

## ESTUDOS SOBRE A REAÇÃO DE GUERREIRO MACHADO. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE ANTÍGENOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

JOSÉ OLIVEIRA DE ALMEIDA

*O extrato aquoso de T. cruzi, previamente tratado pelo benzeno, mostrou, por cromatografia em Sephadex G-200, que sua reatividade antigênica estava presente nos primeiros eluatos, separando nitidamente daquelas frações inertes sorologicamente. A extração pela água remove parte dos antígenos específicos do Trypanosoma cruzi de onde podem ser removidos pelo metanol. Aqui também os perfis do cromatograma permitem separar as frações específicas, enquanto os contaminantes se acumulam nos últimos eluatos. Quando o antígeno aquoso é liofilizado e reconstituído com metanol, em vez da solução salina, os seus títulos, por fixação de complemento, são maiores do que os determinados com o antígeno aquoso.*

*A análise cromatográfica dos antígenos de Trypanosoma cruzi permitiu preparar um antígeno, para as reações de fixação do complemento, destituído de contaminantes sorologicamente inertes.*

Em 1976 um Grupo de Estudos da Organização Panamericana de Saúde (PAHO, 1976) promoveu uma avaliação crítica dos antígenos de *Trypanosoma cruzi*, empregados nos testes de fixação do complemento, para o diagnóstico sorológico da moléstia de Chagas.

Foram examinados oito antígenos em sete laboratórios, com soros normais, sífilíticos e chagásicos. No cômputo dos resultados ficou patente que dois, dos oito antígenos originais selecionados como candidatos, demonstraram ser superiores aos demais. Deles, o antígeno aquoso teve preferência por ser de mais fácil preparação (Almeida & Fife, 1976). Esse antígeno aquoso reagia especificamente com soros chagásicos, não apresentando nenhuma reatividade não específica com soros normais ou não chagásicos.

Por filtração em Sephadex G-200 isolaram-se, desse antígeno, frações ativas em fixação de complemento, com o soro chagásico de referência (Almeida et al., 1972), além dos eluatos inertes que contaminavam o antígeno aquoso. Misturando e concentrando os eluatos específicos, um antígeno purificado pode ser empregado nos testes quantitativos de fixação de complemento para o diagnóstico sorológico da moléstia de Chagas.

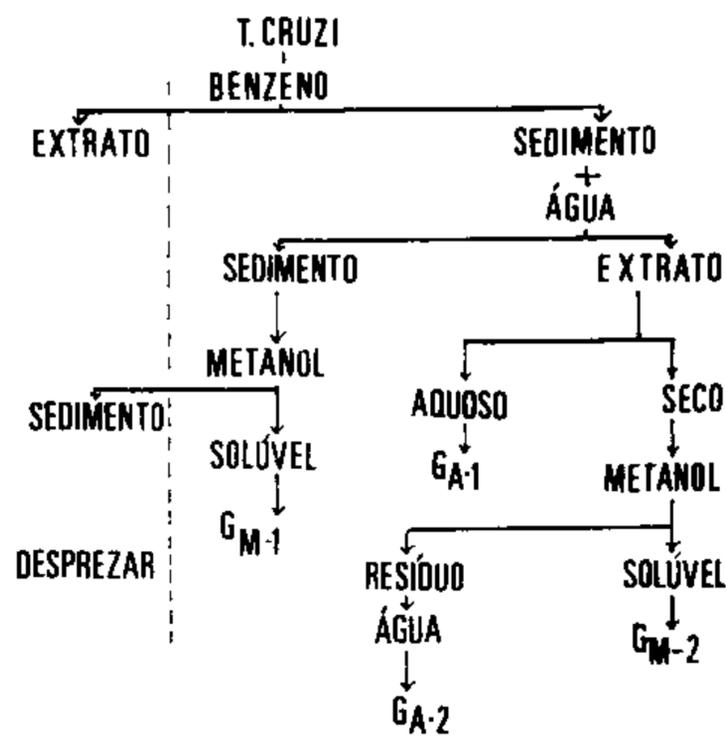
### MATERIAL E MÉTODOS

**Preparo dos antígenos:** os tripanosomas (Cepa Y), cultivados em meio difásico, são lavados em solução salina tamponada contendo azida sódica a 1/5000 e liofilizados.

Após, 250 mg de tripanosomas secos foram extraídos pelo benzeno (100 ml) e moídos em um triturador de tecido. O sedimento foi seco em estufa a 37°C e extraído com 25 ml de água destilada e, em seguida, desintegrado em ultra-som por 10 minutos. Centrifugado, o sobrenadante ligeiramente opalescente é isotonicado e aqui denominado de antígeno aquoso  $G_{A-1}$ . Parte desse antígeno é distribuído em volumes de 2 ml e liofilizado. O antígeno liofilizado é extraído pelo metanol e centrifugado. O sobrenadante é o antígeno  $G_{M-2}$ . O sedimento é extraído pela água e centrifugado. O sobrenadante é o preparado  $G_{A-2}$ . O sedimento é desprezado.

O sedimento do antígeno aquoso  $G_{A-1}$  é seco, tratado pelo metanol e centrifugado. O sobrenadante é o antígeno  $G_{M-1}$ . O sedimento é desprezado. O esquema do preparo dos antígenos de *T. cruzi* está apresentado na Fig. 1.

**Soro chagásico:** nos ensaios com os vários antígenos foi empregado o soro de referência para doença de Chagas (Almeida et al., 1972) da Organização Pan-americana de Saúde.



### ANTÍGENOS DE T. CRUZI

Fig. 1: diagrama esquemático do preparo de antígenos de *Trypanosoma cruzi*

**Cromatografia:** foram usadas colunas de 2,5 cm por 45 cm, com Sephadex G-200, lote 7129, sendo a eluição feita com a solução salina tamponada, de pH 7,2. Frações de 120 gotas foram colhidas por coletor Isco, modelo 328, registrando as absorções em comprimento de onda de 254 mμ e 280 mμ em aparelho Isco, modelo UA-5 ligado a um multiplex, modelo 1133. Durante toda a filtração em gel de Sephadex G-200 a temperatura de 20°C foi mantida.

**Fixação de complemento:** cada fração coletada foi ensaiada com o soro chagásico de referência (Almeida et al., 1972) e cinco unidades de complemento, segundo as especificações de Almeida & Fife, (1976). As frações que mostravam reatividade antigênica, foram misturadas e concentradas por ultrafiltração até se ter o mesmo volume do antígeno colocado na coluna de cromatografia.

O antígeno cromatografado foi titulado por técnica quantitativa (PAHO, 1976) em excesso de soro chagásico e simultaneamente o soro era titulado com uma dose do antígeno de reatividade máxima.

O título do complexo imune, em termos de antígeno ou de soro, foi definido como o valor da inclinação da relação linear entre as quantidades de imune-complexo e as unidades de complemento inicialmente presentes (Almeida & Fife, 1976).

A capacidade reativa específica do complexo imune com o complemento foi determinada pelo quociente entre o título do antígeno e o título do soro.

## RESULTADOS

**Antígeno  $G_{A-1}$ :** esse antígeno compreende a parte reativa do antígeno nº 4, segundo Almeida & Fife (1976). As frações de 5 a 10 fixavam o complemento em reação com o soro chagásico e cinco unidades de complemento. A mistura dessas frações foi concentrada até o volume de 5 ml.

O título do antígeno  $G_{A-1}$  foi de 1720 enquanto o título do soro foi de 374 e a capacidade reativa específica foi de 4,59.

As frações de 20 a 28 não mostraram nenhuma atividade antigênica, sendo consideradas contaminantes não específicos do antígeno aquoso.

**Antígeno  $G_{M-1}$ :** o antígeno  $G_{M-1}$  é o extrato metílico do sedimento dos tripanosomas extraídos pela água, obtido no preparo do antígeno  $G_{A-1}$ . Quando diluído em solução salina tamponada e passado na coluna de Sephadex, mostrou reatividade nas frações de 3 a 14, enquanto a parte não reativa estava nas frações de 28 a 38.

O título do antígeno, em fixação do complemento, foi de 3780 enquanto o do soro foi de 831, com um índice de reatividade específica de 4,55.

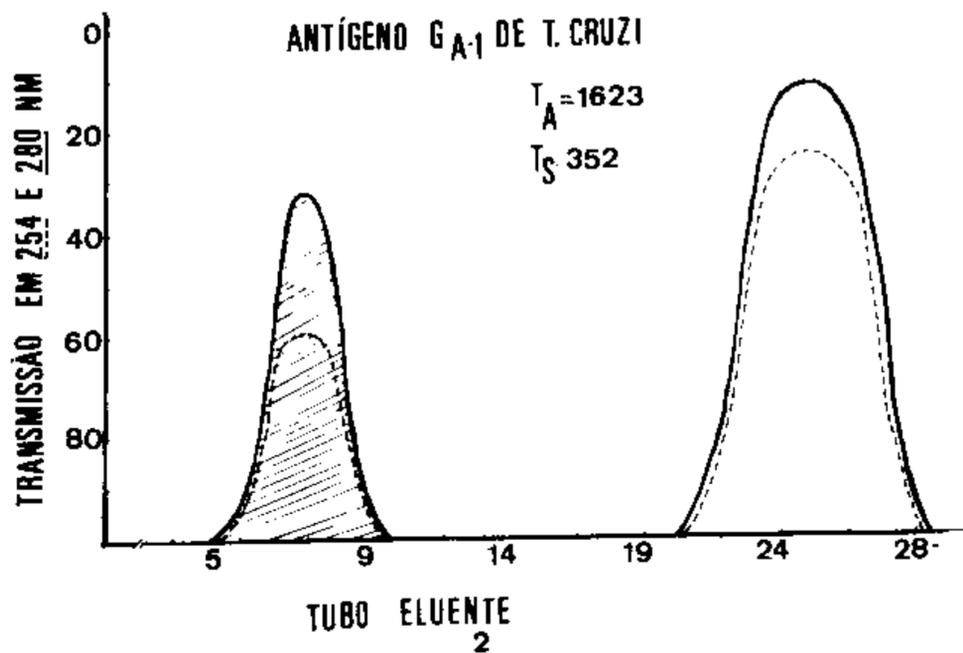


Fig. 2: o extrato aquoso de tripanosomas, tratados pelo benzeno, contém o antígeno específico (tubos 5º a 9º) e uma fração sorologicamente inerte (tubos 20º a 28º).

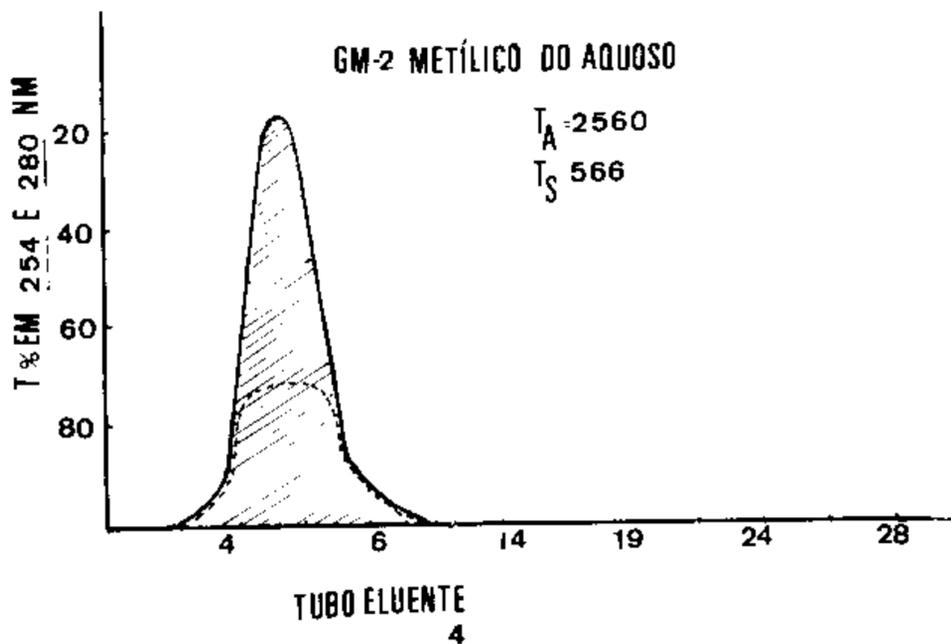


Fig. 4: o extrato metálico do antígeno aquoso liofilizado contém apenas as frações reativas (tubos 3º a 7º) em fixação do complemento, não apresentando nenhum contaminante inerte.

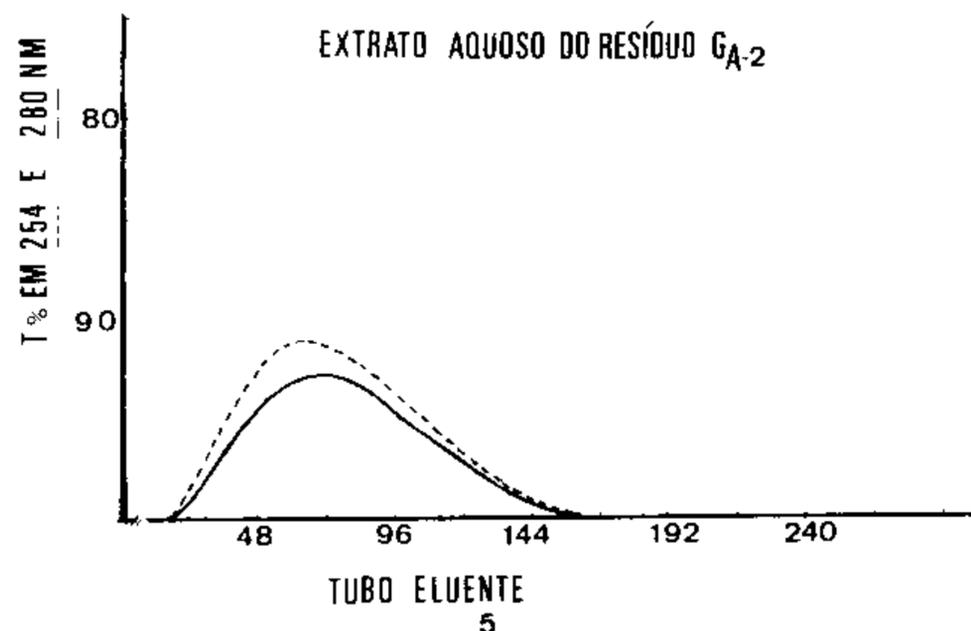


Fig. 5: o extrato aquoso dos tripanosomas previamente extraídos pelo metanol, não contém nenhuma fração antigênica, mas apenas contaminantes sorologicamente inertes.

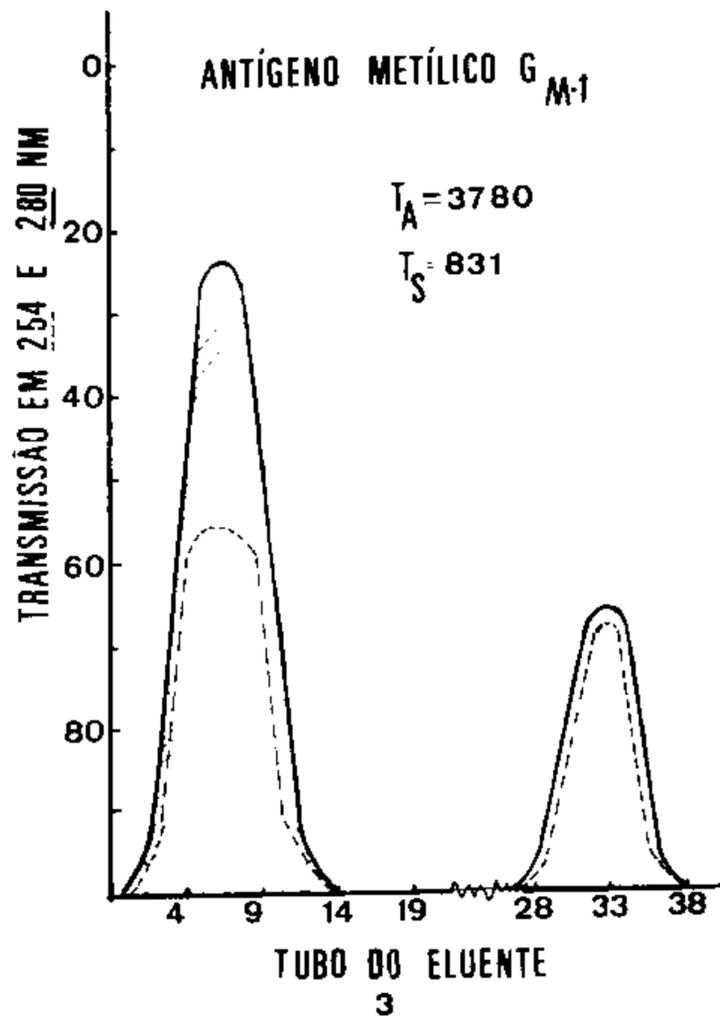


Fig. 3: os tripanosomas extraídos pela água, ainda contém antígenos específicos, solúveis em metanol (tubos 3º a 14º) e uma fração inerte sorologicamente (tubos 28º a 38º).

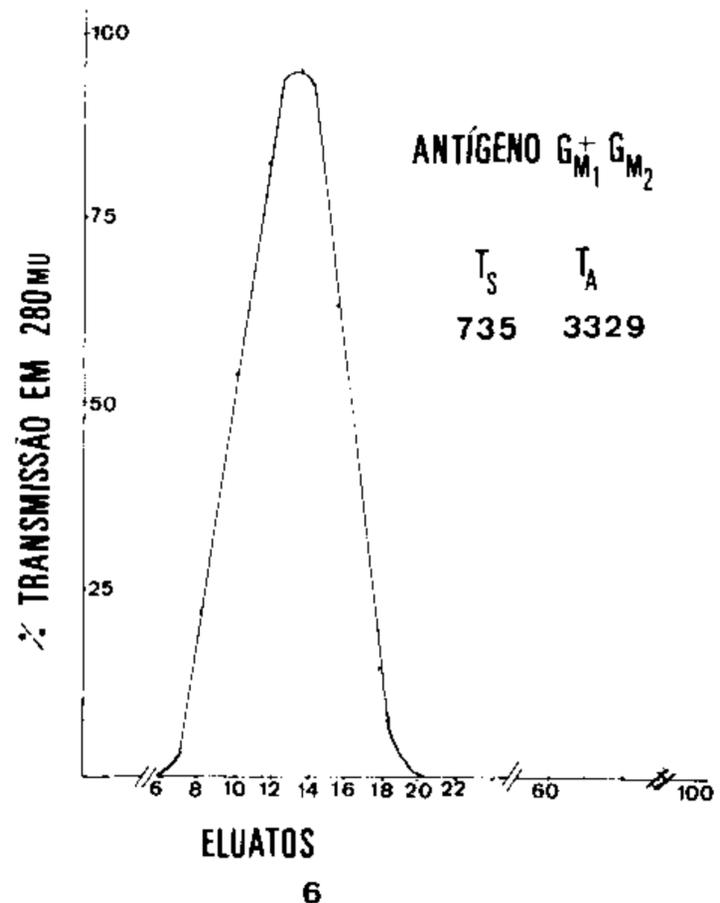


Fig. 6: a mistura de eluatos reativos, dos antígenos metálicos cromatografados, forma um antígeno específico, isento de frações contaminantes.

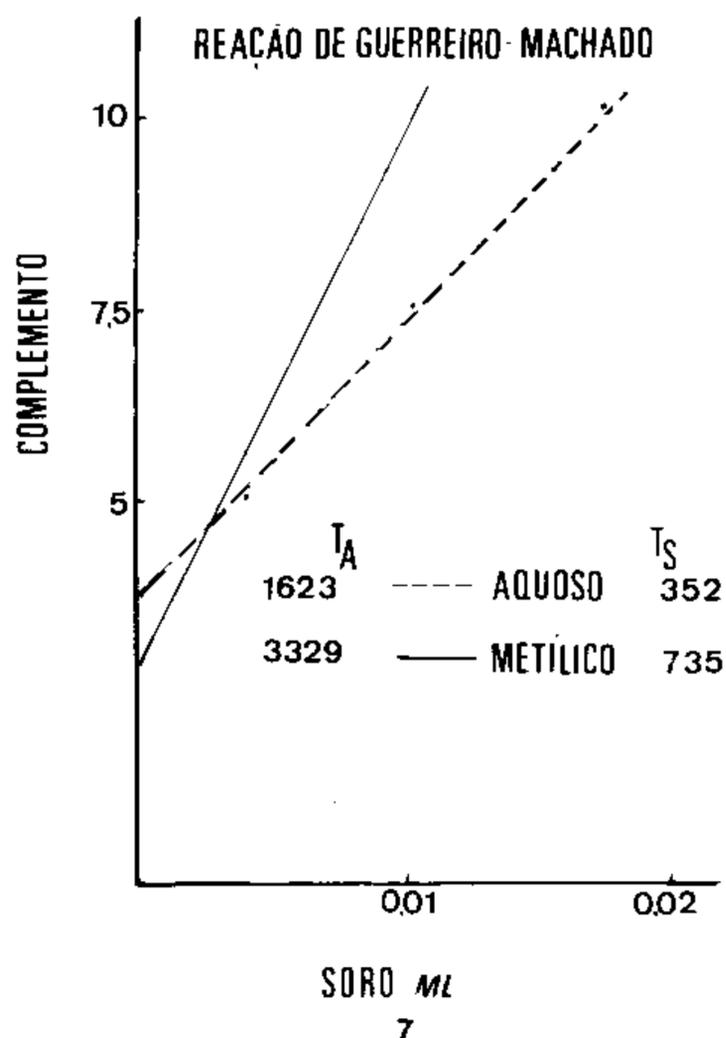


Fig. 7: o título do soro chagásico de referência é calculado como o valor de inclinação da linha de regressão entre as qualidades de soro em abscissas e as unidades de complemento inicialmente presentes, em ordenadas.

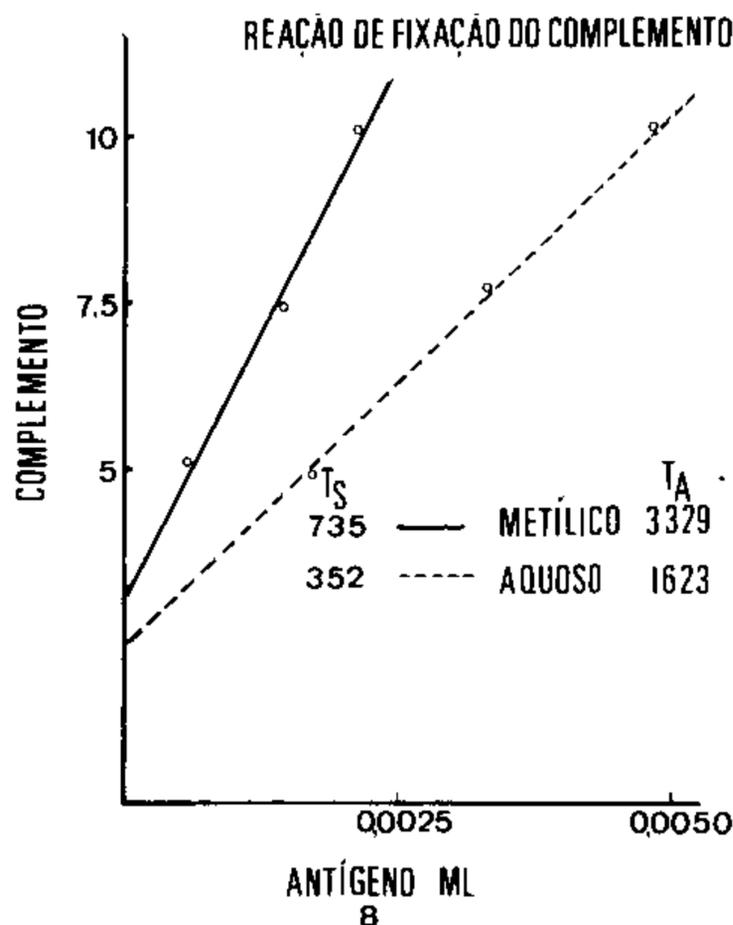


Fig. 8: o título do antígeno é calculado como a inclinação da linha de regressão obtida quando as quantidades de antígenos, em abscissas, são projetadas contra as unidades de complemento inicialmente presentes, em ordenadas.

TABELA I

Antígeno	Título do antígeno $T_A$	Título do soro* $T_S$	Capacidade reativa específica $T_A/T_S$
$G_{A-1}$ Aquoso	1623	352	4,61
$G_{M-1}$ Metílico	3780	831	4,55
$G_{M-2}$ Metílico	2560	566	4,52
$G_{M-1} + G_{M-2}$	3329	735	4,52

\*soro chagásico de referência

Antígeno  $G_{M-2}$ : esse antígeno é o extrato metílico do antígeno  $G_{A-1}$  liofilizado. Para ser cromatografado, um pequeno volume foi evaporado e suspenso em solução salina.

As frações de 4 a 6 contêm toda a reatividade antigênica, não apresentando nenhum contaminante inerte.

Os títulos do antígeno e o do soro foram respectivamente de 2560 e 566, com um índice de reatividade específica de 4,52.

O resíduo do extrato metílico não mostrou nenhuma reatividade específica com o soro chagásico de referência, apresentando frações de contaminantes.

## DISCUSSÃO

O extrato aquoso de tripanosomas previamente tratados pelo benzeno, quando cromatografado em Sephadex G-200 apresentou nos eluatos de 5º a 9º capacidade de reagir especificamente com o soro chagásico de referência, nos testes de fixação do complemento, ao passo que os eluatos de 20º a 28º eram destituídos de qualquer atividade antigênica (Fig. 2).

A extração dos tripanosomas pela água, ainda deixa no sedimento, antígenos específicos, solúveis em metanol (antígeno  $G_{M-1}$ ). Os contaminantes inertes sorologicamente saem da coluna nas frações 28<sup>o</sup> a 38<sup>o</sup>, como mostra a Fig. 3.

O extrato metílico do antígeno aquoso  $G_{A-1}$  liofilizado, apresentou por cromatografia, reatividade específica nos eluatos das frações 3<sup>o</sup> a 7<sup>o</sup>, cuja mistura e concentração constituem um antígeno purificado e específico para a reação de fixação do complemento com o soro chagásico de referência, não tendo nenhum contaminante inerte sorologicamente (antígeno  $G_{M-2}$ ), como mostra a Fig. 4.

O extrato aquoso do sedimento tratado pelo metanol é desprovido de qualquer reatividade específica, apresentando, no entanto, alguns contaminantes nos eluatos das frações 42<sup>o</sup> a 144<sup>o</sup> (Fig. 5).

Os antígenos metílicos  $G_{M-1}$  e  $G_{M-2}$  foram misturados, concentrados por ultrafiltração e recromatografados em coluna de Sephadex G-200. O cromatograma mostra a reatividade específica nos eluatos de 5<sup>o</sup> a 15<sup>o</sup> frações, constituindo "um antígeno purificado", sem qualquer contaminante, apresentando um título de 3329 por fixação de complemento, enquanto o soro tinha título de 735, com um índice de capacidade reativa específica de 4,52 (Fig. 6).

A Tabela I mostra que embora os títulos dos antígenos  $G_{A-1}$ ,  $G_{M-1}$  e  $G_{M-2}$  apresentassem variações assim como os títulos do soro de referência, os índices de reatividade específica eram os mesmos, significando tratar-se qualitativamente dos mesmos antígenos, quer aquoso, quer metílicos.

## CONCLUSÕES

1. A extração pela água apenas remove parte dos antígenos presentes no *Trypanosoma cruzi*.
2. O sedimento dos tripanosomas extraídos pela água, contém a maior parte dos antígenos específicos solúveis em metanol.
3. Os antígenos específicos de *T. cruzi* estão presentes nos primeiros eluatos da coluna de Sephadex G-200, enquanto os contaminantes, sorologicamente inertes, se acumulam nas últimas frações eluídas.
4. Combinando e concentrando os eluatos com reatividade específica, pôde-se preparar um antígeno para as reações de fixação do complemento completamente livre de contaminantes inespecíficos.

## SUMMARY

The aqueous extract of *Trypanosoma cruzi*, previously treated by benzene, was filtered through a column of Sephadex G-200.

The eluted fractions were tested by complement-fixation with the chagasic reference serum. It was found that the CF antigens were eluted in the first fractions and the contaminants in the last ones. The aqueous antigen, when dried and extracted with metanol, showed a very high titer in the complement-fixation quantitative test. This antigen is free of contaminants and can be recommended for use in the serological test for the diagnosis of Chagas' disease.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.O. & FIFE, E.H.JR., 1976. Quantitatively standardized complement-fixation methods for critical evaluation of antigens prepared from *Trypanosoma cruzi*. Pan American Health Organization, Scientific Publication no. 319. 86 pgs.
- ALMEIDA, J.O.; CERISOLA, J.; CEDILLOS, R. & MAEKELT, G.A., 1972. Soro de referência internacional para moléstia de Chagas. Soc. Argentina de Parasitologia. Simposio internacional sobre enfermedad de Chagas. Pgs. 125-133.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 1976. Collaborative working Group for the Serological Diagnosis of Chagas' disease. Mimeografado.