

## REAÇÕES DE AGLUTINAÇÃO E AS RELAÇÕES ANTIGÊNICAS DE CEPAS DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Astolpho Ferraz de SIQUEIRA (1), Rosa Domingues RIBEIRO (2)  
e Luiz Augusto Ruas FERNANDES (1)

### RESUMO

Aplicando a técnica de aglutinação em lâminas, com tripanosomas vivos e recuperados de ratos e camundongos com infecção aguda e soros imunes não absorvidos, produzidos em coelhos, os Autores apresentam os primeiros resultados de seus estudos sobre as relações antigênicas entre cepas do *T. cruzi*. Tais resultados foram semelhantes aos de SIQUEIRA<sup>10</sup> relativos à variabilidade de comportamento dos tripanosomas de uma amostra, durante uma infecção. A despeito desta variabilidade, separaram sorologicamente uma cepa isolada do gambá, de um conjunto de outras cepas isoladas do homem e do cachorro-do-mato.

### INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* se distingue de outras espécies patogênicas de mamíferos por diversos aspectos morfológicos e biológicos. BARRETTO<sup>1</sup>, analisando os critérios usados para a caracterização da "espécie" *cruzi*, conclui que, apesar da variabilidade de cada um deles, quando apreciados em conjunto, permitem a identificação de um tripanosoma de mamífero com o agente da moléstia de Chagas, com razoável margem de segurança. Supondo que tais critérios sejam suficientes para a caracterização do tripanosoma agente da moléstia de Chagas, não resta dúvida de que as nítidas diferenças de morfologia e comportamento destes tripanosomas mostram a necessidade de novos métodos que venham permitir definição mais precisa da espécie, assim como de possíveis subespécies ou raças biológicas.

O estudo das relações imunológicas que tem permitido a distinção de cepas e até de variantes antigênicas entre os tripanosomas Africanos, poderá vir a ser de importância para

caracterizar melhor os vários tripanosomas que de uma ou outra forma são considerados como *T. cruzi*. As primeiras tentativas para a identificação do *T. cruzi* por meio de reações imunológicas, MUNIZ & FREITAS<sup>5</sup>, PACKCHANIAN<sup>7</sup>, SENEKJIE<sup>8</sup>, HAUSCHKA & col.<sup>3</sup>, WALTON & col.<sup>12</sup> etc., não puderam mostrar diferenças antigênicas entre amostras humanas e de outros animais. NUSSENZWEIG & col.<sup>6</sup>, usando a reação de aglutinação com soro imune previamente absorvido e reações de precipitação com antígenos de formas cultivadas, puderam distinguir uma fração antigênica comum de grupo e uma fração específica que permitiu a separação de tipos imunológicos diversos em várias amostras do *T. cruzi* de origem humana e animal.

A técnica de aglutinação em lâmina de tripanosomas coletados de animais infetados, já usada por vários investigadores do passado, LAVERAN & MESNIL<sup>4</sup> e outros, modificada por SOLTYS<sup>11</sup> tem sido muito empregada para estudar as relações antigênicas entre os

Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

- (1) Laboratório de Parasitologia, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- (2) Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto. São Paulo, Brasil

tripanosomas Africanos. SIQUEIRA<sup>10</sup>, estudou com esta técnica as relações antigênicas de tripanosomas coletados diariamente de camundongos infetados com a cepa Y do *T. cruzi* e pôde mostrar diferenças de comportamento dos tripanosomas colhidos em dias sucessivos, sendo eles aglutináveis pelo soro em determinados dias e não aglutináveis em outros. Este comportamento do *T. cruzi* poderia dificultar o uso da reação de aglutinação assim conduzida para tentar surpreender diferenças entre amostras do tripanosoma referido. Entretanto, comparando resultados de reações simultâneas, pudemos estudar com esta técnica as relações antigênicas entre cepas de *T. cruzi* isoladas do homem e de outros animais. Neste trabalho referimos os primeiros resultados.

#### MATERIAL E MÉTODOS

*Cepas de tripanosomas* — Foram usadas cinco amostras de tripanosomas:

1) *Cepa Y* — Isolada por SILVA & NUSSENZWEIG<sup>9</sup> de um paciente em fase aguda de moléstia de Chagas por meio do xenodiagnóstico.

2) *Cepa G 1130* — Isolada de um gambá, *Didelphis azarae*, capturado na zona rural do Município de Ribeirão Preto, S.P., por meio de xenodiagnóstico.

3) *Cepa RC 1429* — Isolada de um cachorro-do-mato, *Cerdocyon thous azarae*, capturado em Cássia dos Coqueiros, S.P., por meio de xenodiagnóstico e hemocultura.

4) *Cepa Bolívia* — Isolada de exemplares de *Triatoma infestans* capturados pelo Dr. Henrique Gusman na localidade de Vitichi na Bolívia, por inoculação em camundongos.

5) *Cepa Índio* — Isolada de um caso crônico de moléstia de Chagas de um índio da tribo Xavantes da Serra do Roncador, M.T., por meio da hemocultura.

*Manutenção das cepas* — As cepas foram mantidas em ratos ou camundongos por inoculação intraperitoneal de sangue obtido dos animais doadores nas fases de maior parasitemia. O intervalo entre os repiques foi o seguinte: As cepas Y e RC foram repicadas cada 3,5 dias em ratos e cada 7 dias em ca-

mundongos; a cepa Índio foi mantida em camundongos e repicada cada 7 dias; a cepa Bolívia, mantida em camundongos com intervalos de 15 dias e finalmente a cepa G 1130 também com intervalos de 15 dias em ratos.

*Reações de aglutinação* — Preparação dos soros aglutinantes — Os soros foram preparados em coelhos com peso médio de 2.500 g dois para cada cepa, por inoculação endovenosa de sangue total heparinizado, contendo cerca de  $4 \times 10^7$  tripanosomas; o número de tripanosomas foi avaliado pelo método proposto por BRENER<sup>2</sup>. Os soros foram colhidos antes da inoculação e cada 7 dias após a mesma. No caso das cepas Y, RC e G 1130 foram usadas apenas a 2.<sup>a</sup> e 3.<sup>a</sup> amostras. Para a cepa Bolívia foram experimentados todos os soros colhidos até 42 dias após a inoculação. A colheita do sangue dos coelhos foi feita por punção cardíaca ou por sangramento da veia marginal da orelha. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado a 2.000 r.p.m. por 15 minutos e o soro, depois de separado foi distribuído em ampolas de 1 ml e conservado em congelador.

*Preparação dos antígenos* — Os ratos ou camundongos previamente infetados eram sangrados no coração depois de anestesia e abertura do tórax. Ao sangue coagulado, juntávamos cerca de 5 gotas de solução isotônica de ClNa contendo 1% de glicose, centrifugávamos a mistura a 800 r.p.m. 10 minutos e colhíamos o sobrenadante livre de plaquetas, contendo os tripanosomas e raras hemácias. O antígeno assim preparado continha tripanosomas que se mantinham com boa vitalidade por muitas horas, mas apesar disto eram usados logo após a preparação. Às vezes, foi necessário concentrar os parasitas por centrifugação e outras vezes, quando o número deles era muito pequeno por causa do baixo nível de parasitemia do animal doador, não foram aproveitadas as amostras. Os antígenos preparados com tripanosomas recuperados de sangue heparinizado, conservados em nitrogênio líquido ou usados logo após a preparação, não se prestaram a uma boa observação dos resultados.

No dia da reação, os soros imunes eram descongelados e diluídos em solução fisiológica a 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 e 1:160. Em lâminas apropriadas, com anéis de cerâmica, eram distribuídos 0,01 ml das diluições dos soros

e 0,01 ml das suspensões dos antígenos. Depois de uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente, as lâminas eram cobertas com lamínulas e lidas ao microscópio com 100 ou 200 aumentos. Considerávamos positivas as reações quando encontrávamos agrupamentos de 3 ou mais tripanosomas ao examinar praticamente todo o campo contido dentro dos anéis e os títulos eram referidos como as recíprocas das diluições dos soros. Quando não eram observados os agrupamentos referidos, mesmo com o soro diluído a 1:10, os resultados eram considerados negativos.

#### RESULTADOS

O Quadro I resume os resultados das reações entre os tripanosomas das várias cepas estudadas e os soros imunes correspondentes. Não aparecem no quadro os resultados obtidos com o soro anti-Bolívia ou com o antígeno Bolívia porque o soro não aglutinou nenhum dos antígenos e este antígeno não foi aglutinado por nenhum dos soros imunes.

Observando os resultados das reações entre os antígenos e os soros homólogos, verifica-se uma variação de títulos durante a evolução da infecção, sendo negativos em determinados dias. Com os tripanosomas das cepas Y e RC os resultados foram negativos no 6.º dia da infecção, com a cepa Índio o título foi baixo no 6.º dia e negativo no 9.º e os tripanosomas da cepa G 1130 não foram aglutinados no 19.º dia.

As reações entre os antígenos e os soros heterólogos mostram que os soros anti Y e anti RC aglutinaram os antígenos Y, RC e Índio com títulos semelhantes e não aglutinaram os tripanosomas da cepa G 1130, mesmo nos dias em que estes foram aglutinados pelo soro anti G 1130. O soro anti G 1130 não aglutinou os antígenos Y, RC e Índio nos dias em que foram aglutinados pelos soros anti Y e anti RC.

Os antígenos das cepas Y, RC e Índio só foram usados quando colhidos nos primeiros dias da infecção porque os níveis parasitêmicos dos animais usados caíam rapidamente e o número de tripanosomas ficava insuficiente para a realização das reações. Nos animais infetados com a cepa G 1130 a parasitemia aumentava a partir do 12.º dia e só decrescia após o 22.º dia da infecção.

#### DISCUSSÃO

A variação dos títulos das reações entre os antígenos e os seus soros homólogos foi observada por SIQUEIRA<sup>10</sup> quando estudou as relações antigênicas de tripanosomas da cepa Y do *T. cruzi*, colhidos diariamente de camundongos infetados. Os seus resultados mostraram que os tripanosomas não foram aglutinados no 5.º dia da infecção e novamente no 9.º dia. Isto mostra uma repetição do fenômeno durante a evolução da infecção, fato que também pudemos observar em alguns animais nos quais colhemos tripanosomas em número razoável por tempo mais prolongado e cujos resultados não foram apresentados. A explicação do porque da não aglutinabilidade dos tripanosomas em certas fases da infecção é ainda assunto de especulação. Experiências que estamos realizando, usando tripanosomas de fases diferentes para reações diretas de imunofluorescência, têm mostrado que só em determinadas fases da infecção os tripanosomas reagem com o soro antiglobulina fluorescente, provavelmente por terem a sua superfície impregnada de anticorpo já formado. É possível que esta reação de superfície seja responsável por modificações dos tripanosomas que se refletem na sua aglutinabilidade, isto é, seriam bloqueados pelo anticorpo circulante e não reagiriam simultaneamente com o soro aglutinante. Novas observações estão em andamento para verificar se as fases em que os tripanosomas reagem diretamente com o soro fluorescente correspondem às fases em que não são aglutináveis. Caso sejam comprovadas estas modificações cíclicas, e o fato de que nas fases em que há aglutinação alguns tripanosomas não são aglutináveis, sugerimos a possibilidade de variação antigênica nas infecções pelo *T. cruzi*, a exemplo do que ocorre com os tripanosomas Africanos. A demonstração da ligação do anticorpo à superfície dos tripanosomas e a possibilidade de repetição do fenômeno em várias fases da infecção, indicariam o uso do método da imunofluorescência direta para a demonstração da variação antigênica nas infecções pelo *T. cruzi*.

As reações de aglutinação com tripanosomas vivos e colhidos de animais infetados permitiram mostrar diferenças entre o conjunto das cepas Y, RC, Índio e cepa G 1130, todas consideradas como *T. cruzi*. Assim, os

QUADRO I

Recíprocas dos títulos dos vários soros com várias cepas de tripanosomas

| Soros       | Antígenos | Dias de coleta dos antígenos após a inoculação |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
|-------------|-----------|------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
|             |           | 3,0                                            | 3,5 | 4,0 | 4,5 | 5,0 | 5,5 | 6,0 | 7,0 | 8,0 | 9,0 | 13,0 | 14,0 | 15,0 | 16,0 | 17,0 | 18,0 | 19,0 | 20,0 | 21,0 | 22,0 |     |
| Anti Y      | Y         | 160                                            | 160 | 160 | 40  | 40  | 40  | 0   | 40  | —   | —   | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —   |
| Anti RC     | Y         | 160                                            | 160 | 0   | —   | 0   | 0   | —   | —   | —   | —   | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —   |
| Anti G 1130 | Y         | 0                                              | 0   | 0   | —   | —   | 0   | —   | —   | —   | —   | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —   |
| Anti RC     | RC        | 160                                            | 160 | 160 | —   | 40  | 0   | —   | —   | —   | —   | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —   |
| Anti Y      | RC        | 160                                            | 160 | 0   | 40  | 40  | 20  | —   | —   | —   | —   | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —   |
| Anti G 1130 | RC        | 0                                              | 0   | 0   | 0   | —   | 0   | —   | —   | —   | —   | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —   |
| Anti Y      | Índio     | —                                              | —   | —   | —   | —   | 20  | 160 | 160 | 40  | —   | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —   |
| Anti RC     | Índio     | —                                              | —   | —   | —   | —   | —   | 160 | —   | 0   | —   | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —   |
| Anti G 1130 | G 1130    | —                                              | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | 160  | —    | 160  | 160  | 160  | 160  | 0    | 160  | 160  | 160  | 160 |
| Anti Y      | G 1130    | —                                              | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   |
| Anti RC     | G 1130    | —                                              | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —    | 0    | 0    | —    | —    | 0    | 0    | 0    | 0    | —    | —   |

antígenos Y, RC e Índio foram aglutinados pelos soros anti Y e anti RC mas não pelo soro anti G 1130 e o antígeno G 1130 não foi aglutinado pelos soros anti Y e anti RC. A variação da aglutinabilidade dos tripanosomas com os soros homólogos não invalida os resultados porque, nos mesmos dias, os mesmos antígenos foram ou não aglutinados.

A possibilidade de distinguir cepas do *T. cruzi* por reações sorológicas já foi demonstrada por NUSSENZWEIG & col.<sup>6</sup> usando soros previamente absorvidos e antígenos de formas cultivadas. A apresentação dos nossos resultados pretente apenas referir o uso de uma técnica de grande utilidade para estudar os aspectos imunológicos dos tripanosomas semelhantes ao *T. cruzi*. Depois de uma caracterização das cepas pelos métodos indicados por BARRETTO<sup>1</sup>, tentaremos relacionar os aspectos morfológicos e biológicos comuns com as relações antigênicas encontradas.

Como os tripanosomas da cepa Bolívia não estimularam a formação de aglutininas nos coelhos usados, estamos tentando imunizar outros coelhos e outros animais. É interessante assinalar que estes soros reagem nas reações de imunofluorescência, fato que podemos verificar usando um soro antiglobulina de coelho, alguns dos soros anti Bolívia e tripanosomas normalmente usados nas nossas reações de imunofluorescência. O comportamento do antígeno Bolívia também está sendo objeto de nossos estudos.

#### SUMMARY

##### *Agglutination tests and antigenic relationships of Trypanosoma cruzi strains*

The agglutination tests on slides with living tripanosomes recovered from acutely infected white rats and mice, and rabbit non absorbed immune sera were carried out with a view of studying the antigenic relationships of different *T. cruzi* strains.

The first results obtained were similar to those reported by SIQUEIRA<sup>10</sup> who showed the variability of the behaviour of a given strain during the course of an infection. In spite of that, a strain isolated from an opossum, *Didelphis azarae*, was found immunologically distinct from other strains recovered from man and a wild dog, *Cerdocyon thous azarae*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARRETTO, M. P. — Tripanosomas semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da Doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:305-315, 1965.
2. BRENER, Z. — Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. 79 p.p. mimeografadas, Belo Horizonte, 1961.
3. HAUSCHKA, T. S.; GOODWIN, M. E.; PALMQUIST, J. & BROWN, C. — 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.
4. LAVERAN, A. & MESNIL, F. — Sur l'agglutination des trypanosomes du rat par divers serums. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 52:939-942, 1900.
5. MUNIZ, J. & FREITAS, G. — Contribuição para o diagnóstico da Doença de Chagas pelas reações de imunidade. I — Estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação do complemento. *Rev. Brasil. Biol.* 4:421-438, 1944.
6. NUSSENZWEIG, V. N.; DEANE, L. M. & KLOETZEL, J. — Differences in antigenic constitution of strains of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 14:221-232, 1963.
7. PACKCHANIAN, A. — Experimental production of agglutination for *Trypanosoma cruzi*. *Pub. Health. Rep.* 55:2116-2124, 1940.
8. SENEKJIE, H. A. — Immunologic studies in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. 2. Slide agglutination and intradermal tests. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 52:56-59, 1943.
9. SILVA, L. H. P. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* 20:191-208, 1953.
10. SIQUEIRA, A. F. — Agglutination patterns of *Trypanosoma cruzi* from mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 4:464, 1968.
11. SOLTYS, M. A. — Immunity in tripanosomiasis. II — Agglutination reaction with African tripanosomes. *Parasitology* 47:390, 1957.
12. WALTON, B. C.; BAUMAN, P. M.; DIAMOND, L. S. & HERMAN, C. M. — The isolation and identification of *T. cruzi* from Raccoons in Maryland. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.* 7:603-610, 1958.