

HIPERSENSIBILIDADE TARDIA A ANTÍGENO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*. I - ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS

Antonio R.L. Teixeira

Reações de hipersensibilidade cutânea tardia em coelhos infectados com Trypanosoma cruzi homólogo ou heterólogo, foram obtidas pela injeção de 50µg de proteína do antígeno T12E, derivado de um clone do parasito. A especificidade do teste foi indicada pela ausência de reação em coelhos controles normais que receberam a mesma quantidade de antígeno na pele. A injeção intradérmica do antígeno, em cinco ocasiões, não induziu reação cutânea positiva ou soroconversão dos exames de hemaglutinação e aglutinação, em coelhos controles normais. Por outro lado, coelhos chagásicos submetidos a série de cinco testes cutâneos, com intervalos de uma semana, não exibiram alteração da intensidade das reações de hipersensibilidade ou dos perfis dos títulos de anticorpos séricos. Os registros eletrocardiográficos também não foram alterados pelos testes cutâneos em coelhos normais e chagásicos. A inocuidade do antígeno T12E foi confirmada em experimentos realizados em 36 coelhos chagásicos e 19 coelhos controles normais. Esse estudo mostra que o teste cutâneo com o antígeno T12E pode ser útil no diagnóstico, além de servir como indicador de morbidade da doença.

Palavras-chaves: Trypanosoma cruzi. Hipersensibilidade cutânea tardia. Antígeno T12E. Doença de Chagas.

A reação de hipersensibilidade tardia na doença de Chagas experimental^{10 11 15 19} e humana^{2 20 21} tem sido estudada esporadicamente, visando a caracterização da imunidade celular específica. O alvo dessas investigações era as reações tissulares, formadas em seguida à injeção do parasito viável^{10 15} ou após a injeção de extratos do *Trypanosoma cruzi* morto^{11 20}. Em duas ocasiões^{19 20}, porém, foram obtidos resultados sugestivos de que o teste cutâneo de hipersensibilidade tardia contra extrato antigênico de formas de cultivo do parasito poderia ter significado semelhante àquele da reação contra o derivado protéico purificado (PPD) em pacientes com tuberculose.

A caracterização preliminar da fração do parasito que contém os antígenos do *T. cruzi* associados com hipersensibilidade cutânea tardia, mostrou que essas proteínas estão presentes em diversos compartimentos

subcelulares¹⁸. Entretanto, foi observado que as frações microsomal e ribosomal, sedimentadas a 30.000g x 35min e a 100.000g x 90min, produziam fortes reações cutâneas de hipersensibilidade tardia no sítio de inoculação de diminuta quantidade do antígeno. A imunidade celular foi, então, observada em experimentos de transferência passiva, inibição da migração de células mononucleares e transformação blástica de linfócitos na presença do antígeno específico¹⁹.

No sentido de dar continuidade a essa linha de pesquisa foram iniciados estudos com diversos estoques e clone de *T. cruzi* e, também, com outro flagelado não patogênico. Nesse trabalho, apresentamos resultados de experimentos que identificam o antígeno T12E, derivado de um clone do estoque Ernestina de *T. cruzi*, como capaz de induzir reações cutâneas de hipersensibilidade tardia de grande intensidade em coelhos chagásicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Parasitas

Nesses estudos foram utilizados quatro estoques e um clone de *T. cruzi*: a) estoque Y (TY), isolado de uma criança com a infecção

Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas. Departamento de Patologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF

Endereço para correspondência: Dr. Antonio R. L. Teixeira. Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Caixa Postal 04-685. 70919-970, Brasília, DF Brasil. Fax: (061) 273-4645.

Recebido para publicação em 25/01/95.

aguda, em São Paulo, 1954¹²; b) estoque Ernestina (TE), isolado de criança com a infecção aguda, em São Felipe, Bahia, 1964⁹. Foi usado também o clone T12E derivado desse estoque; c) estoque Albuquerque (TA), isolado de adulto com a forma aguda da doença, procedente de Barreiras, Bahia, 1978¹⁹; d) estoque *T. cruzi* (PH), isolado do morcego *Phyllostoma hastatus* de caverna, (cortesia do Dr. William Barbosa, IPTESP), no Estado de Goiás. e) foi utilizado também *Herpetomonas samuelpessoai*, flagelado monogenético de inseto, não-patogênico para o homem¹⁴.

Cultura de células

Culturas de células de fetos de camundongos foram estabelecidas e mantidas de acordo com técnica padrão¹⁸. As monocamadas de células musculares esqueléticas em frascos plásticos de 25cm² foram infectadas com 10⁵ formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Dez dias após a infecção as formas tripomastigotas (≈95%) emergentes no meio sobrenadante eram colhidas por centrifugação. Após duas semanas, as culturas superinfectadas apresentavam maior quantidade de formas amastigotas (≈30±15%) no sobrenadante. Tripomastigotas e amastigotas eram colhidas e congeladas para obtenção de antígenos subcelulares.

Cultura em LIT

Os estoques e clones de *T. cruzi* e, também, o tripanossomatídeo *H. samuelpessoai* foram cultivados em meio LIT⁴. As culturas eram mantidas em fase exponencial de crescimento e os inóculos eram feitos na relação de 10⁵ parasitos/ml de meio. Frascos Erlenmayer de 500ml com tampa de rosca eram inoculados e levados para incubadora a 27°C, com agitação constante a 100rpm. De acordo com o padrão de crescimento do estoque do protozoário, o meio de cultura era examinado ao microscópio e as formas epimastigotas eram contadas, 10 a 12 dias pós-inoculação, em fase exponencial de crescimento. Em geral, obtinham-se 10⁷ parasitos/ml de meio de cultura. Nessa condição experimental 99% das formas examinadas eram epimastigotas típicas. Essas formas do parasito eram, então, colhidas por centrifugação e usadas para obtenção do antígeno.

Obtenção de antígenos subcelulares

- a) **Antígenos obtidos de formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*.** Os sobrenadantes das culturas de células infectadas eram centrifugados e lavados três vezes em PBS, pH 7,2, a 4°C. Em seguida, o sedimento era ressuspenso em H₂O bidestilada (1:20 p/v) e submetido a cinco ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos. O extrato solúvel de amastigotas e tripomastigotas (AT) era o sobrenadante obtido por centrifugação a 5000g x 25 min, a 4°C.
- b) **Antígenos obtidos de formas epimastigotas.** Formas epimastigotas de *T. cruzi* e de *H. samuelpessoai* foram colhidas de meio LIT, em fase exponencial de crescimento, por centrifugação a 3000g x 10min. O sedimento foi lavado três vezes em PBS, pH 7,2, a 4°C. O sedimento também foi ressuspenso em H₂O bidestilada e submetido a cinco ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos. O sobrenadante obtido após centrifugação a 5000g x 25 min, a 4°C, era o extrato solúvel de epimastigotas (EP).

Os extratos solúveis AT e EP foram submetidos a centrifugação diferencial¹⁸ a 15.000g x 25min, 30.000g x 35min, e 100.000g x 90min. Em cada uma dessas etapas de centrifugação o sedimento constituía as frações subcelulares (F4, F5 e F6), enquanto o sobrenadante solúvel da última centrifugação era a fração F7. As frações F1, F2 e F3, que encerram organelas de vários compartimentos subcelulares, foram descartadas porque podem produzir reação tecidual inespecífica no sítio de injeção¹⁹.

Infecção de coelhos com *T. cruzi*

Nesse estudo, foram utilizados 55 coelhos brancos, machos, Nova Zelândia, de oito meses de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas metálicas individuais, com piso fenestrado de ripas de madeira, medindo 55 x 60 x 60cm. Cada coelho era identificado por numeração na face interna da orelha, coincidente com numeração de ficha presa na gaiola. O coelhário era aspirado e lavado duas vezes por semana e também submetido, periodicamente, à desinfecção com

flambagem. Durante o período de quarentena de um mês foi feito tratamento coccidiostático (sulfametaxol + trimetropin durante 7 dias), enquanto que infestação com ácaros foi coibida com ectomosol (monossulfureto de tetraetiluran).

Trinta e seis coelhos foram inoculados com tripomastigotas de *T. cruzi*. O grupo A consistiu de 24 coelhos que receberam, por via subcutânea, 10^6 formas do estoque Ernestina do parasito por kg de peso. O grupo B foi formado por 12 coelhos que receberam 10^6 tripomastigotas do estoque Albuquerque por kg de peso, via subcutânea.

O grupo controle consistiu de 19 coelhos do mesmo grupo etário, mantidos nas mesmas condições experimentais. Todos os animais desse estudo foram alimentados com ração Guabi e água *ad libitum*.

Parasitemias

A detecção de parasitemias em coelhos infectados com *T. cruzi* foi feita pelo xenodiagnóstico¹⁷. Em cada xeno foram usadas 20 ninfas de primeiro estágio de *Dipetalogaster maximus*.

Deteção de anticorpos específicos

Os testes sorológicos de hemaglutinação indireta e de aglutinação direta de formas de cultivo do parasito, tripsinizadas e fixadas com formaldeído a 2%, foram usados para detecção de anticorpos específicos, conforme descrito em trabalho prévio¹⁷. O teste de aglutinação foi feito após tratamento do soro com 2-mercaptoetanol, para remoção de anticorpos IgM e comparação com amostras sem tratamento, para identificação principalmente de anticorpos da classe IgG. Foram considerados como positivos títulos iguais ou superiores a 1:8 e 1:64, respectivamente, nos testes de hemaglutinação e de aglutinação direta.

Teste cutâneo

Foram feitos testes cutâneos em coelhos infectados com *T. cruzi* e em coelhos controles, normais. O teste consistiu na injeção intradérmica de 50µg de proteína contida em 100µl de cada fração antigênica subcelular (Tabela 1). Uma área de endureção, medindo pelo menos 0,5cm nos diâmetros horizontal e

transversal, 48h após a injeção do antígeno foi considerada uma reação positiva. Em cada teste com antígeno o controle consistiu na injeção de 100µl de salina na região contralateral da pele depilada do abdome do coelho.

Estudos eletrocardiográficos

Foram feitos registros eletrocardiográficos em coelhos normais e em coelhos chagásicos dos mesmos grupos etários, usualmente após a realização dos xenodiagnósticos. Em geral, os traçados eram obtidos a cada semana durante o primeiro mês de infecção e, subseqüentemente, uma vez por mês durante o período de um ano. As derivações padrão¹⁷ foram registradas por um eletrocardiógrafo modelo ECG-IV (FUNBEC, São Paulo). Os registros eletrocardiográficos em coelhos controles, não-infectados, foram feitos, pareadamente, para comparação com aqueles obtidos de coelhos chagásicos.

Quantificação de proteínas

O método de Lowry⁸ foi empregado para determinação da quantidade de proteínas no antígeno. Uma solução de albumina bovina com concentração conhecida foi usada como padrão.

Análise estatística

O teste *t* de Student foi utilizado para análise de grupo.

RESULTADOS

O estudo teve como ponto de partida a comparação da intensidade das reações cutâneas de hipersensibilidade tardia produzidas por antígenos presentes em frações subcelulares de amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, derivadas de cultura de células, e por frações subcelulares de formas epimastigotas, derivadas de meio de cultura axênico. Essas frações antigênicas subcelulares foram testadas em coelhos chagásicos crônicos. Os resultados desses experimentos mostraram que 50µg de proteína contida nos antígenos derivados de formas epimastigotas produziam sempre reações cutâneas tardias significativamente mais intensas que aquelas obtidas com os antígenos derivados de formas amastigotas e tripomastigotas (resultados não

publicados). Em vista desses resultados, somente os antígenos derivados de formas epimastigotas foram usados nos experimentos descritos aqui.

Tabela 1 - Intensidade de reações cutâneas induzidas por frações subcelulares de tripomastigóides em coelhos chagásicos crônicos.

Coelho n	Ag	Origem do antígeno do teste cutâneo [†]				
		T12E	TA	TY	PH	HS
Grupo A: infectados com <i>T. cruzi</i> Ernestina*						
1 a 3	F4	1,9±0,5	1,6±0,7	1,7±0,8	0,8±0,5	0,6±0,3
4 a 6	F5	2,5±0,6	1,9±0,6	2,1±0,9	1,7±0,4	1,0±0,5
7 a 9	F6	3,0±0,9	2,4±0,8	2,2±0,7	2,0±0,7	1,4±0,7
10 a 12	F7	1,7±0,4	1,3±0,7	1,0±0,8	0,7±0,3	0,6±0,5
	X	2,3±0,6 ^a	1,8±0,7 ^b	1,7±0,8 ^c	1,3±0,5 ^d	0,9±0,6 ^e
Grupo B: infectados com <i>T. cruzi</i> Albuquerque*						
13 a 15	F4	1,6±0,4	1,8±0,9	1,6±0,7	0,8±0,4	0,7±0,5
16 a 18	F5	2,5±0,7	2,0±0,6	2,2±1,0	1,7±0,6	0,9±0,3
19 a 21	F6	2,9±0,6	2,5±0,8	2,3±0,9	2,1±1,1	1,2±0,6
22 a 24	F7	1,3±0,8	1,4±0,6	1,2±0,6	0,9±0,5	0,6±0,5
	X	2,1±0,6 ^f	1,9±0,7 ^g	1,8±0,8 ^h	1,4±0,7 ⁱ	0,8±0,5 ^j

T12E, TA, TY, PH e HS, antígenos (Ags) de epimastigotas originadas, respectivamente, de um clone do estoque Ernestina, e dos estoques Albuquerque, Y e PH de *T. cruzi*, e de *Herpetomonas samuelpessoai* (vide material e métodos)

* O inóculo consistiu de 10⁶ tripomastigotas por kg de peso;

a us c, p < 0,05; a us d, p < 0,001; a us e, p < 0,001, f, g, h us j, p < 0,02; i us j, p < 0,05.

A Tabela 1 mostra resultados de testes cutâneos com antígenos presentes nas frações subcelulares (F4 a F7) de quatro estoques diferentes de *T. cruzi* e, ainda, de *H. samuelpessoai*. No grupo A, 12 coelhos infectados com o estoque Ernestina de *T. cruzi* foram testados com os antígenos subcelulares do clone T12E, derivado desse mesmo estoque. Esses coelhos também foram testados com frações subcelulares derivadas de formas epimastigotas de *T. cruzi* dos estoques Albuquerque, Y, e PH. Em geral, os antígenos presentes nas frações subcelulares derivadas do clone T12E produziram reações cutâneas de hipersensibilidade tardia de maior intensidade nos coelhos inoculados com tripomastigotas do estoque Ernestina. As frações subcelulares derivadas dos demais estoques de *T. cruzi* também produziram reações cutâneas, ainda que de intensidade menor. De interesse, os antígenos derivados de *T. cruzi* do estoque PH produziram reações cutâneas tardias de intensidade muito menor que aquela obtida com os antígenos derivados dos demais estoques de *T. cruzi*. Todavia, os antígenos derivados de *H. samuelpessoai* produziram reações cutâneas de intensidade mínima quando comparadas com aquelas obtidas com os demais antígenos (Tabela 1).

No grupo B, os 12 coelhos infectados com o estoque Albuquerque de *T. cruzi* também foram testados com os antígenos subcelulares do parasito. Em geral, os antígenos subcelulares derivados do clone T12E produziram reações cutâneas mais fortes que aquelas produzidas com os antígenos derivados dos demais estoques do parasito. Os antígenos derivados do estoque PH sempre produziram reações cutâneas tardias mais fracas que aquelas obtidas com os outros estoques do parasito. Em adição, os antígenos derivados de *H. samuelpessoai* produziram reações cutâneas muito fracas ou então negativas. Essas diferenças de intensidade das reações também tiveram significado estatístico (Tabela 1).

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram ainda que as frações subcelulares F5 e F6, derivadas de formas epimastigotas do clone T12E de *T. cruzi*, produziram reações cutâneas tardias de grande intensidade. Todavia, as frações F4 e F7 também produziram reações de intensidade moderada. Essas observações sugeriram a necessidade de introduzir modificação no método de preparo do antígeno. Um estudo piloto mostrou que o antígeno composto das frações F4 a F7, derivado do clone de *T. cruzi* T12E, continha o(s) princípio(s) ativo(s) capaz(es) de produzir reações cutâneas tardias de intensidade maior que aquelas mostradas na Tabela 1. Esse antígeno T12E foi usado nos experimentos descritos a seguir.

A Figura 1 mostra reação cutânea papulosa, endurecida, na pele de coelho chagásico, 48h após a inoculação de 50µg do antígeno T12E. Em experimentos controle, 19 coelhos normais receberam injeções intradérmicas de 50µg do antígeno T12E, (Tabela 2). Nenhum desses animais apresentou reação cutânea ao antígeno T12E após cinco testes consecutivos, com intervalos de uma semana.

A Figura 2 mostra a intensidade das reações cutâneas tardias em coelhos chagásicos ao longo de 12 meses de evolução da infecção crônica. Observou-se que 10 dias após a infecção os coelhos chagásicos apresentavam reação cutânea no sítio de inoculação do antígeno T12E. Essas reações apresentavam menor intensidade aos 2 e 3 meses de infecção. À medida que a infecção cronicou, porém, as reações cutâneas tardias aumentaram de intensidade e sustentaram um

platô de longa duração. Como se observa, a administração de 50µg do antígeno T12E por 15 vezes, ao longo de um ano, não produziu efeito cooperativo que resultasse no aumento continuado da intensidade das reações cutâneas tardias nos coelhos chagásicos crônicos.



Figura 1 - Reação papulosa endurecida na pele de coelho chagásico, 48h após a injeção de 50µg de proteína contida em 100µl do antígeno T12E, derivado de um clone de *Trypanosoma cruzi*.

A Figura 2 também mostra a curva de parasitemias em 12 coelhos inoculados com tripomastigotas do estoque Ernestina de *T. cruzi*. Observe que as parasitemias atingiram um pico aos 30 dias de infecção, quando 70 por cento dos triatomíneos usados no xenodiagnóstico mostraram-se positivos. Entretanto, no quinto mês de infecção apenas

três por cento dos triatomíneos eram positivos. A partir do sexto mês todos os xenos foram persistentemente negativos.

O vetor do topo da Figura 2 mostra a evolução dos traçados eletrocardiográficos ao longo da infecção chagásica crônica. Observou-se que durante os três primeiros meses, quando as parasitemias eram patentes, não foram registradas alterações eletrocardiográficas. Alterações transitórias, como bloqueio AV do primeiro grau, foram registradas a partir do quarto mês de infecção. Entretanto, alterações persistentes e múltiplas foram registradas no eletrocardiograma a partir do quinto mês, quando os coelhos chagásicos tiveram os xenodiagnósticos negativos. Os achados eletrocardiográficos consistiram de alterações de repolarização ventricular, desvio de eixo, bloqueio de ramo direito do feixe de His e bloqueio átrio-ventricular de primeiro grau. Baixa voltagem do QRS, arritmias e alterações consistentes com isquemia também foram registradas nos coelhos chagásicos dos grupos A e B. De interesse, nenhuma dessas alterações foi registrada nos coelhos controles (grupo C). Apenas em um deles registrou-se taquicardia sinusal transitória.

Nesse estudo, quatro entre 12 coelhos do grupo A e cinco entre 12 coelhos chagásicos do grupo B já tinham alterações eletrocardiográficas antes do primeiro teste

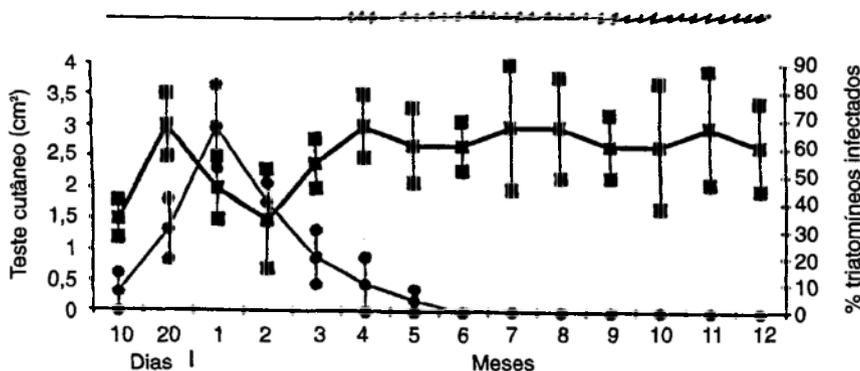


Figura 2 - Relação entre duração da parasitemia (●—●), intensidade da hipersensibilidade cutânea tardia ao antígeno T12E (■—■), e início e estabelecimento de alterações eletrocardiográficas (vetor ondulado no topo em 12 coelhos inoculados com tripomastigotas do estoque Ernestina de *Trypanosoma cruzi*).

cutâneo, feito aos seis meses de infecção. A Tabela 2 mostra que o emprego de cinco testes cutâneos nos coelhos chagásicos do grupo A, com intervalos de uma semana, não aumentou a frequência das alterações do eletrocardiograma quando comparado com a frequência de alterações no grupo de 12 coelhos do grupo B, que não foram submetidos ao teste cutâneo. De fato, a evolução das alterações do eletrocardiograma nos coelhos chagásicos do grupo A foi semelhante àquela observada nos coelhos do grupo B. No grupo controle, 19 coelhos normais foram submetidos, pareadamente por idade, a testes cutâneos com o antígeno T12E, com intervalos de uma semana. Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram ausência de alterações eletrocardiográficas, após cinco testes cutâneos. O estudo histopatológico de secções de coração de coelhos chagásicos submetidos a cinco testes cutâneos mostrou miocardite semelhante àquela presente em coelhos chagásicos que não foram submetidos ao exame¹⁷. Os coelhos controles, não-chagásicos, exibiram secções de coração com aspecto histológico normal.

Tabela 2 - Sumário dos resultados de exames eletrocardiográficos em coelhos chagásicos e em coelhos controles, não-chagásicos, submetidos a cinco testes cutâneos com o antígeno T12E, em intervalos de uma semana.

ECG	Resultados ¹					
	0	1	2	3	4	5
Grupo A: coelhos infectados com <i>T. cruzi</i> Ernestina						
normal	4/12	4/12	3/12	4/112	4/12	4/12
alterado	8/12	8/12	9/12	8/12	8/12	8/12
Grupo B: coelhos infectados com <i>T. cruzi</i> Albuquerque						
normal	5/12	5/12	5/12	5/12	6/12	6/12
alterado	7/12	7/12	7/12	7/12	6/12	6/12
Grupo C: coelhos controles, não infectados						
normal	19/19	19/19	19/19	19/19	18/19	19/19
alterado	0/19	0/19	0/19	0/19	1/19	0/19

¹ Número de animais com eletrocardiograma alterado/número de animais examinados.

* Registros eletrocardiográficos feitos antes do teste cutâneo com o antígeno T12E (dia zero) e após cada um dos cinco testes, com intervalos de uma semana; O teste constituiu na injeção intradérmica de 100µl do antígeno contendo 50µg de proteína.

** Os coelhos chagásicos do grupo B não foram submetidos ao teste cutâneo.

Os exames sorológicos de hemaglutinação indireta e de aglutinação direta foram empregados para detecção de anticorpos específicos em coelhos chagásicos e nos coelhos controles submetidos a testes cutâneos com o antígeno T12E. Observou-se que os

coelhos chagásicos não tiveram os títulos de anticorpos séricos alterados pelos testes cutâneos. De fato, os exames de hemaglutinação indireta e de aglutinação direta exibiram títulos que se mantiveram sempre elevados nos coelhos do grupo A, submetidos aos testes cutâneos, assim como nos coelhos do grupo B que não receberam o antígeno T12E.

A Tabela 3 mostra que os 19 coelhos que tinham o exame de hemaglutinação negativo antes do primeiro teste cutâneo continuaram com resultado negativo após o segundo e, também, após o quinto teste com 50µg do antígeno T12E. Por outro lado, o exame de aglutinação direta, sem o agente redutor 2-mercaptoetanol, mostrou resultados positivos em dois coelhos controles, antes do teste cutâneo. Esses dois coelhos mantiveram os títulos de anticorpos heterófilos, da classe IgM, depois do teste cutâneo. De interesse, a hemaglutinação revelou apenas um coelho controle com título "borderline" (diluição 1:8) de anticorpos da classe IgG, depois de cinco testes cutâneos com o antígeno T12E.

Tabela 3. Resultados de exames sorológicos em coelhos normais, após realização de testes cutâneos com o antígeno T12E.

Exame sorológico	Resultados*		
	0	3	5
Hemaglutinação indireta	19/19	19/19	19/19
Aglutinação direta			
sem 2-mercaptoetanol	17/19	17/19	17/19
com 2-mercaptoetanol	19/19	19/19	18/19

* Os exames sorológicos foram feitos antes do teste cutâneo (dia zero), e em duas ocasiões, após o terceiro e o quinto teste. Número de resultado negativo/número de coelhos controles normais submetidos ao teste com o antígeno T12E.

DISCUSSÃO

Este estudo mostra que antígenos subcelulares obtidos de *T. cruzi* de origens diferentes apresentam variações na capacidade de induzir hipersensibilidade tardia em coelhos chagásicos crônicos. Os antígenos subcelulares do clone T12E induziu reações cutâneas mais fortes que aquelas resultantes das frações dos estoques Albuquerque, Y e PH desse flagelado.

O estoque PH, isolado do morcego *P. bastatus*, mostrou baixíssima virulência em cultura de células musculares murinas. Entretanto, formas de cultivo do estoque PH em ágar-sangue eram internalizadas por células Hela. Nessa linhagem de célula as

formas internalizadas reproduziam-se lentamente e poucas tripomastigotas eram liberadas no sobrenadante da cultura. A inoculação de 10^6 formas tripomastigotas desse estoque de *T. cruzi* em camundongos Suíços não produziu parasitemia detectável. As frações subcelulares de formas epimastigotas do estoque PH de *T. cruzi* produziram reações cutâneas de intensidade muito menor que aquelas obtidas com os outros estoques do parasito. Verificou-se também que as frações subcelulares de formas epimastigotas de *H. samuelpeessoai* produziam reações cutâneas de pequena intensidade em alguns casos. Outras vezes não produziam hipersensibilidade tardia no sítio de inoculação na pele de coelhos chagásicos crônicos. Dessa forma, a possibilidade de utilização de protozoários de baixa patogenicidade, ou mesmo não patogênicos, para diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* deve ser descartada.

Os resultados desses experimentos mostram que as frações subcelulares derivadas de formas epimastigotas produziram reações de hipersensibilidade tardia mais fortes que aquelas induzidas por igual quantidade de proteínas (50µg/100µl) nas frações de amastigotas e tripomastigotas, quando injetadas na pele de coelhos chagásicos crônicos. Essa observação foi explicada pela presença de proteínas não-antigênicas nas frações derivadas das formas de *T. cruzi* oriundas de cultura de células.

Em vista da presença do(s) princípio(s) ativo(s) indutor(es) de hipersensibilidade tardia nas frações subcelulares F4 a F7, foi feita uma simplificação do método de obtenção desses antígenos de formas epimastigotas do clone T12E derivado do estoque Ernestina de *T. cruzi*, cuja clonagem foi obtida a partir do isolamento de um tripomastigota, de acordo com técnica padrão⁶. Assim, o antígeno T12E foi obtido pela centrifugação a 12.000g x 35min do sobrenadante da fração F3 do extrato do parasito. Após centrifugação, o sobrenadante isosmolar (0,15M NaCl) era diluído para a concentração final de 500µg de proteína/ml e estocado a -20°C. Mantido à baixa temperatura, a potência do antígeno T12E não apresentou alteração após 24 meses.

De interesse, as frações subcelulares de formas epimastigotas do clone T12E de *T. cruzi* induziram reações cutâneas mais fortes que aquelas obtidas com as frações dos demais

estoques do protozoário. Esse achado também foi observado quando o antígeno derivado do clone T12E foi injetado em coelhos infectados com *T. cruzi* heterólogo. Os resultados desses experimentos mostram que *T. cruzi* de diferentes origens apresentam variação na capacidade de induzir hipersensibilidade cutânea tardia em coelhos chagásicos crônicos. Em concordância com os dados da literatura¹⁹, esses achados também mostram que o(s) princípio(s) ativo(s) indutor(es) de hipersensibilidade tardia está(ão) amplamente distribuído(s) em diversos compartimentos subcelulares do *T. cruzi*. Enfim, esses dados são consistentes com a grande diversidade genética que deve refletir nas variações intraespecíficas que têm sido descritas nesse protozoário^{3,7}.

O teste cutâneo de hipersensibilidade tardia foi positivo em coelhos chagásicos crônicos e negativo em coelhos controles normais. A intensidade das reações cutâneas nos animais chagásicos variou de acordo com a fase da infecção. Nos primeiros 20 dias de infecção as reações eram fortes, porém, a intensidade diminuiu bastante entre o primeiro e o terceiro mês. A partir do quarto mês de infecção a hipersensibilidade tardia ao antígeno T12E voltou a ser de grande intensidade. Os exames sorológicos de hemaglutinação e de aglutinação foram utilizados para detecção de anticorpos específicos em coelhos chagásicos submetidos a uma série de cinco testes cutâneos, ou em coelhos chagásicos que não receberam injeções do antígeno. Os perfis dos títulos desses anticorpos foram similares em ambos grupos de coelhos chagásicos. Apenas um entre 19 coelhos controles, submetidos a cinco testes cutâneos, apresentou título "borderline" de anticorpos IgG detectados pela aglutinação direta com tratamento do soro com 2-mercaptoetanol. A presença de anticorpos IgM, detectados pela aglutinação direta sem 2-mercaptoetanol, foi encontrada naturalmente em dois coelhos, mas os títulos desses anticorpos heterófilos não foram modificados, após cinco injeções de 50µg do antígeno T12E.

Os resultados dos experimentos descritos aqui são consistentes com o conhecimento acerca de química de proteínas. A injeção dessa pequena quantidade de proteína não replicável em coelhos normais, via intradérmica, resulta em degradação rápida,

através dos sistemas proteolíticos naturais que operam *in vivo*. Como esperado, a injeção da proteína sem adjuvante não induziu hipersensibilidade tardia nem tampouco anticorpos séricos. O exame das secções de tecidos dos coelhos controles, não-chagásicos, exibiam histologia normal. Consistentemente, os coelhos chagásicos submetidos ou não ao teste cutâneo tinham miocardite crônica com as características descritas na literatura¹⁷, sem que houvesse agravamento das lesões no grupo de animais que receberam o antígeno T12E. A observação de que aquela quantidade do antígeno T12E injetada cinco vezes em coelhos normais, com intervalos de uma semana, não produziu alterações histopatológicas tem grande importância, diante da possibilidade de utilização do teste cutâneo para diagnóstico da doença de Chagas. Essa possibilidade poderá ser estudada, paralelamente ao emprego de antígenos recombinantes para uso em exames sorológicos^{1 13 22}, para que suas vantagens operacionais sejam avaliadas.

Por outro lado, a inocuidade do teste cutâneo também foi indicada em experimentos que mostraram que a injeção de 50µg do antígeno T12E, em cinco ocasiões, não modificou o perfil das reações imunes em coelhos chagásicos e tampouco aumentaram a frequência nem as características das alterações eletrocardiográficas registradas ao longo de um ano. As alterações eletrocardiográficas registradas em coelhos chagásicos submetidos aos testes cutâneos não foram diferentes, na frequência e na qualidade, daquelas observadas nos coelhos chagásicos que não receberam o antígeno. Esses dados mostram que o teste cutâneo com 50µg do antígeno T12E é absolutamente inócua, pelos parâmetros empregados nesse estudo. De fato, essa quantidade de proteína não-replicável é insignificante diante da produção incessante de antígenos em indivíduos com a infecção aguda ou crônica. Em adição, os traçados eletrocardiográficos não são alterados em consequência da injeção do antígeno em coelhos controles normais. Em resumo, a pequena quantidade de proteína desse antígeno injetada em coelhos controles normais não induziu soroconversão nem positividade do teste cutâneo, após cinco testes subsequentes.

Outro achado de interesse foi a confirmação de que o teste cutâneo pode ser

um indicador de morbidade¹⁶. Nesse estudo, foi observada inexistência de relação entre parasitemia patente e alterações eletrocardiográficas. Essas só foram registradas após o quinto mês de infecção, quando as parasitemias não eram demonstráveis pelo xenodiagnóstico. Em contraste, observou-se relação positiva entre intensidade de reações de hipersensibilidade tardia e início e estabelecimento de alterações eletrocardiográficas persistentes. Embora os dados apresentados aqui não estabeleçam relação vertical entre a positividade no teste e alterações eletrocardiográficas, existem na literatura²⁰ dados que mostram intensa reatividade cutânea de hipersensibilidade tardia a antígenos de *T. cruzi* em pacientes com a infecção aguda aparente e ausência de reatividade em pacientes com a forma inaparente da infecção. Em vista desses achados, deve-se considerar a possibilidade de que o teste cutâneo com o antígeno T12E seja uma ferramenta útil no estudo da doença de Chagas.

SUMMARY

Delayed-type skin hypersensitivity in rabbits infected with homologous or heterologous T. cruzi has been elicited upon injection of 50µg of protein in the T12E antigen derived from a parasite clone. The specificity of this reaction was indicated by absence of skin reactivity in control rabbits that received same quantity of antigen. Also, the intradermal injection of the antigen in five occasions in control rabbits neither induced seroconversion nor shifted their skin sensitiveness. On the other hand, chagasic rabbits that underwent a series of five skin testings one week apart, did not alter the intensity of the skin reactivity, and their specific serum antibody titers remained similarly high. Of interest, the ECG patterns remained unchanged after a series of five skin testings in control and in chagasic rabbits. This study shows that the T12E antigen might be an useful tool for diagnosing T. cruzi infections, besides serving as an immunologic marker for morbidity in Chagas' disease.

Key-words: *Trypanosoma cruzi. Delayed-type skin hypersensitivity. T12E antigen. Chagas' disease.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Vanize Macêdo, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, pela interpretação dos eletrocardiogramas e Maria José Gonçalves, pela ajuda técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida MA, Carvalho MR, Oelman W, Goldenberg S. Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas' disease and blood bank screening. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 85: 513-517, 1990.
2. Amato Neto V, Magaldi C, Pessoa SB. Intradermoreação para o diagnóstico da doença de Chagas com antígeno de *Trypanosoma cruzi* obtido de cultura de tecido. Revista Goiana de Medicina 10: 1121-126, 1964.
3. Brener Z. Intraespecific variations in *Trypanosoma cruzi*. Two types of parasite populations presenting distinct characteristics. In: Chagas disease. Pan American Health Organization Scientific Publication 347: 11-21, 1977.
4. Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 6: 93-100, 1964.
5. Dvorak JA. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*. Biological and medical implications. Journal of Cell Biochemistry 24: 357-371, 1984.
6. Dvorak JA. Single cell isolates of *Trypanosoma cruzi*. How and why? Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 18(supl):38-40, 1985.
7. Lauria-Pires L, Bogliolo AR, Teixeira ARL, Silva-Pereira AA. Isoenzymatic and fingerprinting profiles of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones obtained from patients with cardiac and digestive forms of Chagas' disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 87(supl II): 118, 1992.
8. Lowry H, Rosenbrough NJ, Farr LA, Randall RJ. Protein measurement with the Folin reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265-275, 1951.
9. Neva F, Gam A. A complement-fixation antigen from *Trypanosoma cruzi* grown in cell cultures. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 26: 37-46, 1977.
10. Pizzi T, Rubio M. Aspectos celulares de la inmunidad en la enfermedad de Chagas. Boletín Chileno Parasitología 9: 35-39, 1954.
11. Seah S. Delayed hypersensitivity in *Trypanosoma cruzi* infection. Nature 225: 1246-1267, 1970.
12. Silva LHP, Nussenzweig V. Sobre uma cêpa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clinica Biologica 20: 191-208, 1953.
13. Silveira JE. Aplicação de antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi* no sorodiagnóstico da doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 26(supl II): 11-13, 1993.
14. Souza MCM, Reis AP, Silva WD, Brener Z. Mechanism of acquired immunity induced by *Leptomonas pessoai* against *Trypanosoma cruzi* in mice. Journal of Protozoology 21: 579-583, 1974.
15. Taliaferro WH, Pizzi T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. Journal of Infectious Diseases 96: 199-226, 1955.
16. Teixeira ARL. The Stercorarian Trypanosomes. In: Soulsby EJJ (ed) Immune Response in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis. Vol III, CRC Press, Boca Raton, Florida p. 25-118, 1987.
17. Teixeira ARL, Figueiredo F, Rezende Filho J, Macedo V. Chagas disease: A clinical, parasitological, immunological and pathological study in rabbits. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 32: 258-272, 1983.
18. Teixeira ARL, Santos-Buch CA. The immunology of experimental Chagas' disease. I-Preparation of *Trypanosoma cruzi* antigens and humoral antibody response to these antigens. Journal of Immunology 113: 859-869, 1974.
19. Teixeira ARL, Santos-Buch CA. The immunology of experimental Chagas' disease. II. Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* antigens. Immunology 28: 401-410, 1975.
20. Teixeira ARL, Teixeira G, Macedo V, Prata A. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. Journal of Clinical Investigation 62: 1132-1141, 1978.
21. Zeledon R, Ponce C. A skin test for the diagnosis of Chagas' disease. Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 68: 414-415, 1974.
22. Zingales B, Gruber A, Ramalho CB, Umezawa ES, Coli W. Use of two recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas' disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 85: 519-522, 1990.