

COMPARAÇÃO DE ANTIGENOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* PARA REAÇÕES QUANTITATIVAS DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO

I. Linearidade entre complexo imune e complemento

Astolpho Ferraz de SIQUEIRA (1)

RESUMO

Pelo método da isofixação foram determinadas as relações lineares entre complemento, soro chagásico e antígeno de *T. cruzi*. Foram satisfeitas as condições necessárias para a determinação dos títulos "por acréscimo", seja do soro, seja do antígeno e por consequência a da relação entre eles. Da comparação de tais parâmetros em várias condições foram obtidos os seguintes resultados:

1) Os títulos dos antígenos preparados com tripanosomas cultivados em época mais recente foram ligeiramente superiores aos dos antígenos preparados com tripanosomas mais antigos.

2) Os títulos do soro, determinados em presença de antígenos de tripanosomas mais novos, foram pouco superiores aos títulos determinados em presença de antígenos preparados com tripanosomas mais velhos.

3) A capacidade fixadora dos complexos antígeno-anticorpo decresceu progressivamente em dias sucessivos, mas a capacidade reativa específica que é dada pela relação entre os títulos do soro e os títulos do antígeno, mostrou-se constante no período da observação.

INTRODUÇÃO

Métodos quantitativos têm permitido avaliar a capacidade fixadora do complemento, de complexos imunes, em termos da relação linear entre complemento e soro ou entre complemento e antígeno.

Condições para a proporcionalidade entre complexo imune e complemento foram estabelecidas por WADSWORTH, MALTANER & MALTANER⁹ em reações entre soro imune tuberculoso e bacilo da tuberculose, havendo proporcionalidade entre soro e complemento

quando a reação era feita em excesso de antígeno e entre antígeno e complemento se o soro estava em excesso.

As relações lineares entre complemento, soro chagásico e antígeno de *T. cruzi* foram estabelecidas por ALMEIDA, FREITAS & SIQUEIRA³. A reatividade do complexo imune, em termos de soro ou de antígeno, pôde ser expressa pela capacidade fixadora do complemento, bastando que um dos elementos estivesse também em excesso relativo. Estas re-

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Univ. de São Paulo — Dept. Parasitologia (Prof. M. P. Barretto).

(1) Professor Assistente (Docente-livre).

Nota — Os dados deste trabalho constituíram parte da tese de docência defendida pelo autor em 1963.

lações proporcionais ou títulos por acréscimo dependeram das condições da reação como a qualidade do complemento e outros fatores não determinados, dificultando a sua reprodução. A análise das variações observadas por êstes autores mostrou que elas ocorriam tanto na zona de excesso de sôro (dosagem do antígeno) quanto na zona de excesso de antígeno (dosagem do sôro). Como estas variações se davam sempre num mesmo sentido, o quociente entre o título do antígeno e o título do sôro era sempre constante. Êste quociente traduziu a capacidade de reatividade específica entre antígeno e anticorpo e não dependeu da quantidade de complemento fixado, sendo portanto a medida do poder de combinação entre o antígeno e seu anticorpo. Sômente pelo conhecimento destas relações é que se entende a reprodutibilidade do título do sôro ou do antígeno, por técnica de fixação do complemento.

A nossa experiência tem mostrado que as condições de proporcionalidade necessárias para a determinação dos títulos por acréscimo nem sempre podem ser satisfeitas. O presente trabalho mostra as condições mais adequadas para o estudo de antígenos de *T. cruzi* por método quantitativo de fixação do complemento.

MATERIAL E MÉTODOS

Os elementos da reação, complemento, hemolisina e hemácias de carneiro foram preparados e padronizados de acôrdo com a técnica de FREITAS & ALMEIDA⁵. A técnica usada foi a de FREITAS⁴, exceto no que diz respeito às doses de complemento que foram usadas sem o acréscimo de 20%.

Sôro reagente — Os soros utilizados foram reagentes para moléstia de Chagas, com títulos maiores que 3 pela técnica de FREITAS & ALMEIDA⁵. Sem terem sofrido inativação anterior, eram distribuídos em ampolas e mantidos congelados a -20° C. Na ocasião de usar, o sôro era degelado em temperatura ambiente, homogeneizado por agitação cuidadosa e inativado em banho-maria a 56° C por 30 minutos. Quando necessário, eram diluídos em solução de NaCl a 0,85% por ocasião de usar.

Antígeno — Os antígenos foram preparados pela técnica de FREITAS & ALMEIDA⁵. Mantidos em geladeira, no momento de usar eram borbulhados com ar para se livrarem do clorofórmio e diluídos em solução de NaCl a 0,85%.

Notações usadas — As seguintes notações, propostas por THOMPSON & col.⁷, foram usadas para exposição e discussão dos resultados:

x — complemento total no tubo de reação.

x' — complemento juntado à mistura de reagentes.

y — grau de hemólise obtida.

K — x quando y é igual a 0,5 (quantidade de complemento necessária para dar 50% de hemólise nas condições da reação).

K' — x' quando y é igual a 0,5 (quantidade total de complemento encontrada ou estimada que deveria ser introduzida nas mesmas condições para dar 50% de hemólise).

$K'_{S,A}$ — K' para a reação com sôro e quantidade ótima de antígeno.

$K'_{A,S}$ — K' para a reação com antígeno e quantidade ótima de sôro.

T_S — título do sôro.

T_A — título do antígeno.

h — inclinação da linha de regressão no sistema logaritmo de complemento-logito de hemólise.

Método — O método da isofixação, desenvolvido por ALMEIDA¹, foi usado para o estudo das relações entre complemento, antígeno e anticorpo, pois as condições para a titulação do antígeno ou do anticorpo são facilmente determinadas com o auxílio das curvas iso-hemolíticas. Estas linhas podem ser construídas por meio de reações entre diferentes concentrações de antígeno e várias quantidades de sôro, em presença de doses múltiplas de complemento. As quantidades de sôro e antígeno que formam complexos dotados da mesma capacidade fixadora são projetadas respectivamente em abscissas e ordenadas. Os pontos escolhidos para a pro-

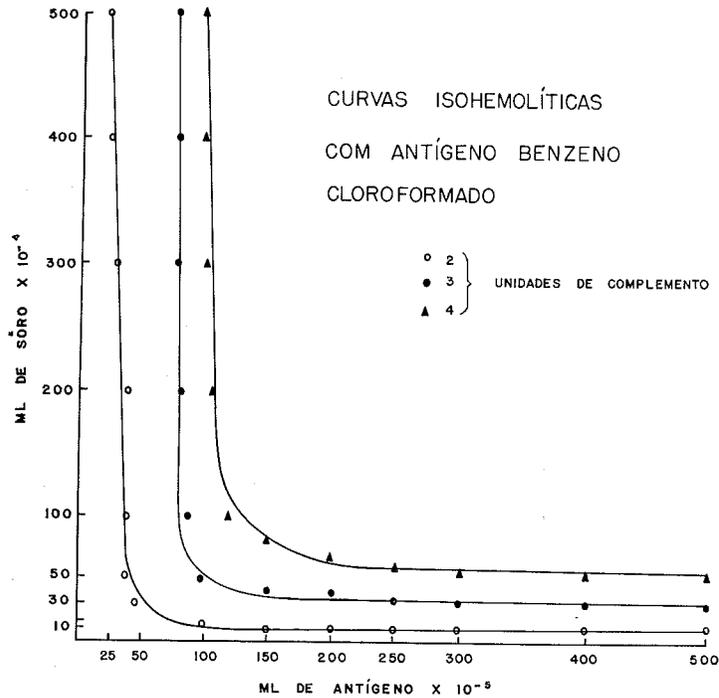


Fig. 1

jeção correspondem a 50% de hemólise; quando êstes não forem encontrados na reação, poderão ser calculados de qualquer hemólise parcial obtida, pela projeção dos logaritmos das quantidades de sôro ou de antígeno contra os logitos das hemólises parciais obtidas. Assim, por exemplo, a Figura 1 que corresponde aos resultados apresentados no Quadro I, mostra as curvas iso-hemolíticas que representam as reações entre o antígeno benzeno-cloroformado de FREITAS & ALMEIDA⁵ e uma mistura de soros reagentes (sôro 81155), em presença de 2, 3 e 4 unidades de complemento.

Os ramos verticais das curvas representadas na Figura 1 correspondem às reações em que a quantidade de complemento fixado dependeu principalmente dos volumes de antígeno presentes na mistura antígeno-anticorpo. Nos tubos que contêm volumes de sôro maiores que 0,01 ml, a quantidade de complemento fixado é praticamente a mesma em

todos êles, mostrando que nestas condições uma das variáveis, o sôro, passa a funcionar como elemento constante. Nesta situação, a capacidade do antígeno em formar complexos fixadores poderá ser estimada pela projeção de antígeno contra complemento, o seu título sendo determinado pela relação:

$$T_A = \Delta K'_{S,A} / \Delta \text{antígeno}$$

Os ramos horizontais das curvas são assintoticamente paralelos ao eixo do antígeno. As condições aqui são apropriadas para a titulação do sôro porque a quantidade de complemento fixado pelos complexos que contêm mais de 0,002 ml de antígeno depende quase que exclusivamente do volume de sôro presente na mistura e o antígeno, em excesso, poderá ser considerado como o elemento constante. O título do sôro poderá então ser determinado pela relação:

$$T_S = \Delta K'_{A,S} / \Delta \text{sôro}$$

SIQUEIRA, A. F. de — Comparação de antígenos de *Trypanosoma cruzi* para reações quantitativas de fixação do complemento; I. Linearidade entre complexo imune e complemento. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6:101-110, 1964.

QUADRO I

Reações com sôro (81155) e antígeno benzeno cloroformado em presença de 2, 3 e 4 unidades de complemento (nº 34, $K_0 = 0,00166$ e $h_0 = 0,17$)

ml de sôro	ml de antígeno					
	0,00500	0,00250	0,00100	0,00050	0,00025	0,00010
	Hemólise % com 2 unidades de complemento					
0,075	0	0	0	5	10	60
0,050	0	0	0	5	10	80
0,040	0	0	5	10	20	90
0,030	0	5	10	10	30	95
0,020	30	35	45	45	50	95
0,010	65	65	80	80	85	100
Hemólise % com 3 unidades de complemento						
0,075	0	0	0	10	65	100
0,050	0	0	5	20	80	100
0,040	10	15	25	45	90	100
0,030	20	40	50	60	95	100
0,020	55	60	65	85	100	100
Hemólise % com 4 unidades de complemento						
0,075	5	10	15	45	90	100
0,050	10	20	30	70	100	100
0,040	30	45	50	85	100	100
0,030	75	80	80	95	100	100
Contrôles:						
Do antígeno, com 2 unidades de complemento						
—	90	100	100	100	100	100
Do complemento com		Do sôro com		Das hemácias sensibilizadas		
1 u	2 u	1 u	2 u			
5	100	30	95			

Para a determinação dos títulos, as quantidades de complexo, em termos de soro ou de antígeno, que fixam complemento deixando o suficiente para 50% de hemólise, são projetadas contra as quantidades de complemento inicialmente presente. Para calcular tais quantidades de complexo basta projetar os logaritmos das quantidades de soro ou de antígeno contra os logitos das hemólises parciais obtidas. Em um e em outro caso, as linhas de regressão poderão ser calculadas pelo método dos quadrados mínimos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparação de antígenos preparados com tripanosomas cultivados em épocas diferentes

— Com a mesma cepa de tripanosomas, mas cultivados em outubro de 1959 e em abril de 1962, foram preparados quatro antígenos, dois com o pó de tripanosomas de 1959 e dois com os tripanosomas de 1962. Estes tripanosomas, depois de congelados, eram secados e guardados em vácuo. As observações constaram da determinação dos títulos

dos antígenos em excesso de um soro escolhido e dos títulos deste soro em excesso de antígenos. O soro usado (12585) era conservado congelado a -20°C em ampolas fechadas. As reações foram feitas em presença de 2, 3 e 4 unidades de complemento. As doses de excesso dos elementos foram de 0,05 ml para o soro e 0,005 ml para os antígenos. Em vista da concordância dos resultados obtidos com os antígenos preparados do mesmo pó, foram juntados os seus valores para o cálculo das linhas de regressão. Desta forma, os resultados se referem ao antígeno A, preparado com o pó de 1959 e ao antígeno B, preparado com o pó de 1962. As linhas de regressão calculadas por projeção das quantidades de antígeno ou de soro contra os $K'_{S,A}$ e $K'_{A,S}$ respectivos e que representam os títulos dos antígenos ou os títulos do soro, encontram-se nas Figuras 2, 3, 4 e 5, que correspondem às reações dos dias 15-5-1962, 24-5-1962, 28-5-1962 e 5-6-1962 respectivamente. No Quadro II são apresentados os valores numéricos dos títulos dos antígenos e do soro, assim como as relações T_A / T_S

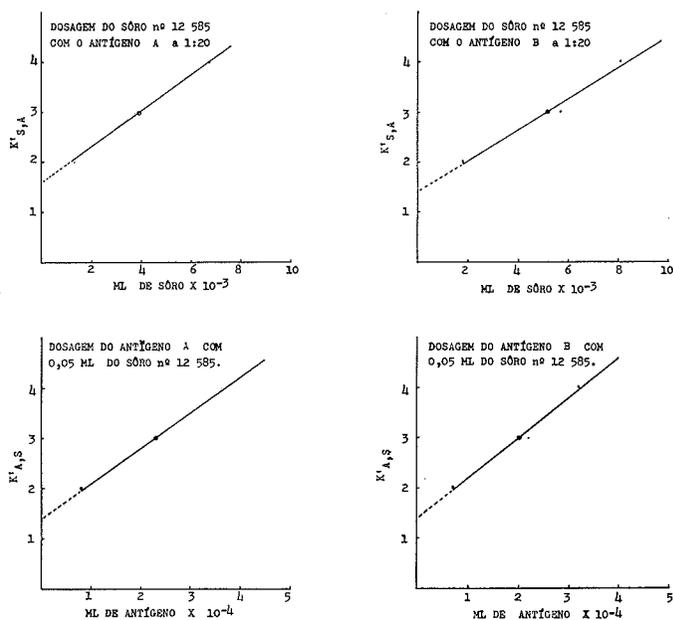


Fig. 2 — Gráficos das dosagens do dia 15-5-1962.

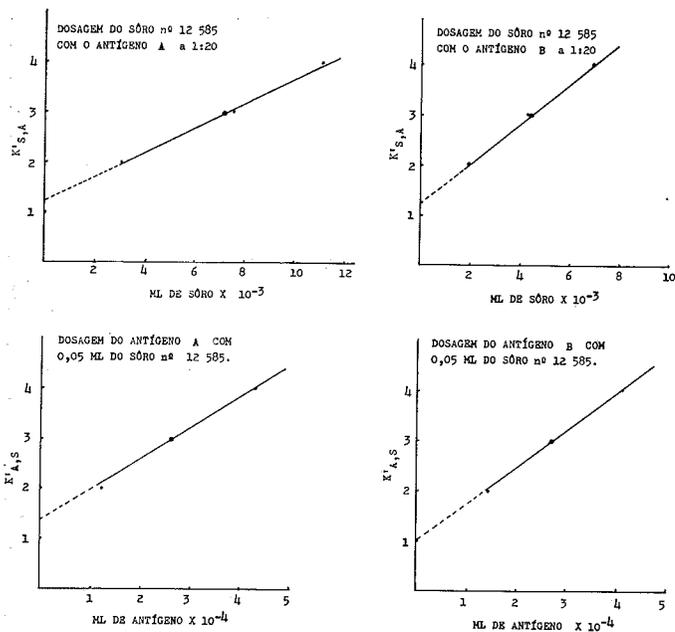


Fig. 3 — Gráficos das dosagens do dia 24-5-1962.

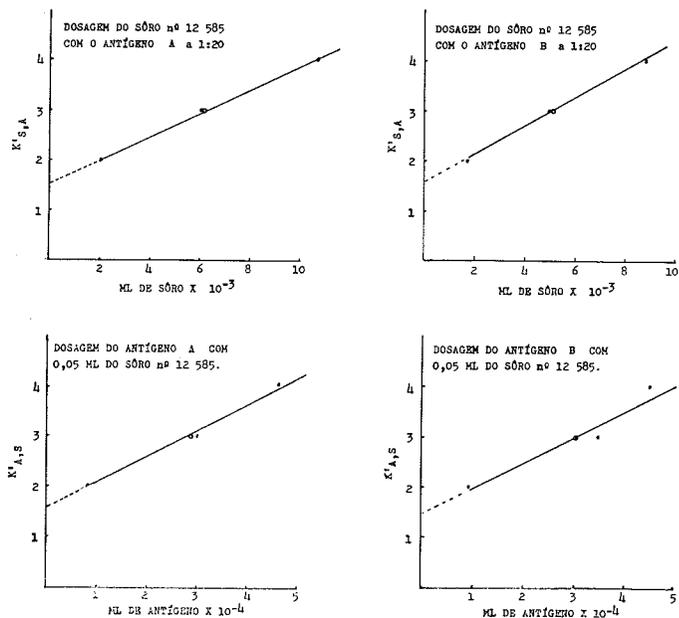


Fig. 4 — Gráficos das dosagens do dia 28-5-1962.

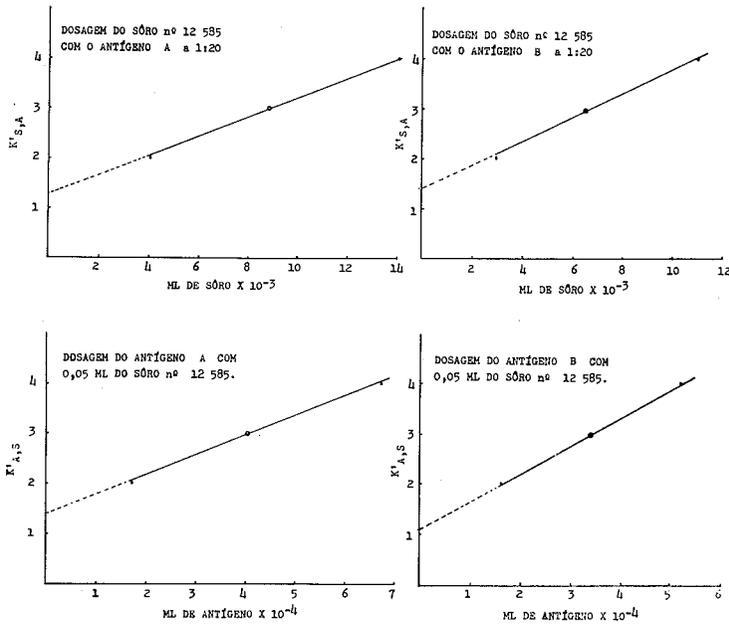


Fig. 5 — Gráficos das dosagens do dia 5-6-1962.

QUADRO II

Capacidade de reação entre o soro 12585 e os antígenos A e B

Data	Títulos				Quociente		Complemento nº
	Dos antígenos		Do soro com os antígenos		T_{AA}/T_{SA}	T_{AB}/T_{SB}	
	A	B	A	B			
15-5-1962	7.000	7.929	369	317	19,0	25,0	88
24-5-1962	6.275	7.377	243	400	25,8	18,4	88
28-5-1962	5.263	5.633	227	286	23,0	19,7	88
5-6-1962	4.000	5.555	200	247	20,0	22,5	89

T_{AA} e T_{AB} = títulos dos antígenos A e B.

T_{SA} e T_{SB} = títulos do soro com os antígenos A e B.

Pelos gráficos apresentados verificamos que nem sempre os pontos projetados estão sobre a reta traçada. No entanto, a pequena dispersão dos mesmos em torno das retas teóricas permite que elas sejam tomadas como re-

presentativas dos títulos. Quando os antígenos foram dosados em presença de excesso de soro (dose de reatividade paralela), aos acréscimos de antígeno houve correspondência de aumentos proporcionais dos $K'_{A,S}$.

Os títulos dos antígenos decresceram progressivamente durante o período das observações e a mudança do complemento no dia 5-2-1962 não modificou este comportamento. Os títulos dos antígenos preparados com tripanosomas cultivados em 1962 foram sempre ligeiramente superiores aos dos antígenos preparados em 1959. Os títulos do sôro também foram determinados quando dosados em excesso de cada um dos antígenos. Os títulos do sôro também decresceram sucessivamente e foram maiores quando a dosagem foi feita em presença dos antígenos preparados com tripanosomas mais novos.

As variações que ocorreram em dias sucessivos nos títulos dos antígenos e do sôro poderiam não ter outro significado além daquele ligado às condições da reação como mostraram ALMEIDA, FREITAS & SIQUEIRA³. Tais variações já tinham sido verificadas nos sistemas pneumococo por RICE⁶, tifo epidêmico por VARLEY & WEEDON⁸ e febre Q por WOLFE & KORNFELD¹⁰. Entretanto, as variações aqui observadas tiveram um sentido único, os títulos decresceram progressivamente e isto nos leva a dar um significado diferente ao fato observado. Os resultados indicam que os complexos perderam gradativamente

uma parte do poder fixador e esta perda deve ter ocorrido por deterioração do antígeno, pois o sôro, conservado congelado por vários meses, poderá ser considerado estável, pelo menos no pequeno período em que foram feitas as observações. O fato de os títulos do sôro terem decrescido está ligado ao efeito dos antígenos e mostra a importância da dosagem do sôro quando se quer estudar o antígeno, pois é na condição de excesso deste que se revelam as suas qualidades e defeitos. Os quocientes entre os títulos dos antígenos e os títulos do sôro mostraram-se praticamente constantes, evidenciando que a capacidade de reação específica entre antígeno e anticorpo independe do poder fixador do complexo, como mostraram ALMEIDA, FREITAS & SIQUEIRA³.

Procurando condições mais satisfatórias para a titulação dos antígenos, foram feitas novas observações com 4 doses iniciais de complemento, de maneira a permitir a adição de mais um ponto para a determinação das linhas de regressão. Assim, foram executadas reações entre os 4 antígenos e o mesmo sôro, em presença de 2, 3, 4 e 5 unidades de complemento, cujos resultados se encontram na Figura 6.

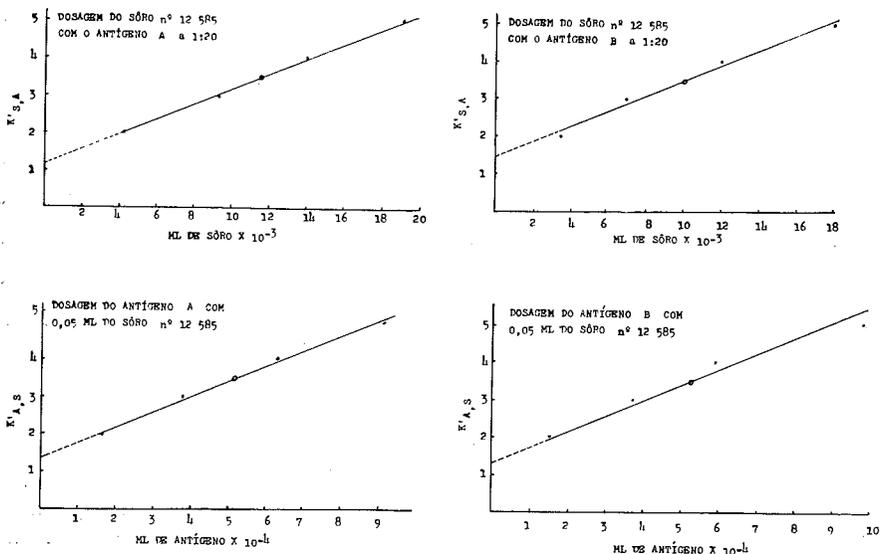


Fig. 6 — Gráficos das dosagens com 2, 3, 4 e 5 unidades de complemento.

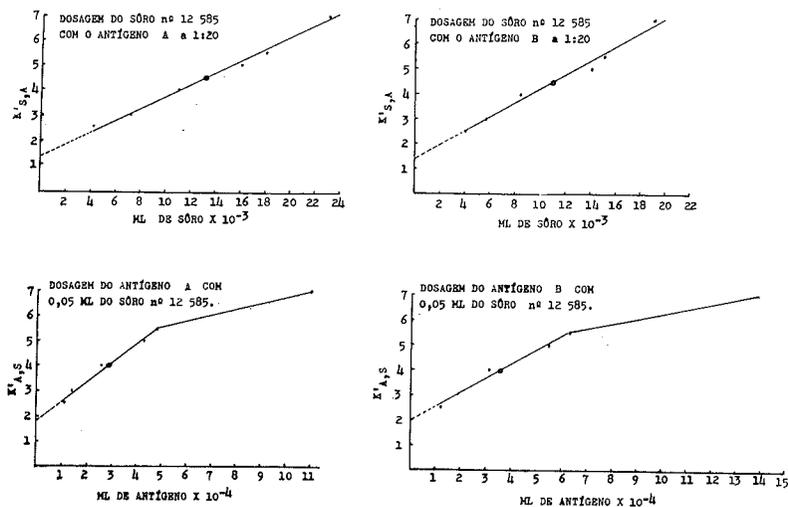


Fig. 7 — Gráficos das dosagens com 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 5,5 e 7,0 unidades de complemento.

A observação dos gráficos da Figura 6 mostra que, com o uso das 4 doses de complemento, as relações complemento-antígeno e complemento-sêro se mantiveram lineares. Novas tentativas foram feitas com o fim de experimentar maior número de doses para a determinação dos títulos por acréscimo. Desta feita foram usados 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 5,5 e 7 unidades de complemento. Os resultados correspondentes estão na Figura 7.

Os resultados mostram que o sêro 12585 pôde ser dosado em excesso dos antígenos A e B, havendo linearidade nas relações complemento-complexo, em termos de sêro, até o ponto correspondente a 7 unidades de complemento inicialmente presente. No entanto, quando foi tentada a titulação dos dois antígenos em presença de excesso do sêro em questão, a linearidade nas relações complemento-complexo, em termos de antígeno, só foi conseguida até 5,5 unidades de complemento inicialmente presente. O ponto determinado com 7 unidades foge completamente da linha traçada pelos pontos anteriores. Êste fato evidencia que a quantidade de sêro usada foi insuficiente para formar complexos capazes de fixar complemento na mesma proporção que vinha mantendo até com 5,5 unidades. Como não há conveniência em aumentar o volume de sêro na reação, um sêro

mais potente deveria ser usado para que se conseguisse a linearidade até com 7 unidades de complemento inicialmente presente.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitem as seguintes considerações a respeito da aplicação do método em estudo: Na comparação dos antígenos preparados a partir de tripanosomas da mesma cepa, mas diferindo pelo tempo de conservação, o método permitiu algumas indicações preciosas com respeito à conservação do pó de tripanosomas e à estabilidade dos antígenos usados. Por outro lado permitiu também verificar a reprodutibilidade da capacidade reativa específica entre antígeno e anticorpo. Outra consideração interessante, diz respeito à possibilidade de serem melhoradas as condições para a determinação das linhas de regressão, seja aumentando o número de doses para a determinação dos pontos, seja aumentando o espaçamento entre as mesmas. De qualquer forma, o método sofre as restrições devidas ao desconhecimento dos seus limites de variação, limites êstes que provavelmente poderão vir a ser determinados para as dosagens de antígenos com um determinado sêro padrão.

SUMMARY

Comparison of Typanosoma cruzi antigens for quantitative complement fixation tests; I. Linearity between immune complex and complement.

By the isofixation curves the linear relations between complement, chagasic patients serum, and trypanosome antigen were determined. The proper conditions for serum and antigen slope-ratio titration were attended, and consequently their relationship was settled. By comparing such parameters in several experimental conditions it was found that:

1. The titers of the antigens which were prepared from more recently cultivated trypanosomes were slightly higher than those prepared from older cultures.

2. The titers of the serum, as determined with antigens prepared from more recent cultures, were slightly higher than those prepared from older cultures.

3. The fixing-capacity of the antigen-antibody complexes decreased progressively everyday but the specific reactive capacity, given by the antigen/serum ratio, was constant all along the periods of observation.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, J. O. — Isofixation curves as a method of standardizing quantitative complement-fixation tests. *J. Immunol.* 76:259-263, 1956.
2. ALMEIDA, J. O. — Técnica da reação de Wassermann quantitativa. Emprêgo do colorímetro foto-elétrico na padronização dos reagentes e na leitura da reação. *Hospital*, Rio de Janeiro 37:847-898, 1950.
3. ALMEIDA, J. O.; FREITAS, J. L. P. & SIQUEIRA, A. F. — Capacidade reativa específica do antígeno com anticorpo em reações de fixação do complemento para moléstia de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 1:266-272, 1959.
4. FREITAS, J. L. P. — Reação de fixação do complemento para diagnóstico da moléstia de Chagas pela técnica quantitativa. *Arch. Hig. Saúde Pública*, São Paulo 16:55-94, 1951.
5. FREITAS, J. L. P. & ALMEIDA, J. O. — Nova técnica de fixação do complemento para moléstia de Chagas. *Hospital*, Rio de Janeiro 35:787-800, 1949.
6. RICE, C. E. — Studies of antipneumococcal serum. II. Complement-fixing activity of antipneumococcal rabbit-serum with homologous type-specific carbohydrate. Technic of the test. General quantitative relationships among reagents. *J. Immunol.* 43:129-148, 1942.
7. THOMPSON, W. R.; RICE, C. E.; MALTANER, E. & MALTANER, F. — Some fundamental notions in estimation of complement fixation. I. General relations and a proposed uniform notation. *J. Immunol.* 62:353-361, 1949.
8. VARLEY, F. M. & WEEDON, F. R. — Application of a quantitative complement-fixation test to the serum diagnosis of thyphus fever. *J. Immunol.* 51:139-146, 1947.
9. WADSWORTH, A.; MALTANER, E. & MALTANER, F. — The quantitative determination of the fixation of complement by immune serum and antigen. *J. Immunol.* 21: 313-340, 1931.
10. WOLFE, M. D. & KORNFELD, L. — The application of a quantitative complement-fixation method to a study of Q fever strain differentiation. *J. Immunol.* 61:297-306, 1948.

Recebido para publicação em 26 dezembro 1963.