

# ENSAIO CINÉTICO PARA REAÇÕES DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO NO SISTEMA MOLÉSTIA DE CHAGAS \*

José Oliveira de Almeida \*\* Therezinha A. Cunha \*\*\*  
Laurentina M. Souza \*\*\*

*Um ensaio para a avaliação da reatividade de antígenos de Trypanosoma cruzi, baseado na medida do complemento livre pelo tempo necessário à hemólise de 50% pôde ser aplicado na determinação da dose de máxima reatividade de antígenos, em reações com o sôro chagásico de referência.*

*Quando se avalia, por método cinético, as quantidades de complemento livre, em reações incubadas, por vários períodos de tempo e se projetam em logaritmos os tempos necessários para 50% de hemólise, contra os tempos de incubação, determinam-se pontos sobre uma reta, cujos parâmetros caracterizam a capacidade fixadora do complemento, dos complexos imunes.*

*O método cinético se recomenda pela sua precisão, fácil execução e rapidez, na comparação de antígenos, em reações de fixação do complemento.*

## INTRODUÇÃO

A fixação de complemento pelo complexo antígeno-anticorpo pode ser apreciada pela medida do complemento livre durante o período de incubação, desde que se conheça a quantidade de complemento inicialmente presente. A medida do complemento livre é feita pelo tempo necessário para 50% de hemólise de um volume estipulado de hemácias sensibilizadas(1,5).

Dessa forma, o ensaio de antígenos de *T. cruzi*, pode ser feita em reações com um sôro de referência para moléstia de Chagas, baseado nas seguintes premissas:

1º Reações de fixação de complemento feitas nas mesmas condições, e com os mesmos terão deixado livre a mesma quantidade de complemento que levará o mesmo tempo para hemólise de 50%.

2º Quando as reações são feitas, nas mesmas condições, mas com antígenos que diferem quali ou quantitativamente, as suas velocidades de hemólises são diferentes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Sôro Chagásico

Em todos os ensaios foi empregado o sôro de referência chagásico da Organização Panamericana de Saúde<sup>2</sup>. O sôro liofilizado foi reconstituído com água destilada e inativado a 56°C por 30 minutos.

### Antígenos de *T. cruzi*

Os antígenos foram preparados segundo a técnica descrita por ALMEIDA & FIFE<sup>2</sup>, de formas de cultura de *T. cruzi*, cepa Y, liofilizadas e mantidas em vácuo. Desse material foram preparados o antígeno aquoso (nº 4 de ALMEIDA & FIFE<sup>2</sup> e o antígeno metílico, segundo BARACCHINI ET AL<sup>3</sup>). Do antígeno aquoso nº 4 foi isolada uma fração em coluna de SEPHADEX G200. Todos os antígenos assim preparados provinham de um único lote de tripanosomas liofilizados.

\* Trabalho realizado com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. SIP 08/053.

\*\* Professor catedrático do Dep. de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Un. São Paulo.

\*\*\* Técnicas em Imunologia do Dep. de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Recebido para publicação em 15.1.1978.

### Complemento

O complemento liofilizado, reconstituído com água destilada, foi preservado pelo método de ALMEIDA & FIFE<sup>2</sup>. Todos os ensaios foram feitos com complemento de um único lote (n<sup>o</sup> 291).

### Diluyente, Hemácias e Hemolisina

O diluyente empregado era a solução salina boratada, adicionada de cálcio e magnésio<sup>4</sup>. O sistema hemolítico foi preparado de acordo com as especificações de ALMEIDA & FIFE<sup>2</sup>, empregando-se a hemolisina em dose de máxima sensibilização e as hemácias a 5%, aferidas fotometricamente.

### Métodos

A medida do grau de hemólise foi feita com as hemácias em suspensão, de acordo com ALMEIDA<sup>1</sup>. Padrões foram preparados para hemólises de 0% a 100%, medindo-se a transmissão em foto-colorímetro COLEMAN JUNIOR, em comprimento de onda de 580.

O volume da mistura de antígeno, soro e complemento era de 1,4ml e o das hemácias sensibilizadas de 0,6. Tão logo se juntavam as hemácias sensibilizadas, o tempo era medido por cronógrafo de precisão, mantendo-se o tubo (de 12 x 75mm) no adaptador construído para permitir a circulação de água a 37°C, mantendo-se, em todo o ensaio, a mesma temperatura.

Na determinação da dose de máxima reati-

vidade do antígeno, este é diluído em série geométrica, razão 0,5, e cada diluição é posta a reagir com o soro *chagásico de referência* e com excesso de complemento. Depois de 30 minutos de incubação a 37°C, juntam-se as hemácias sensibilizadas e determina-se o tempo necessário para 50% de hemólise, em foto-colorímetro.

Na medida da capacidade fixadora do complemento imune, a dose de máxima reatividade do antígeno é empregada com o soro *chagásico*, convenientemente diluído e em excesso de complemento. Tomam-se então alíquotas da mistura, mantida em banho-maria a 37°C, depois de 10, 30, 50, 70 minutos de incubação. Juntam-se as hemácias sensibilizadas e medem-se os tempos necessário para 50% de hemólise.

## RESULTADOS

### Determinação da Dose de Máxima Reatividade do Antígeno

O antígeno CDC 10-75 foi reconstituído com solução salina e diluído em série de 1/20 à 1/2560, distribuídos 0,5ml de cada diluição de antígeno a que se juntou soro *chagásico* diluído a 1/5 num volume de 0,5 ml. Depois de 5 minutos, juntou-se 1 ml de complemento diluído a 1/20. A incubação a 37°C foi de 10, 30 e 50 minutos. A 1,4ml da mistura foram adicionados 0,6ml de hemácias sensibilizadas e o tempo necessário para 50% de hemólise foi medido. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 1, FIGURA 1.

TABELA 1

Determinação da dose de máxima reatividade do antígeno

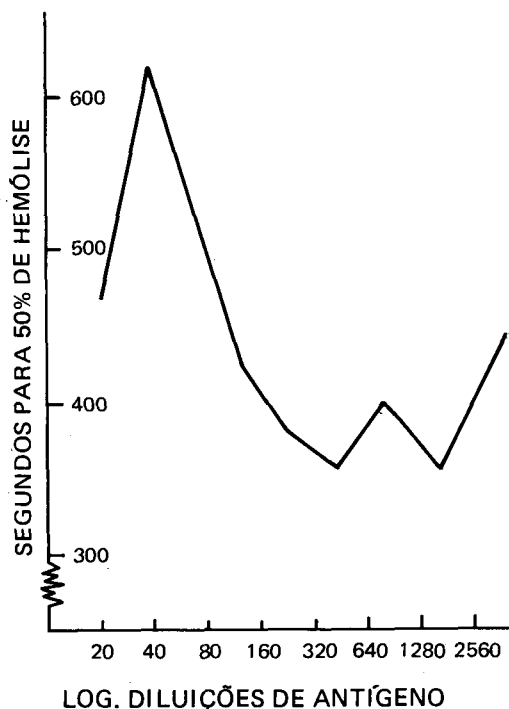
Tempo de incubação	Diluições do antígeno CDC 10-75 1/						
	20	40	80	160	320	640	1280
10 min.	307	351	298	288	280	320	296
30 min.	432	495	368	340	311	371	313
50 min.	580	610	430	377	352	398	350

A dose de máxima reatividade está na diluição a 1/40.

O gráfico 1 representa os dados obtidos depois de 50 minutos de incubação.

FIGURA 1

ANTÍGENO DE T. CRUZI C. D. C. 10 - 75



Verificou-se que na diluição de 1/40 o complexo imune fixou mais complemento que os outros, e daí sobrar menos complemento livre, denunciado pelo maior tempo necessário para 50% de hemólise.

Podemos notar que o excesso de antígeno (1/20) exigiu menor tempo para hemólise, sig-

nificando menor fixação de complemento, por um fenômeno de zona.

#### Determinação Cinética da Atividade dos Antígenos

Três antígenos foram comparados em provas de cinética, em reações com doses de máxima reatividade, mantendo-se constantes as quantidades de soro chagásico e de complemento. O antígeno metílico<sup>3</sup> foi diluído a 1/160, o antígeno aquoso a 1/40 e a fração 1 do antígeno aquoso a 1/20.

Foram postos a reagir, 0,5ml do antígeno diluído para ter a máxima reatividade, 0,5ml da diluição a 1/5 do soro chagásico.

Depois de 5 minutos, juntou-se complemento (2ml da diluição a 1/20), complementando-se o volume para 5ml. Dessa mistura, mantida a 37°C, foram retirados 1,4ml a que se juntaram 0,6ml de hemácias sensibilizadas, depois de 10, 30, 50 e 70 minutos. Mediram-se os tempos necessário para 50% de hemólise. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 2.

Quando se projetam os logaritmos dos tempos necessário para 50% de hemólise, em ordenadas, contra os tempos de incubação a 37°C, determinam-se pontos sobre uma linha de regressão, cujos parâmetros definem o antígeno.

#### DISCUSSÃO

Na determinação da reatividade de antígeno, a reação que exige mais tempo para hemó-

TABELA 2

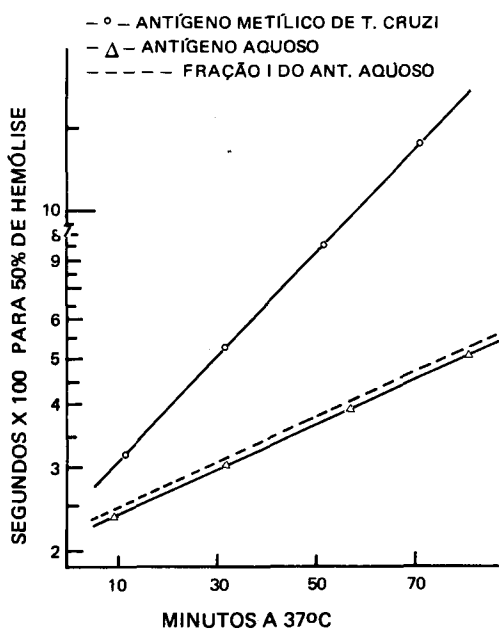
Tempos necessários para 50% de hemólise em reações incubadas a 37°C por 10, 30, 50 e 70 minutos

Antígeno de <i>T. cruzi</i>	Tempo de incubação a 37°C, em minutos			
	10	30	50	70
	Tempo em segundos necessários para 50% de hemólise			
Metílico nº 761213	310	501	810	1405
Aquoso 760130	240	290	352	425
Fração I	252	306	360	452

A figura 2 apresenta as linhas de regressão projetadas em papel semi-logarítmico.

FIGURA 2

## CINÉTICA DA FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO



lise de 50%, indica a dose de máxima reatividade da antígeno, que na experiência da TABELA 1 corresponde à diluição de 1/40 para o antígeno CDC 10-75.

Na comparação de antígenos, pelo método cinético, as linhas de regressão no sistema logarítmico de tempo contra tempo de incubação, podem se apresentar superpostas, paralelas ou divergentes.

Antígenos iguais, em concentração e composição, apresentam linhas superpostas, como mostra a FIGURA 2, para os antígenos aquoso e a fração 1. A fração, separada do antígeno aquoso, por cromatografia em SEPHADEX G-200, reagiu da mesma forma que o antígeno aquoso, total, caracterizando a especificidade da fração 1, com o soro chagásico de referência.

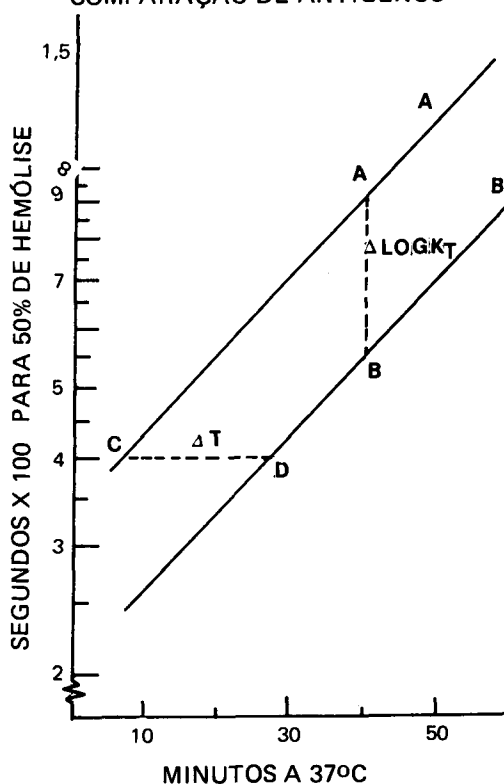
Já o antígeno metálico, a sua linha de regressão é divergente da do aquoso. Dos 3 antígenos experimentados nesse ensaio, o metálico apresentou maior reatividade que os aquosos.

A interpretação de reações com linhas paralelas, como na FIGURA 3, deve ser feita considerando:

1º As retas são paralelas no sentido das ordenadas (de A' a B'), sendo essa diferença, em logaritmos, indicando então quantas vezes o antígeno A fixa mais complemento que o antígeno B, em um mesmo tempo de incubação a 37°C.

FIGURA 3

## COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS



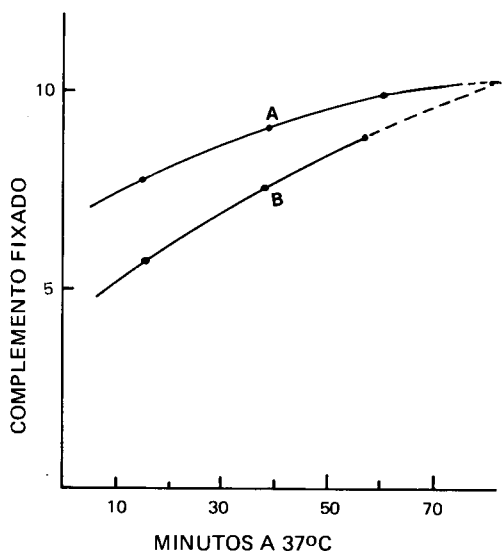
2º As retas são paralelas no sentido das abscissas. A diferença entre C e D (FIGURA 3) corresponde aproximadamente à diferença entre 30 e 10 minutos de incubação. Ora, isso significa que o antígeno A em 10 minutos já fixou complemento na mesma quantidade que o antígeno B em 30 minutos, tendo assim um atraso de 20 minutos. Assim as reações com o antígeno B devem ser incubadas 20 minutos a mais que aquela do antígeno A.

De acordo com a relação entre tempo de hemólise e concentração de complemento (1, 5), podem ser calculadas as quantidades de complemento livres, durante os vários períodos de incubação, determinando-se então as quantidades de complemento fixadas, como mostra a FIGURA 4. Pode-se constatar que as duas curvas vão se aproximando de um ponto comum, correspondente a 70 minutos de incubação. Esse tipo de reação somente ocorre quando os antígenos diferem somente em sua concentração, não em sua composição.

Quando, no entanto, as linhas se mostram divergentes, como exemplificado na FIGURA 5, em A e C, denunciando diferenças qualitativas entre os antígenos, tal como ocorre na

FIGURA 4

COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS



Calculando-se as quantidades de complemento livre, depois dos vários tempos de incubação, e aquelas fixadas, e projetando esses valores em ordenadas (complemento fixado) e em abscissas os tempos de 37°C, verifica-se que as linhas são paralelas, indicando menor reatividade do antígeno C em relação ao antígeno A: (FIGURA 6).

FIGURA 5

COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS

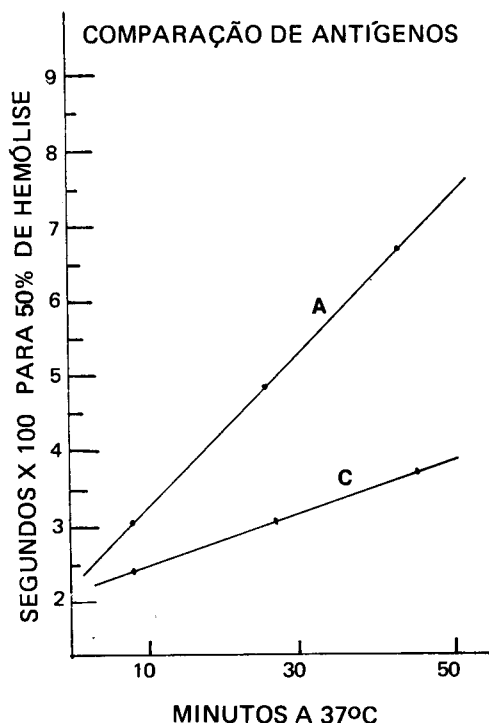
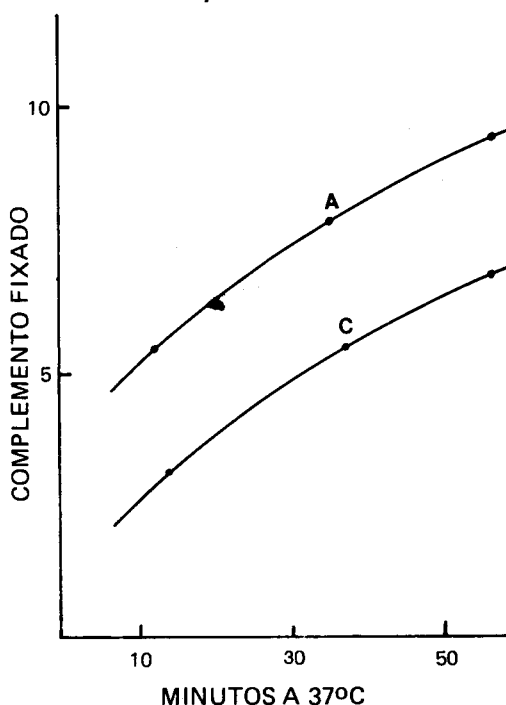


FIGURA 6

COMPARAÇÃO DE ANTÍGENOS



Quando um mesmo antígeno é ensaiado em várias diluições, suas linhas são paralelas, indicando tratar-se de reações com diversa intensidade, mas possíveis de serem igualadas, se o tempo de incubação for suficientemente prolongado (FIGURA 7).

As linhas de regressão traçadas pelos pontos determinados pelos logaritmos dos tempos necessários para 50% de hemólise (em ordenadas) e pelos tempos de incubação (em abscissas) traduzem as reações exponenciais, expressas como:

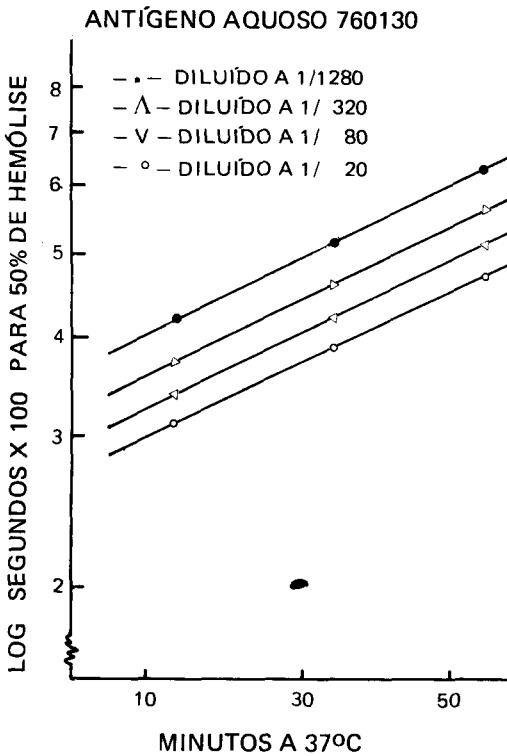
$$y = a (10)^{bx}$$

onde y = tempo necessário para 50% de hemólise

x = tempo de incubação

comparação do antígeno aquoso com o antígeno metálico. Nesse caso, prolongando-se o tempo de incubação, não se igualam as reações como ocorre quando as linhas são paralelas.

FIGURA 7



a = intercessão da linha com o eixo das ordenadas

b = inclinação da linha de regressão.

Da expressão

$$\log y = \log a + bx$$

determinam-se os valores de  $a$  e de  $b$  como os parâmetros que caracterizam as reações de fixação de complemento.

Aplicando o método cinético ao estudo de vários antígenos, os seguintes resultados foram obtidos TABELA 3

Podemos apreciar, pelos valores do parâmetro  $b$ , que os antígenos BW 89 a BW 105 não diferem entre si, de modo significativo. Ao contrário, há bastante diferença entre o antígeno metílico 761213 e os antígenos aquosos CDC e BW. Os antígenos aquosos 760130 e 760825 apresentam reatividade comparável.

### SUMMARY

*An assay for the evaluation of the antigens reactivity, based in the determination of free complement by the time required for 50% hemolysis, could be applied for detection of the maximally reactive dose of T. cruzi antigens, in reactions with the reference Chagasic serum.*

*When the logarithms of the time required for 50% hemolysis are plotted against the time of incubation, the points describe a regression line, whose parameters characterized the combining capacity of the immune-complexes, in reactions with complement.*

*The kinetic method is recommended for the preliminary evaluation of T. cruzi antigens, for its precision and reliability.*

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J.O.: o tempo de hemólise nas reações de fixação do complemento. Relações quantitativas entre tem-

TABELA 3

Comparação da reatividade de antígenos de *T. cruzi* pelos valores de seus parâmetros no ensaio cinético, com o soro Chagásico.

ANTÍGENO	DILUIÇÃO	a	b	R	Observação
Aq. B.W.89	1/20	91	0,0027	0,99	Os parâmetros $a$ e $b$ foram calculados pelo método dos mínimos quadrados.
Aq. B.W.105	1/20	99	0,0030	0,97	
Aq. C.D.C.10-75	1/20	91	0,0034	0,97	
Aq. 760130	1/20	91	0,0041	0,95	
Aq. 760825	1/20	100	0,0045	0,98	
Met. 761213	1/160	96	0,0067	0,99	

Aq = antígeno aquoso. Met. = antígeno metílico.  $a$  e  $b$  = parâmetros da equação  $y = a(10)^{bx}$ . R = coeficiente de correlação.

po de hemólise e concentração de complemento. *Rev. Brasil. Biol.* 9: 249-260, 1964

2. ALMEIDA, J.O. & FIFE H.E. Jr.: Quantitatively Standardized Complement-Fixation Methods for Critical Evaluation of Antigens Prepared from *Trypanosoma cruzi*. Scientific Publication n<sup>o</sup> 319. Panamerican Health Organization. 86 pgs. 1976
3. BARACCHINI, O. COSTA, A., & CARLONI, J.: Emprego do calor e do me-

tanol no preparo de antígeno de *Trypanosoma cruzi*. *O Hospital, Rio de Janeiro*, 68: 193-199, 1965

4. FIFE, E.H. Jr. & MUSHEL, L.H.: Influence of magnesium and calcium ions on the hemolytic activity and stability of complement. *J. Immunol.*, 97: 688-695, 1961
5. PLESCIA, O.J., AMIRAIAN, K. HEIDELBERGER, M.: A kinetic method for the titration of complement. *Arch. Biochem.*, 62: 346-354, 1956