

**RESUMOS APRESENTADOS NO XII CONGRESSO DA SOCIEDADE
BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL – BELO HORIZONTE-MG –
05.03.1986 PELA UNIDADE DE INVESTIGAÇÃO GASPAR VIANA
(Centro de Pesquisa em Paracoccidiodomicose) IPTESP-UFG.**

**DOSAGEM DE PRECIPITINAS CIRCULANTES PELA TÉCNICA DE
IMUNODIFUSÃO RADIAL DE MANCINE NA PARACOCCIDIODOMICOSE**

*Osvaldira Seabra de Oliveira, William Barbosa, Ana C. Czerewuta,
Joana R. Mendonça e Raquel L. Oliveira*

Após detecção do título de imunoglobulinas circulantes tipo IgG, o soro de pacientes com *Paracoccidiodomicose* foi absorvido com antígeno solúvel bastante espesso – obtido de cultura da cepa 2053, crescido na forma leveduriforme a 37°C em Sabouraud por 20 dias, e logo posto à temperatura ambiente, imerso em meio de soja (caseiro) por 60 dias.

O antígeno constou do centrifugado de cultura, concentrado quatro vezes por diálise contra goma arábica ou polivinilpirrolidona.

Com o mesmo antígeno, preparou-se imunoplaças, constantes da mistura de agarose a 2% mais o antígeno e mais NaCl, cuja proporção ótima foi encontrada por tentativa (1:3).

A técnica consistiu na padronização da imunoplaça por diluições sucessivas do soro, na qual se determinou a concentração de precipitinas, em função do diâmetro em mm, alcançado após difusão total do soro. Os resultados foram distribuídos em uma curva, em papel semilogaritmo, no qual o quadrado do diâmetro correspondia à concentração de precipitinas segundo a técnica de Mancine – (mm/mg/%).

Foram testados 115 soros e analisados paralelamente aos exames de IFI e Imunodifusão de Orcherlony (ID).

Houve concordâncias muito próximas entre as reações de imunodifusão e dosagem de precipitina. A análise mais apurada destes resultados e de outros experimentos em andamento vão nos permitir detectar a especificidade dos anticorpos ocorrentes na *Paracoccidiodomicose*, bem como, inclusive, sua natureza.

CONCLUSÕES

1 – A dosagem de precipitinas pela técnica de Mancine, na *Paracoccidioidomicose*, é um método de fácil execução, que permite demonstrar, com segurança, que a Gamopatia da *Paracoccidioidomicose* corre à conta somente em alguns casos de anticorpos específicos, mas que na maioria dos casos, grande quantidade de imunoglobulinas são inespecíficas.

2 – Os resultados do estudo de imunodifusão pela técnica de imunodifusão radial, na grande maioria dos casos, coincide com a dupla difusão de Oucherlony, mas em alguns casos, aproximadamente 5% deles, ela é mais sensível. O número de frações antigênicas, determinado pelo número de bandas, não guarda uma estreita correlação com a quantidade de precipitinas específicas determinada pelo IDR.

3 – Resultados de soros humanos, de pessoas sem doença e com IR negativa, em títulos baixos na IDR sugere que a técnica seja capaz de detectar frações antigênicas do mosaico antigênico de leveduras, constituindo-se em uma “reação cruzada” quantitativa.

4 – As reações quantitativas deverão ser melhor avaliadas no estudo evolutivo de pacientes com *Paracoccidioidomicose*, nas suas diversas formas clínicas e estudadas comparativamente, por tempo prolongado, com os outros exames que servem de parâmetro para o controle da doença, como eletroforese de proteínas séricas, detenção de AC – RFC, IFI e precipitinas, de maneira geral.

DA IDENTIFICAÇÃO DO T. HASTATUS AO T. CRUZI

William Barbosa, Osvaldina S. Oliveira e Ana C. Czerewuta

Dentre os trypanosomas pequenos do grupo *Schizotrypanum*, ocorrentes em morcegos da América do Sul e Europa, as técnicas modernas empregando o estudo de enzimas e densidade flutuante do DNA do núcleo de cinetoplasto, conseguem diferenciar a contento o *T. vespertilionis* e o *T. Dionisi*; aquele, por sua característica de densidade do núcleo e seu zimodema; este pela presença do DNA Satélite. Os demais *Trypanosomas* “cruzi-like” em que se inclui o *T. hastatus* têm esses caracteres bioquímicos muito próximos do *T. cruzi*, conquanto não absolutamente igual. Sabe-se, contudo, que muitas cepas de *T. cruzi* podem diferir quanto à morfologia, virulência, tropismo para o tecido e patogenicidade, tão bem quanto, para marcadores bioquímicos como isoenzimas, padrão de enzimas de restrição, K-DNA e feitiço antigênico, daí haver necessidade de se dispor de um antígeno monoespecífico capaz de identificar a espécie.

Já de longa data, foi descrito no mosaico antigênico do *T. cruzi* a fração 5, que guarda uma estreita especificidade com o *T. cruzi*, e se correlaciona, provavelmente, às glicoproteínas de superfície específicas que vêm sendo descritas desde 1979.

Recentemente, OROSCO e cols., ao preparar antígenos a partir de epimastigotas de *T. cruzi*, obtiveram, por extração aquosa sucessiva com álcool metílico e clorofórmio, precipitado por álcool etílico, uma fração antigênica, a que chamaram fração III 160/18, correspondente à antiga fração 5, monoespecífica e relacionada à fração 72 kd de SNARY e cols. e provavelmente a 75 kd, glicoproteína de NOGUEIRA e cols.

Após a obtenção da glicoproteína do *T. hastatus*, verificou-se a identidade antigênica com soros imunes de pacientes chagásicos e camundongos sensibilizados com *T. hastatus*, sugerindo uma perfeita identidade antigênica entre ambos, identificando assim, de uma vez, o *T. hastatus* ao *T. cruzi*.

CONCLUSÕES

Ao usar-se glicoproteína de superfície do *T. hastatus*, extraída de solução aquosa de seus epimastigotas, por álcool etílico, que foi identificado por OROSCO e cols. como capaz de elicitar, exclusivamente, anticorpo simile ao componente 5 de CAPRON E AFCHAIN, e obter-se faixa de identidade antigênica pela dupla difusão de Oucherlony entre imunossoro de camundongo sensibilizado por *T. hastatus* e soro de paciente chagásico, concluiu-se pela identidade de espécie entre *T. cruzi* e *T. hastatus*, vez que a fração 5 é tida como espécie específica.

Daí admitir-se que o *T. hastatus* se constitui em mais um tipo de “cepa” de *T. cruzi*, cuja característica biológica essencial é a não patogenicidade para mamíferos, com manutenção de sua antigenicidade, e que deve ser acrescentada às três cepas padrões identificadas por ANDRADE.

ANTÍGENOS ESTÁVEIS PARA AS REAÇÕES DE IMUNODIFUSÃO EM GEL DO P. BRASILIENSIS. COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS EM FUNÇÃO DA “CEPA” (S) E PREPARO DO ANTÍGENO *

William Barbosa, Raquel L. Oliveira e Luiz F. S. Júnior

As reações de imunodifusão em gel, para Pb micose, deparam com uma séria dificuldade que é a instabilidade das partidas dos antígenos que perdem sua capacidade

* Trabalho financiado pela FINEP

antigênica, ou mesmo para que a apresentem, exigem concentrações muito altas, mostrando uma exasperante falta de sensibilidade.

Durante muito tempo, trabalhou-se sem contratempo, usando-se uma cepa isolada em Goiás há muitos anos, a cepa C-2053, da qual preparou-se um antígeno total obtido de cultivo a 37°C, forma leveduriforme, que após lavada, homogenizada e rota mecanicamente, era dislipidizada por lavagens sucessivas em acetona e éter e a massa úmida ressuspensa em PBS – 200g/ml, era centrifugada a 10.000g – o sobrenadante constituía o antígeno.

A cepa usada contaminou-se e ao ser recuperada, perdeu sua antigenicidade. Perdeu-se muito tempo tentando recuperá-la. Somente agora, após a obtenção do meio de soja e seu uso como “cobertura” do meio sólido de Sabouraud, obteve-se antígeno total, metabólico, sendo que o caldo da cultura de crescimento mostrou-se funcional desde 30 até 90 dias de crescimento, permitindo boa reprodutividade de resultados e boa sensibilidade.

No primeiro experimento obtivemos reações positivas em 40% de 100 soros de pacientes crônicos em várias fases da doença crônica, quase sempre fora da fase de reagudização.

O mesmo antígeno se prestou também para técnicas quantitativas de determinação de precipitinas.

CONCLUSÕES

Os antígenos para reação de IG em gel para *Paracoccidiodomicose* têm tendência a perder sua capacidade antigênica com facilidade, quando preparados com culturas isoladas do fungo de uma única procedência, em função do tempo de cultivo, que não deve ser menor que 10 dias.

O crescimento da cepa de *Paracoccidiodomicose* não guarda proporcionalidade entre seu grau de crescimento e sua antigenicidade. Cepas como a Beto de elevado crescimento, demonstraram menor capacidade de detectar anticorpos do que a cepa 2053 cujo crescimento foi dos mais modestos $27,8 \times 10^4$ no BHI para a “cepa” Beto e $9,5 \times 10^4$ na soja, contra 4,2 e $5,4 \times 10^4$, respectivamente da cepa 2053.

A capacidade antigênica da amostra ou cepa é uma qualidade, aparentemente, intrínseca da cepa, no entanto, mutável e reversível ao longo de sua manutenção em cultura.

A mudança do meio de cultura, pelo enriquecimento com substâncias contidas em soros, meios ricos em aminoácidos e vitaminas como o 199 e ou dialisados protéicos ricos como o de soja, parecem permitir a recuperação das características antigênicas das cepas e conferir mais estabilidade aos seus enzimas.

Os antígenos específicos do fungo parecem estar presentes tanto na forma leveduriforme quanto na filamentososa.

Culturas difásicas, preliminarmente crescidas em meios sólidos, quando suplementadas com o dialisado de soja, proporcionam um crescimento exuberante do fungo e trocas metabólicas com o meio de elevada antigenicidade.

Os antígenos constituídos por “pool” de diversas cepas de *Paracoccidiodomicose*, embora elas não apresentem grande antigenicidade, ampliam a sensibilidade do antígeno obtido; quer quando se obtém antígenos polissacarídeos e glicoprotéicos de superfície e plasmáticos, por dislipidização sucessiva com éter, acetona ou os obtidos dos antígenos metabólico ou bruto pelo uso do caldo de cultura onde cresceram os fungos.

O tempo influencia pouco, aparentemente, na melhoria da capacidade antigênica, quando o meio de cultura é rico e propicia crescimento rápido e exuberante do fungo.

DIALISADO DE SOJA INTEGRAL ENRIQUECIDO COM LEVEDO DE CERVEJA, COMO MEIO DE CULTURA DOMÉSTICO PARA *P. BRASILIENSIS*

William Barbosa, Ana Cândido Czerewuta, Osvaldira Seabra de Oliveira e Raquel Lopes de Oliveira

Além do clássico meio de cultura de Sabouraud líquido ou sólido, usado para o cultivo do *P. brasiliensis*, vários outros meios, com finalidades às vezes específicas, são usados. Dentre eles citamos o meio de SMITH. Muitos deles “complexos”, com grande número de componentes; e os comercialmente disponíveis, com preço muito elevado, nos levou a usar por muito tempo, praticamente, exclusivamente, o Sabouraud com ligeiras modificações como: acréscimo de vitaminas, levedo de cerveja, chocolate ou extrato hepático e, ultimamente, soro fetal bovino, sempre visando manter as características culturais e a capacidade antigênica da amostra.

A triptose de soja purificada, de boa procedência, associada ao extrato de levedura de cerveja e glicose já tem sido usada com sucesso para o cultivo do *P. brasiliensis*. A labilidade dos antígenos, em função da ação enzimática, tem sido um dos fatores que, durante algum tempo, têm dificultado a manutenção regular de antígenos com boa reprodutibilidade de resultados nas reações de precipitação em gel.

O uso de dialisado de soja integral (usado para alimentação humana e vendido em supermercados a preço 100 vezes menor do que o produto para fins laboratoriais) permitiu a obtenção de meio límpido, claro, com boa potencialidade de nutrição, que pôde ser usado, quando associado ao levedo de cerveja e glicose, como meio líquido ou sólido se associado ao agar.

O cultivo de “cepas” de *P. brasiliensis* crescido, inicialmente, a 37°C neste meio sólido, em forma leveduriforme, após 15, 20, 30 dias, foi recoberto com o meio em estado líquido e mantido à temperatura ambiente, o que permitiu um crescimento

exuberante do fungo. O centrifugado do meio-filtrado experimentado no 30º, 60º ou 90º dia de crescimento, forneceu ao natural, ou concentrado até 10 vezes, excelente antígeno, termorresistente para uso em reações de imunodifusão em gel na *Paracoccidiodomicose*.

O meio de cultura é preparado da seguinte forma: coloca-se em uma manga de diálise 30g de farinha de soja integral em 100 ml de água e se dialisa por uma noite, em 900ml de água estéril e desmineralizada. Ao dialisado, acrescenta-se 5g de levedura de cerveja e 10g de glicose. Filtra-se em milipore e está pronto para o uso.

CONCLUSÕES

O dialisado de extrato de soja comercial, vendido para consumo alimentar humano, demonstrou ser um excelente meio de cultivo para *Paracoccidoides brasiliensis* e outros fungos patogênicos para o homem, tanto de micoses profunda como superficial.

Seu emprego como caldo de cultura tem permitido obtenção de antígenos após crescimento de 30 dias, e, que se tornam mais sensíveis após 60 dias – tempo suficiente para sua preparação – pela simples decantação do meio, podendo, todavia, serem empregados métodos de purificação e concentração.

Os antígenos obtidos funcionam bem, praticamente, em todas as técnicas de imunodifusão.

A grande vantagem do meio como substituto dos meios comerciais disponíveis – a base de soja como o ágar seletivo para fungos patogênicos, ou como supletivo de peptonas para enriquecimento do caldo de arroz e outros – é o seu baixo custo.

A capacidade de funcionar como meio sólido associado ao ágar, ou microtécnica de cultivo permite isolamento seletivo de fungos de micoses superficiais com facilidade. A este propósito, novas e continuadas pesquisas deverão ser realizadas..

METACICLOGÊNESE DO *T. CRUZI* INDUZIDA POR ANTIBIÓTICOS EM MEIOS AXÊNICOS, COMPLEXOS, LIVRES DE CÉLULAS

William Barbosa, Ana Cândido Czerewuta e Luiz F. S. Júnior

A metaciclogênese do *T. cruzi*, em meios acelulares a temperaturas variáveis, tem sido verificada em função de vários fatores estimuladores de natureza bioquímica, potencializando meios axênicos complexos, semi-definidos ou definidos, capazes de manterem o crescimento normal do parasita.

A metaciclogênese tem sido observada, inclusive, aparentemente, de maneira espontânea, em presença de meios como o LIT; quando associado ao S.F.B., que habi-

tualmente permite, no máximo, 25% de metaciclogênese ao final da fase estacionária do crescimento. Fato que induz à hipótese de que o parasita traz intrinsecamente uma potencialidade de morfogênese em função de meios ricos em nutrientes, apropriados ao crescimento de células em cultura de tecidos, habitualmente acrescidos em SFB, o que facilitaria a metaciclogênese. Extrato de tecido de triatomíneos, linfa de insetos, soro de aves – galinha, pato – e alguns produtos químicos permitem a metaciclogênese.

Recentemente, observou-se, pelo emprego de antibióticos em doses elevadas, morfogênese da ordem de 50% de tripomastigotas e até 100% de amastigotas ou esferomastigotas. Os antibióticos empregados foram a amoxicilina e a tetraciclina.

Os resultados demonstraram que o cloridrato de tetraciclina associado ao LIT promove do 5º ao 15º dias, metaciclogênese da ordem de 32 a 48% de tripomastigotas com formação de grandes massas ou “clumps” e já no 20º dia, somente existem 1 a 3% de tripomastigotas com 98% de formas amastigotas ou esferomastigotas; alterações que começam a ocorrer nas primeiras horas após a introdução de amoxicilina no LIT.

Com a amoxicilina + soro de pato, no 5º dia. Obtém-se 50% de tripomastigotas, 30% de formas esferomastigotas, amastigotas ou formas diferentes e apenas 20% de epimastigotas.

Cogita-se que os prováveis mecanismos estimulam a pinocitose ou facilitam o carregamento para dentro do parasita de heminas e fatores nutricionais para amoxicilina além de interferirem no mecanismo de síntese protéica DNA-RNA, induzida pela tetraciclina.