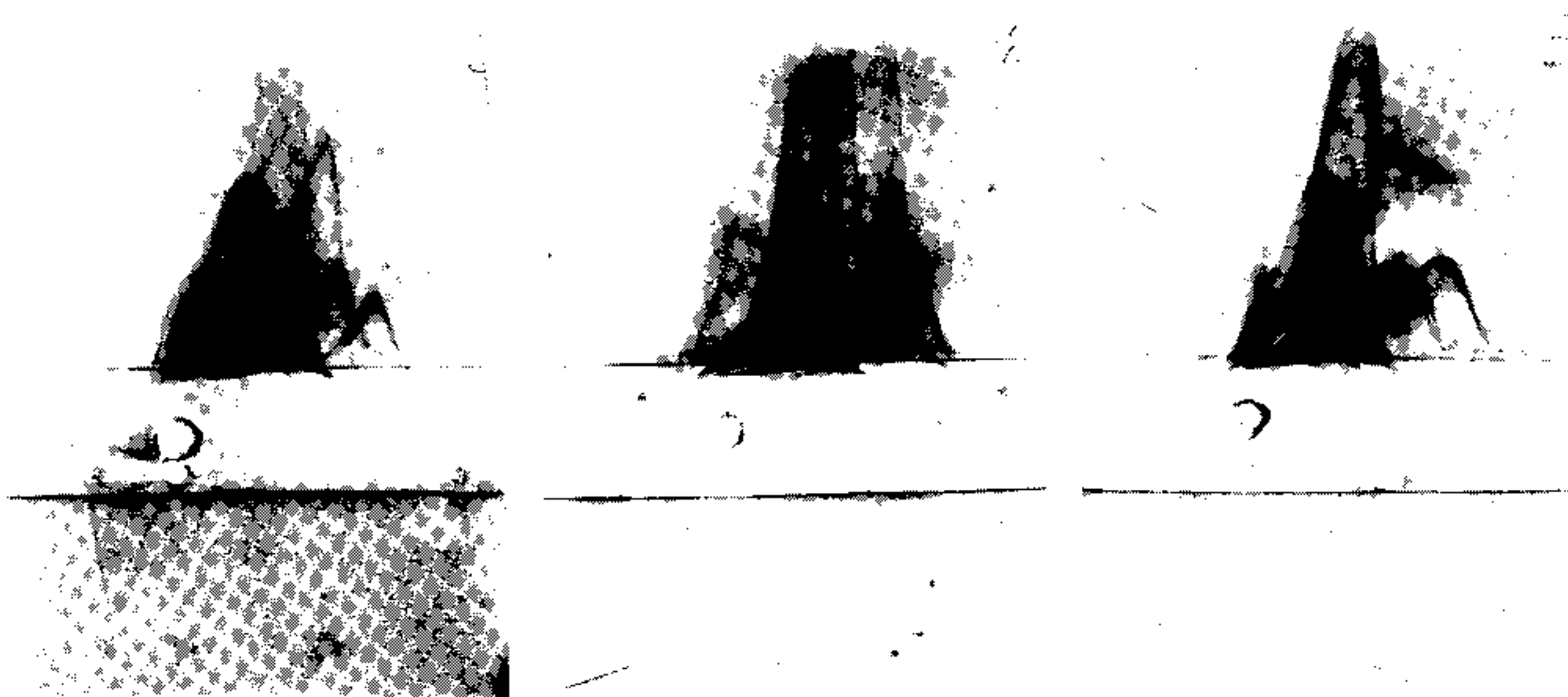
RESULTADOS

A análise dos extratos solúveis das cepas do *Trypanosoma cruzi* por imunoeletroforese bidimensional contra seus soros homólogos revelou:

- 32 linhas de precipitação distintas correspondentes a antígenos de migração anódica e três linhas de precipitação do lado catódico para a cepa V (Fig. 1).
- 24 linhas de precipitação de migração anódica para a cepa São Felipe (Fig. 2).
- 22 linhas de precipitação do lado anódico para a cepa Colombiana (Fig. 3).

Não foram observadas linhas de precipitação de migração catódica nem na cepa São Felipe nem na Colombiana, mesmo testando-se os antissoros destas duas cepas contra o extrato solúvel da cepa Y. Estes antígenos foram considerados "particulares" a esta cepa.

Com o objetivo de detectarmos diferenças antigênicas entre as três cepas utilizamos a imunoeletroforese bidimensional com gel intermediário.



- Fig. 1 – Antígeno: 13 μ l do extrato solúvel da cepa Y (18,96 mg ptn/ml).
Anticorpo: soro anti-cepa Y incorporado à agarose correspondendo a 28,5 μ l/cm².
- Fig. 2 – Antígeno: 14 μ l do extrato solúvel da cepa São Felipe (18 mg ptn/ml).
Anticorpo: soro anti-cepa São Felipe a 42,6 μ l/cm².
- Fig. 3 – Antígeno: 20 μ l do extrato solúvel da cepa Colombiana (12,44 mg ptn/ml).
Anticorpo: soro anti-cepa Colombiana a 14,2 μ l/cm².

Os antígenos foram separados inicialmente de acordo com suas mobilidades eletroforéticas e na eletroforese em segunda dimensão, migraram em direção ao gel intermediário que continha um antissoro heterólogo reagindo com os anticorpos ali existentes. Os antígenos que não encontraram anticorpos correspondentes no gel intermediário continuaram migrando até o gel superior onde estava incorporado seu antissoro específico formando-se ali arcos de precipitação cujos antígenos foram então considerados particulares à amostra testada.

Comparando-se os antígenos solúveis da cepa Y com os antissoros das cepas São Felipe e Colombiana, respectivamente, identificamos no gel intermediário a presença de um grande número de antígenos comuns às três cepas. Entretanto no gel superior distinguimos oito antígenos particulares à cepa Y quando comparada à Colombiana (Fig. 4) e cinco quando comparada à São Felipe (Fig. 5).

Não foi possível detectar nenhum antígeno particular à cepa São Felipe quando esta foi testada contra o antissoro induzido pela cepa Y, mesmo utilizando-se concentrações variadas de antissoros incorporados nos gels intermediário e superior (Fig. 6). Entretanto observa-se nitidamente a presença de um arco de precipitação no gel superior quando esta cepa foi testada contra o antissoro da cepa Colombiana (Fig. 7).

Quando a cepa Colombiana foi analisada contra os antissoros das cepas Y ou São Felipe não evidenciamos nenhum arco de precipitação no gel superior indicando a inexistência de antígenos particulares a esta cepa (Figs. 8 e 9).

O resumo destes resultados pode ser observado na Tabela I.

A análise dos controles por “rocket” imunoeletroforese não revelou linhas de precipitação entre os antissoros das diferentes cepas e o meio de cultura ou o soro bovino em diferentes concentrações, indicando que o número de lavagens dos parasitas foi suficiente para eliminar grande parte dos componentes do meio de cultura.

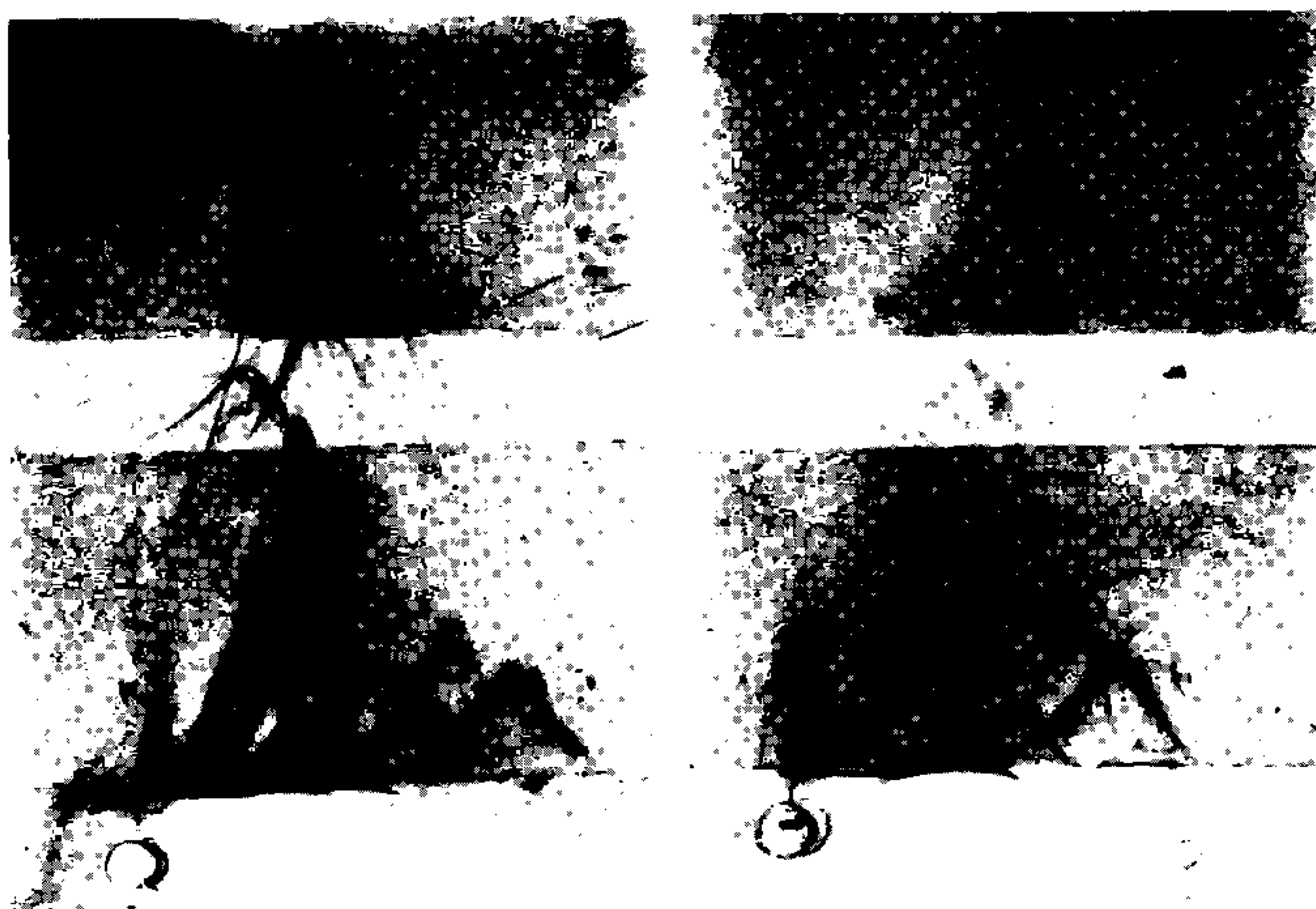


Fig. 4 – Antígeno: 13 μ l do extrato solúvel da cepa Y (18,98 mg ptn/ml).
Anticorpo: gel intermediário com soro anti-cepa Colombiana a 27,7 μ l/cm² e gel superior com soro anti-cepa Y a 38,8 μ l/cm².

Fig. 5 – Antígeno: 13 μ l do extrato solúvel da cepa Y (18,96 mg ptn/ml).
Anticorpo: gel intermediário com soro anti-cepa São Felipe a 38,8 μ l/cm² e gel superior com soro anti-cepa Y a 38,8 μ l/cm².

DISCUSSÃO

No presente trabalho foi possível demonstrar diferenças antigênicas entre formas epimastigotas de diferentes cepas do *T. cruzi*. Estes dados confirmam resultados anteriores obtidos por Nussenzweig, Deane & Kloetzel (1963), Gonzalez-Cappa & Kagan (1969), Ketteridge (1975) e Andrade et al (no prelo).

Apesar de termos estudado cepas semelhantes àquelas estudadas por Andrade et al (no prelo) nossos resultados divergem parcialmente destes autores que, analisando através de imunoeletroforese simples as cepas Peruana, São Felipe e Colombiana, verificaram que estas diferiam quanto ao número de linhas e as suas localizações porém, após a absorção dos antissoros com os antígenos heterólogos, não evidenciaram arcos de precipitação particulares. Entretanto os autores não descartaram a possibilidade de diferenças antigênicas pois o método utilizado na absorção poderia ter determinado a eliminação de alguns componentes de maneira inespecífica.

Embora tendo sido observadas variações entre as cepas estudadas, fica difícil generalizar este fenômeno, desde que não analisamos um número significativo de amostras. Sabe-se também que estas cepas são cultivadas em laboratório por um longo período de tempo favorecendo, provavelmente, variações do parasita. Corroborando estas hipóteses Morel et al (1980) observaram que amostras da cepa Y provenientes de vários laboratórios, apresentavam diferentes perfis de K-DNA. Além disso, Romanha et al (1979) analisando o padrão isoenzimático destas cepas verificaram que a mesma cepa em períodos variados de cultivo pertenciam a zimodemas diferentes.



Fig. 6 - Antígeno: 14 μ l do extrato solúvel da cepa São Felipe (18mg ptn/ml).
Anticorpo: gel intermediário com soro anti-cepas Y a 27,7 μ l/cm² e gel superior com soro anti-cepas São Felipe a 33,3 μ l/cm².

Fig. 7 - Antígeno: 14 μ l do extrato solúvel da cepa São Felipe (18 mg ptn/ml).
Anticorpo: gel intermediário com soro anti-cepas Colombiana a 27,7 μ l/cm² e gel superior com soro anti-São Felipe a 47,2 μ l/cm².

TABELA I

Número de linhas de precipitação resultantes da reação dos antígenos das cepas Y, São Felipe e Colombiana do *T. cruzi* contra seus antissoros homólogos por IEF bidimensional e linhas particulares observadas por IEF bidimensional com gel intermediário contendo soros heterólogos.

Antígeno \ Antissoro		Anti - Y	Anti - São Felipe	Anti-Colombiana
Cepas	Migração			
Y	Anódica	32	5*	8*
	Catódica	3*	3*	3*
S.F.	Anódica	0	24	1**
	Catódica	0	0	0
Col.	Anódica	0	0	22
	Catódica	0	0	0

* Antígenos "particulares" à cepa Y.

** Antígeno "particular" à cepa S.F.

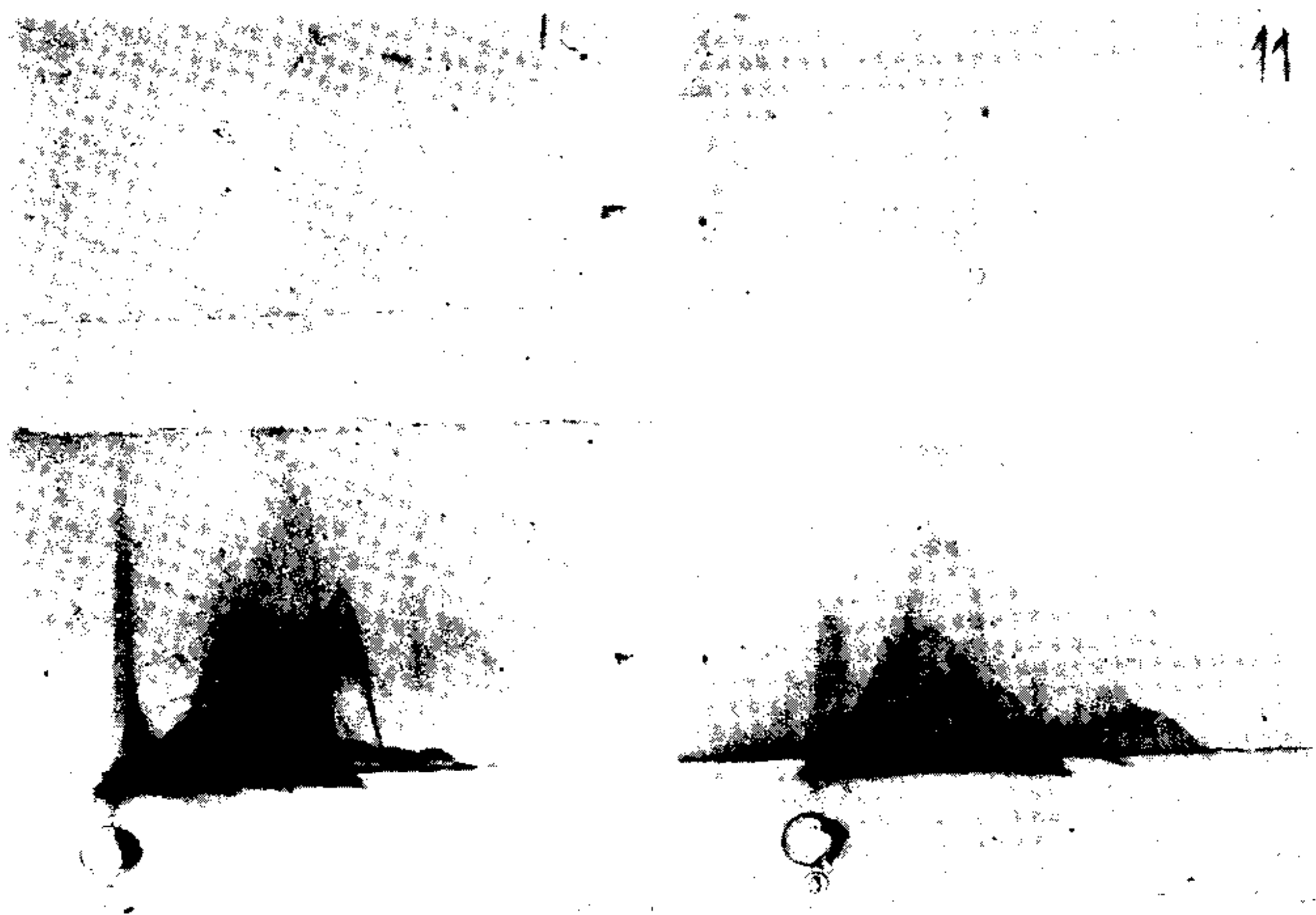


Fig. 8 – Antígeno: 20 μ l do extrato solúvel da cepa Colombiana (12,44 mg ptn/ml).
Anticorpo: gel intermediário com soro anti-cepça Y a 38,8 μ l/cm² e gel superior com soro anti-cepça Colombiana a 3,8 μ l/cm².

Fig. 9 – Antígeno: 20 μ l do extrato solúvel da cepa Colombiana (12,44 mg ptn/ml).
Anticorpo: gel intermediário com soro anti-cepça São Felipe a 44,4 μ l/cm² e gel superior com soro anti-cepça Colombiana a 18,8 μ l/cm².

O isolamento destes antígenos particulares poderia contribuir para uma melhor compreensão das diferenças de comportamentos observadas entre as cepas do *T. cruzi*. Os antissoros produzidos contra estes antígenos talvez permitam o estabelecimento de uma classificação imunológica para os tripanosomas americanos. Finalmente, estas diferenças antigênicas deveriam ser levadas em consideração em programas imunoepidemiológicos e imunoproláticos.

SUMMARY

Soluble extracts of Y, São Felipe and Colombian strains of *Trypanosoma cruzi* were analyzed against their homologous and heterologous antisera by crossed immunoelectrophoresis and crossed immunoelectrophoresis with intermediate gel.

In the homologous system, the results showed 35 precipitin lines for Y strain (32 anodic, 3 cathodic), 24 precipitin lines for São Felipe strain and 22 for Colombian strain. No cathodic antigen was observed for these last two strains which were consequently considered particular to Y strain.

Using crossed immunoelectrophoresis with intermediate gel, 5 antigens particular to Y were shown when reacted against anti-São Felipe strain and 8 when reacted against anti-Colombian strain. São Felipe strain had one particular antigen when reacted against anti-Colombian strain whereas none was observed when reacted against anti-Y strain. Finally Colombian strain did not show any particular antigen in reaction with anti-Y or anti-São Felipe strains.

These results indicate that strains belonging to different types (morphobiological and histopathological characters) also demonstrate important antigenic differences.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Drs. Sonia Andrade e Zigman Brener pelo fornecimento das cepas utilizadas neste trabalho, a Sra. Hermínia Santos e ao Sr. Carlos Marins pelo serviço de datilografia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J. & CAPRON, A., 1979. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identifications of a specific component. *J. Parasitol.* 65 (4) :507-514.
- ANDRADE, S.G., 1974. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano. *Rev. Patol. trop.* 3 (1) :65-121.
- ANDRADE, S.; ANDRADE, V.; ROCHA FILHO, F.D. & BARRAL NETTO, M. Análise antigênica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* (no prelo).
- AXELSEN, N.H.; KRØLL, J.; WEEKE, B., 1973. A manual of quantitative immunoelectrophoresis. *Scand. J. Immunol.*, 2 (suppl. 1) :71-77.
- CAMARGO, E.P., 1964. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6 (3) :93-100.
- CAMARGO, M.E., 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 8 (5) :227-234.
- CLARKE, M.H.G. & FREEMAN, T., 1968. Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins. *Clin. Sci.* 35 (2) :403-413.
- FREDERICI, E.E.; OBELMANN, W.B. & NEVA, F.A., 1964. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C₃H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 13 (2) :272-280.
- GONZALEZ-CAPPA, S.M. & KAGAN, F.G., 1969. Agar-gel immunoelectrophoretic analysis of several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasit.* 25 (1-3) :50-57.
- GRABAR, P. & WILLIAMS, C.A., 1953. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Bioch. Biophys. Acta* 10 (1) :193-194.
- KETTERIDGE, D., 1975. Differentiation of newly isolated strains of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* by agglutination and precipitation reactions. *Acta Tropica*, 32 (3) :173-189.
- LAURELL, C.B., 1966. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Bioch.*, 15 (1) :45-52.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 (1) :265-275.
- MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E.P.; MATTEI, D.M.; ROMANHA, A.J. & SIMPSON, L., 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77 (11) :6810-6814.
- NUSSENZWEIG, V.; DEANE, L.M. & KLOETZEL, J., 1963. Differences in antigenic constitution of strains of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.*, 14 (2) :221-232.

NUSSENZWEIG, V. & GOBLE, F.C., 1966. Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Exp. Parasitol.* 18 (2) :224-230.

OUCHTERLONY, O., 1958. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. In: *Progress in Allergy*, ed. Kallos P., V :1-78, Basel Karger.

PEREIRA DA SILVA, L.H. & NUSSENZWEIG, V., 1953. Sobre uma cepa do *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* 20 (3) :191-207.

ROMANHA, A.J., PEREIRA, A.A.S.; CHIARI, E. & KILGOUR, V., 1979. Izoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B :139-142.