

POSSIBILIDADE DE INCORPORAÇÃO DE PROTEÍNAS DO HOSPEDEIRO PELO TRYPANOSOMA CRUZI

(Investigação Experimental)

Sonia G. ANDRADE (1)

RESUMO

Como tentativa de investigar o mecanismo de evasão do *Trypanosoma cruzi* às defesas do hospedeiro procurou-se, verificar se esse parasito é capaz de incorporar proteínas do hospedeiro. Para isto o *T. cruzi* de duas diferentes cepas (Peruana e Colombiana) foi adaptado ao cobaio. Em seguida procurou-se investigar, por imunofluorescência, usando-se como antígeno as formas sangüícolas isoladas do cobaio e como anticorpo o soro de coelho sensibilizado a proteínas do cobaio e, revelada a reação, por meio de gamaglobulina fluoresceïnada anti-coelho, se havia fixação do anticorpo às formas tripomastigotas. O resultado desta pesquisa foi negativo. Em outra etapa procurou-se investigar se camundongos sensibilizados a proteínas do cobaio se tornavam mais resistentes à infecção por Tripomastigotas isolados do cobaio. Também nesse experimento o resultado foi considerado negativo. Em ambos os experimentos foram usados grupos controles e a sensibilização dos animais (camundongo e coelho) foi confirmada pelo método da placa de Ouchterlony.

INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* pode determinar no hospedeiro vertebrado infecção crônica de longa duração, com escassos parasitos no sangue periférico, muitas vezes num aparente equilíbrio hospedeiro-parasito.

Nas doenças parasitárias, a manutenção de uma infecção de longa duração resulta do "escape" do parasito aos processos imunológicos do hospedeiro⁸, mecanismo este que não está esclarecido em relação ao *Trypanosoma cruzi*. Uma das possibilidades seria a da incorporação pelos parasitos, das proteínas do hospedeiro, tornando-se assim, reconhecidos pelo mesmo, o que já tem sido comprovado em relação a helmintos e bactérias^{7,12}, e particularmente, com o *S. mansoni*^{6,9,10,13}. Nosso trabalho visa investigar se o *Trypanosoma cruzi* tem

a capacidade de incorporar proteínas do hospedeiro e se este seria o seu mecanismo de "escape" às defesas do mesmo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram feitas duas experiências sendo a primeira, a investigação por meio da técnica de COONS¹¹ com anticorpos fluorescentes, da presença na superfície das formas tripomastigotas isoladas do cobaio, de antígenos deste hospedeiro; o segundo experimento constou da verificação da resistência de camundongos sensibilizados a proteínas de cobaio à infecção com formas tripomastigotas isoladas deste hospedeiro.

Trabalho realizado com o Auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico — CNPq — através dos Auxílios: TC 16.480 e SIP-08/073.

(1) Professor Assistente — Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

1.º Experimento. Pesquisa de antígeno de cobaio pelo método de COONS¹¹ com anticorpos fluorescentes na superfície de tripomastigotas isolados do cobaio.

1) Obtenção dos tripomastigotas de cobaio — em sangue de cobaios infectados com a cepa Peruana^{4,17} e a Colombiana^{4,14}, após passagens sucessivas, sacrificados no 15.º, 20.º e 30.º dias de infecção.

Os inóculos para infecção dos cobaios foram obtidos de camundongos sendo feitas 32 passagens em cobaio com a cepa Peruana e 3 passagens com a cepa Colombiana. Os inóculos nas diversas passagens variaram entre 300.000 e 500.000 tripomastigotas avaliados pelo método de PIZZI & PRAGER¹⁸.

As formas tripomastigotas do *T. cruzi* foram isoladas do sangue periférico de cobaios pelo método de VOLLER¹⁹ colocadas em lâminas marcadas, secas à temperatura ambiente e completada a secagem no vácuo. Estas lâminas foram conservadas a -20º e fixadas por acetona no momento de usar.

2) Obtenção de soro de coelho anti-cobaio — pela sensibilização de coelho adulto jovem com liofilizado de órgãos de cobaio de mistura com adjuvante de Freund completo, na proporção de 10 mg de antígeno para 2 ml de adjuvante, em injeções intramusculares semanais, durante 5 semanas; a partir da 5.ª dose as injeções passaram a ser mensais, em número de 5. Após as primeiras cinco doses, foi testada a sensibilização de coelho pela difusão em gel (método da placa de Ouchterlony), do soro do coelho contra o antígeno de cobaio usado para sensibilização.

3) Obtenção do antígeno de cobaio utilizado para a sensibilização do coelho — fragmentos de fígado e baço de cobaio lavados com salina tamponada foram triturados em liquidificador com salina a 1/1.000. O triturado foi congelado em deep-freeze a -20ºC e descongelado por trituração em gral, em operação repetida 4 vezes; após centrifugação a 20.000 r.p.m., durante 1 hora a 4ºC, o sobrenadante foi dializado contra água destilada por 24 horas a 4ºC, em tubo de celofane, sendo a seguir liofilizado.

4) Teste de imunofluorescência (Tabela I) — empregando-se como antígeno as formas

tripomastigotas isoladas do cobaio, foram testados três soros a saber: a) soro de coelho sensibilizado com antígeno de cobaio; b) soro de coelho controle normal; c) soro de coelho com infecção crônica pelo *T. cruzi*.

TABELA I

Pesquisa de antígeno do hospedeiro em tripomastigotas isoladas em cobaio: imunofluorescência indireta

Antígeno	Soros testados (*)
Tripomastigotas	1. Coelho anti-cobaio (TESTE)
do	2. Coelho Normal (CONTROLE)
Cobaio	3. Coelho Chagásico (CONTROLE)

(*) Em todos os casos o teste de imunofluorescência foi realizado com gamaglobulina anti-coelho fluoresceïnada.

Os soros foram diluídos na proporção de 1:20. As lâminas com o antígeno, após passagem rápida em acetona anidra eram tratadas pelo soro a ser testado, incubadas a 37ºC por 30 minutos e a seguir eram tratadas por uma gamaglobulina fluoresceïnada anti-coelho (Hyland) na diluição de 1:80.

A leitura da reação foi feita em Microscópio Zeiss Standard 18 para imunofluorescência usando como filtros um excitador FIIC e uma barreira BG 53 e como fonte, lâmpada Halogen de 100 Wats e 12 volts.

2.º Experimento — Pesquisa do grau de resistência de camundongos previamente sensibilizados com antígeno de cobaio à inoculação por formas tripomastigotas do *T. cruzi* isoladas de cobaio:

1) Grupos Experimentais — 60 camundongos brancos pesando 10 a 12 g foram subdivididos em 3 grupos experimentais (Tabela II).

Grupo I — Camundongos sensibilizados com antígeno de cobaio e inoculados com *T. cruzi* (cepa Peruana), isolada do cobaio.

Grupo II — Camundongos sensibilizados com antígeno de rato e inoculados com cepa Peruana de *T. cruzi*, isoladas de cobaio, na mesma dose e o mesmo inóculo do grupo anterior, (controles de sensibilização).

T A B E L A I I
Resistência de camundongos sensibilizados

Grupos experimentais	Nº de animais	Sensibilização Antígeno: 0,5 mg + Adj. Freund: 0,2 ml	Nº de doses	Intervalos entre as doses (semanas)
I — Teste	20	Antígeno Cobaio	4	1ª : 2ª = 2 2ª : 3ª = 4 3ª : 4ª = 5
II — Controle de Sensibilização	20	Antígeno Rato	4	
III — Controles de infecção	20	Não Sensibilizado	—	—

Inoculação pelo *T. cruzi*: Tripomastigotas sangüícolas obtidos de COBAIO após lavagem.
Inóculo: 27.320 / 0,2 ml
Cepa: Peruana

Grupo III — Camundongos não sensibilizados, inoculados com o mesmo inóculo dos grupos I e II, (controles da infecção).

Sensibilização dos camundongos — o antígeno de cobaio empregado para sensibilizar os camundongos foi o mesmo já descrito. O antígeno de rato foi preparado pelo mesmo método.

Em ambos os grupos de sensibilização (I e II) os antígenos foram aplicados na dose de 0,5 mg de antígeno liofilizado para 0,2 ml de adjuvante de Freund completo, em 3 doses sucessivas com intervalos de 2 semanas entre a primeira e a segunda dose, 4 semanas entre a segunda e a terceira e 5 semanas entre a terceira e a quarta dose. Para testar a sensibilização dos camundongos após a última dose, os soros dos mesmos foram submetidos a difusão em gel pelo método da placa de Ouchterlony. Tanto os soros de animais sensibilizados com antígeno de cobaio como de rato foram testados contra os antígenos de cobaio e de rato.

Inoculação com *T. cruzi* — a cepa utilizada neste experimento foi a cepa Peruana a qual havia sido adaptada ao cobaio após 32 passagens sucessivas.

O inóculo era constituído por formas tripomastigotas isoladas do sangue heparinizado do cobaio por lavagem e centrifugação em solução tampão fosfato pH 7,2, de acordo com técnica de VOLLER¹⁹. As formas tripomastigotas obtidas eram ressuspensas em salina tampoadada e, após o cálculo do número de tripomastigotas em 0,1 ml eram inoculadas nos camundongos dos três grupos experimentais por via intraperitoneal. O inóculo obtido foi de 27.320 tripomastigotas em 0,2 ml da suspensão.

Para a avaliação do resultado da infecção foi tomado como parâmetro o nível de parasitemia dos animais nos diversos grupos experimentais, pela contagem diária do número de tripomastigotas no sangue periférico em gota padronizada, entre lâmina e lamínula, sendo contados em 50 campos microscópicos X 400.

RESULTADOS

1.º Experimento — o tratamento das formas tripomastigotas provenientes de cobaio com soro de coelho dos 3 grupos experimentais e uma gamaglobulina fluoresceïnada anti-coelho demonstrou os seguintes resultados:

1) Formas tripomastigotas isoladas do cobaio e tratadas com soro de coelho anticobaio: resultado negativo.

2) Formas tripomastigotas isoladas do cobaio e tratadas com soro de coelho normal: resultado negativo.

3) Formas tripomastigotas isoladas do cobaio e tratadas por soro de coelho com forma crônica da doença de Chagas: presença de fluorescência positiva na superfície das formas tripomastigotas (reação específica).

O resultado da sensibilização do coelho com antígeno de cobaio, pela técnica da placa de Ouchterlony, indicou presença de anticorpos anti-cobaio no soro dos coelhos sensibilizados.

2.º Experimento — o estudo dos níveis de parasitemia dos 3 grupos experimentais após a inoculação com tripomastigotas isolados de cobaio (Fig. 1) mostrou na fase inicial da in-

GRUPOS DE SENSIBILIZAÇÃO

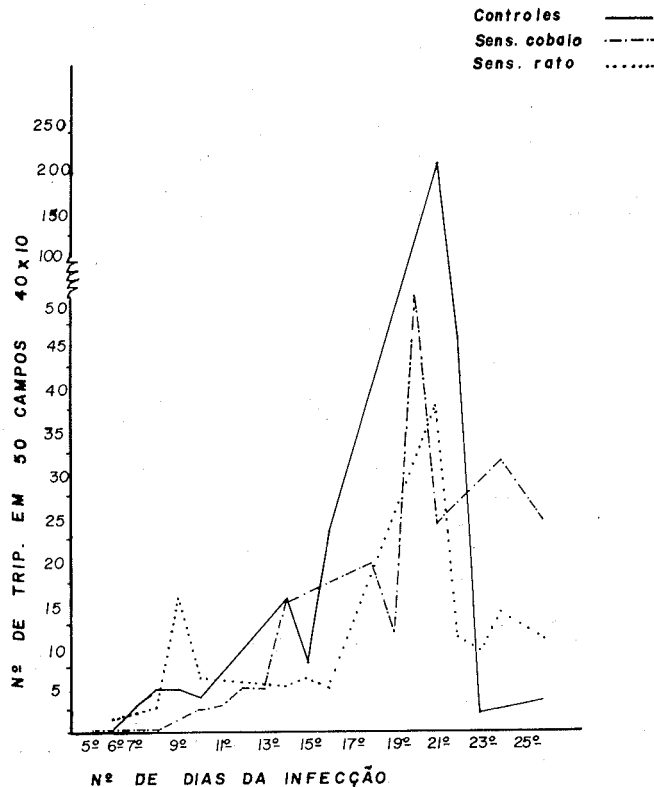


Fig. 1 — Tanto os animais que sofreram sensibilização a proteínas de cobaio como os controles sensibilizados a proteínas de ratos apresentaram níveis parasitêmicos menos elevados do que os animais não sensibilizados previamente e infectados com o mesmo inóculo (cepa Peruana)

fecção, níveis comparáveis nos três grupos experimentais; a partir do 15.º dia observou-se nítida elevação parasitêmica nos três grupos, porém os níveis atingidos foram muito menos elevados nos animais previamente sensibilizados, tanto com antígeno de cobaio como de rato, do que nos controles sensibilizados.

O resultado da difusão em gel (placa de Ouchterlony), para comprovação da sensibilização dos camundongos em relação aos antígenos de cobaio e rato foi o seguinte: 1) Foram evidenciados anticorpos específicos anti-cobaio em todos os animais sensibilizados com antígeno de cobaio; 2) Foram evidenciados anticorpos específicos anti-rato nos animais sensibilizados com antígeno de rato; 3) Anticorpos inespecíficos aparecem nos soros de animais dos três grupos.

COMENTÁRIOS

A pesquisa de antígeno do hospedeiro vertebrado, em formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* resultou negativa quando se empregou o método da imunofluorescência e um anti-soro específico. Diferentes cepas podem diferir quanto à resposta em relação a um soro imune¹⁵ ou quanto à capacidade de fixação de anticorpos fluorescentes específicos¹⁶. Resolvemos por isto testar 2 cepas diferentes, a Peruana e a Colombiana. Em ambas obtivemos resultados consistentemente negativos em testes repetidos.

Quando se testou a resistência, em camundongos sensibilizados a proteínas do hospedeiro (cobaio), do qual se isolaram os tripomastigotas, ou a proteínas de ratos obteve-se um

efeito inespecífico atribuível a uma estimulação por proteína estranha¹ e a um efeito do próprio adjuvante de Freund como foi demonstrado em trabalho anterior³. Deste modo, o fato de, na fase avançada da infecção os níveis parasitêmicos dos animais previamente sensibilizados terem sido menores dos que os evidenciados nos controles não sensibilizados foi considerado como uma resposta inespecífica. Caso as formas tripomastigotas isoladas do cobaio tivessem incorporado as proteínas desse hospedeiro seria de se esperar uma destruição inicial das formas inoculadas do animal imune, sem se desenvolver pico parasitêmico.

O estado de aparente equilíbrio hospedeiro/parasito que se observa na fase crônica da infecção chagásica não parece, pois, depender de um mecanismo de incorporação de proteínas do hospedeiro.

Segundo DAMIAN¹² a capacidade de imitar ou de incorporar antígeno do hospedeiro, qualquer que seja o mecanismo envolvido, teria valor adaptativo, permitindo maior compatibilidade do parasito com o hospedeiro. Na doença de Chagas, entretanto, o quadro anátomo-patológico da infecção crônica prolongada² mostrou que os animais nesta fase da infecção desenvolvem um quadro inflamatório com lesões disseminadas. O tratamento específico nesta fase⁵, diminuindo a carga parasitária faz regressar as lesões teciduais. Estes fatos demonstram que o parasito, embora com sua capacidade de multiplicação diminuída, mantém o estado de sensibilização e excita os processos imunológicos responsáveis pelas extensas lesões observadas.

SUMMARY

On the possibility of incorporation of host antigens by blood forms of *Trypanosoma cruzi*

This investigation was carried out by two methods: 1) by looking for the presence of host antigens on the surface of trypomastigote forms by immunofluorescence. In this experiment we used two different strains of *T. cruzi*: Peruvian and Colombian strains. Trypomastigote forms were isolated from guinea-pig blood by centrifugation and washed in pH 7.2 phosphate buffered solution, dry-fixed and treated with an anti-guinea pig serum produc-

ed in rabbits and revealed by a fluoresceinate anti-rabbit gamma globulin. Results were negative; 2) mice sensitized with guinea-pig antigens were infected with *T. cruzi* trypomastigotes obtained from guinea-pig. No evidence of resistance was observed in sensitized mice when compared with controls.

In both mice and rabbits, sensibilization was tested by the Ouchterlony technique.

These experiments failed to demonstrate the presence of host antigens incorporated on the surface of the blood forms of *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, S. G.; SILVA, A. A. & ANDRADE, Z. A. — Bloqueio e estimulação do S.R.E. na doença de Chagas (Estudo experimental em camundongos). *Gaz. Med. Bahia* 67: 19-30, 1967.
2. 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.
3. ANDRADE, S. G. & CARVALHO, M. L. — Efeito da excitação do sistema retículo-endotelial pelo adjuvante de Freund na doença de Chagas experimental. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11: 229-235, 1969.
4. ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L. & FIGUEIRA, R. M. — Caracterização morfo-biológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gaz. Med. Bahia* 70: 32-42, 1970.
5. ANDRADE, S. G. & ANDRADE, Z. A. — Aspectos anátomo-patológicos e resposta terapêutica na infecção chagásica crônica experimental. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 18: 268-275, 1976.
6. CAPRON, A.; BIGUET, J.; ROSE, F. & VERNES, A. — Les antigènes de *Schistosoma mansoni*. II — Etude immunoelectrophorétique comparée de divers stades larvaires et des adultes des deux sexes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite de la cercaire et de l'adulte de *S. mansoni*. *Ann. Inst. Pasteur* 109: 798-810, 1965.
7. CAPRON, A.; BIGUET, J.; VERNES, A. & AFCHAIN, D. — Structure antigenic des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Path. Biol.* 16: 121-138, 1968.
8. Ciba Foundation Symposium — 25 (New Series) Parasites in the immunized host: mechanism of survival. Amsterdam, Elsevier Publ., p.p. 263-272, 1974.
9. CLEGG, J. A.; SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. — Host antigen associate with schistosomes. Observations on their attachment and their nature. *Parasitology* 61: 87-94, 1970.

10. CLEGG, J. A.; SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. — Acquisition of human antigens by *Schistosoma mansoni* during cultivation in vitro. *Nature (London)* 232: 653-654, 1971.
11. COONS, A. H.; LEDUC, E. H. & CONNOLY, J. M. — Studies on antibody production. I — A method for histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of hyperimmune rabbit. *J. Exp. Med.* 102: 49-60, 1955.
12. DAMIAN, R. T. — Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am. Naturalist* 98: 129-149, 1964.
13. DAMIAN, R. T. — Common antigens between adult *Schistosoma mansoni*, and the laboratory mouse. *J. Parasitol.* 53: 61-64, 1967.
14. FEDERICI, E. E.; ABELMANN, W. B. & NEVA, F. A. — Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 13: 272-280, 1964.
15. KRETTLI, A. U. & BRENER, Z. — Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunology* 116: 755-760, 1976.
16. KLOETZEL, J. & DEANE, M. P. — Immunoglobulins on the surface of trypomastigotes. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 18: 139, 1976.
17. NUSSENZWEIG, V. & GOBLE, F. — Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma (Schyzotrypanum) cruzi*. *Exptl. Parasitol.* 18: 224-230, 1960.
18. PIZZI, T. & PRAGER, R. — Estabilizacion de la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi*, por passage seriado en ratones de constitucion genetica uniforme; analisis quantitativo del curso de la infeccion. *Biologica* 16-17: 3-12, 1952.
19. VOLLER, A. — Immunofluorescent observations on *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg.* 57: 232, 1963.

Recebido para publicação em 14/1/1977.