

## FRACIONAMENTO DE EXTRATO METILICO DE BCG E PURIFICAÇÃO DE FRAÇÕES ANTIGÊNICAS RELACIONADAS COM *LEISHMANIA DONOVANI*

Wilson MAYRINK (1), Carlos Alberto COSTA (2), Ney José FERREIRA GOMES (3), Giovanni GAZZINELLI (4) e Heloisa BRANDÃO FEDERMAN (5)

### RESUMO

Demonstrou-se no extrato metílico de BCG frações antigênicas com determinantes comuns a *L. donovani*. As referidas frações foram obtidas por cromatografia em coluna de sílica e recromatografia em camada delgada. A análise do material ativo revelou a inexistência de fósforo e presença de nitrogênio e polissacarídeo. Os dados apresentados em conjunto sugerem tratar-se de complexo lipopolissacarídico.

### INTRODUÇÃO

Em 1936, BIER & PLANET<sup>1</sup> observaram que o antígeno W.K.K., extraído de culturas de *Streptrix leproides*, era capaz de fixar complemento com soros de portadores de hanseníase, pêfigo e leishmaniose tegumentar. Seus dados foram confirmados pelas observações de LOWE & GERVAK<sup>2</sup>, DHARMENDRA & BOSÉ<sup>3</sup> utilizando antígenos de bacilos álcool-ácido-resistentes para fixação do complemento em soros de portadores de calazar, encontraram maior percentagem de positividade com o antígeno preparado de bacilo Lheras. A sensibilidade e especificidade deste antígeno foi revista por NUSSENZWEIG<sup>4</sup>.

A imunidade cruzada entre o *Mycobacterium tuberculosis* e a *Leishmania donovani* foi evidenciada experimentalmente por KONOPKA, GOBLE & LEWIS<sup>5</sup>. Estes Autores observaram que camundongos infectados por via intravenosa com *L. donovani* apresentavam resistência às subseqüentes infecções com *M. tuberculosis*, que se mantinha pelo tempo de sobrevida do animal. Finalmente, MAY-

RINK<sup>7</sup> observou ser o antígeno heterólogo obtido de *M. tuberculosis*, mesmo de cepas não patogênicas, mais específico e sensível ao teste de fixação do complemento com soros de portadores de leishmaniose cutânea, que o homólogo extraído nas mesmas condições.

Todos estes dados comprovam a existência de fração ou frações em alguns bacilos álcool-ácido-resistentes e especialmente em *M. tuberculosis*, relacionadas antigenicamente com *L. donovani*. Os resultados referentes à purificação destas frações a partir de BCG são apresentados neste trabalho.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Preparação do antígeno metílico bruto de BCG

O antígeno foi preparado de acordo com a técnica descrita por CISALPINO & col.<sup>2</sup>: cerca de 1 g de BCG liofilizado era colocado

- (1) Professor Titular do Departamento de Zoologia e Parasitologia do ICB-UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil
- (2) Laboratorista do Departamento de Zoologia e Parasitologia do ICB-UFMG
- (3) Professor Assistente do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco
- (4) Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica do ICB-UFMG
- (5) Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas

em frasco escuro com rolha esmerilhada. Adicionavam-se 50 ml de acetona, deixando-se em repouso por 24 horas. Após este tempo, o sobrenadante era desprezado e esta operação repetida 3 vezes. O pó resultante do tratamento com acetona era deixado em estufa a 40°C por 24 horas. Adicionavam-se em seguida 100 ml de metanol, deixando-se à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após 15 dias de extração, filtrava-se o material e procedia-se a titulação do filtrado.

## 2. Purificação do antígeno bruto

### 2.1 — Cromatografia em coluna de sílica

Utilizou-se na preparação das colunas, sílica gel (Merck 0,05-0,2 mm, lotes n.ºs 6.161.557 e 70.156.877). Para este último lote foi necessária prévia hidratação, colocando-se a sílica em placa de Petri e deixando-se à temperatura ambiente por 6 a 8 dias. Sem este tratamento prévio, grande parte do material ativo permanecia retido na coluna.

Cerca de 50 ml do antígeno metilico bruto era evaporado a 40°C e o resíduo resultante, suspenso em 2 ml de benzeno. Este material era adicionado a uma coluna de sílica de 25 x 10 cm, previamente equilibrada em benzeno. Para total recuperação foi necessário lavar o frasco que continha a suspensão com o volume máximo de 1,0 ml de metanol o qual era também adicionado à coluna. Após a completa absorção do material pela sílica, iniciava-se a eluição empregando-se sucessivamente 50 ml dos seguintes sistemas de solventes: benzeno; benzeno-clorofórmio 5%; benzeno-clorofórmio 10%; benzeno-clorofórmio 20%; benzeno-clorofórmio 40%; benzeno-clorofórmio 80%; clorofórmio; clorofórmio-metanol 5%; clorofórmio-metanol 10%; clorofórmio-metanol 20%; clorofórmio-metanol 40%; clorofórmio-metanol 80% e metanol.

As amostras eram coletadas por gravidade em frações de 10 ml. O ritmo de eluição variava de 30 a 60 gotas por minuto, dependendo do sistema de solventes. Os solventes das frações coletadas eram evaporados a 40°C e o resíduo suspenso em metanol e transferido para frascos escuros com rolhas esme-

rilhadas, tendo-se o cuidado de raspar com espátula todo o resíduo do frasco coletor, completando-se o volume com metanol, para 50 ml.

### 2.2 — Cromatografia em camada fina

Na preparação das placas utilizou-se sílica gel GF-254 (Merck), lote 9053016; placas de vidro 20 x 20 cm e cubas adequadas (chromatank Shandon). As placas foram previamente lavadas com solução sulfocrômica e a seguir colocadas em banho de acetona. Colocaram-se nas extremidades tiras de esparadrapo e espalhou-se a sílica, com auxílio de bastão de vidro. Deixou-se secar em temperatura ambiente e a seguir foram ativadas em estufa  $\pm 150^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. A cada placa adicionavam-se de 2 a 3 ml do material a ser cromatografado. Utilizaram-se os seguintes sistemas de solvente: clorofórmio-metanol (4:1) e clorofórmio-metanol-amônia (80:20:0,8). Após tempo suficiente para migração, o material separado, revelado sob forma de manchas por vapores de iodo em câmara fechada, era extraído com 5 ml de metanol por 12 horas, sob agitação. Após remoção da sílica por centrifugação, o extrato metanólico era evaporado em estufa a 40°C.

## 3. Reação de fixação do complemento

A reação de fixação do complemento (RFC<sup>c</sup>) pela técnica de 50% de hemólise foi realizada segundo FREITAS & ALMEIDA<sup>4</sup> empregando-se soros de pacientes provenientes de zona endêmica de calazar (Vale do Rio Doce), e as frações cromatografadas como antígenos. A positividade dos soros era revelada por fixação do complemento feita previamente usando antígeno de *M. tuberculosis*. Os soros provieram de pacientes com exame positivo, de medula óssea.

## 4. Determinações químicas

Dosagem de nitrogênio pela nesslerização; dosagem de fósforo pela técnica de NAKAMURA<sup>8</sup>; dosagem de carboidrato total pela antrona, segundo método de SEIFTER, DAYTON, NOVIC & MUNIWYLER<sup>10</sup>.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 1 apresenta o perfil cromatográfico típico do antígeno de BCG com título de 1:640, obtido nas condições descritas. A eluição foi acompanhada pela determinação de polissacarídeos e reação de fixação do complemento. Como mostra a figura, a fração

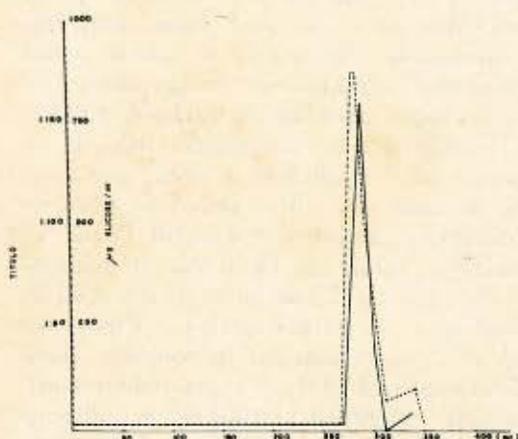


Fig. 1 — Cromatografia em coluna de sílica, do extrato metílico de BCG. Linha tracejada: carboidrato total determinado pelo reagente de antrona. Linha contínua: RFC a 50% de hemólise

polissacarídica não coincide exatamente com o material ativo na reação de fixação do complemento, indicando provável heterogeneidade da fração ativa. Alterações na velocidade de fluxo e altura da coluna, bem como modificações no esquema de eluição, com maior discriminação do sistema clorofórmio metílico, não foram eficazes para separação do material inerte. Com o emprego de sílica de um mesmo lote, a recuperação da atividade antigênica de 18 colunas variou de 50 a 80%. Uma das causas desta variação foi provavelmente a perda ocorrida na transferência do material para a coluna, devido à sua insolubilidade em benzeno.

O material da fração clorofórmio-metanol 80%, com maior atividade antigênica, foi recromatografado em camada fina, empregando-se o sistema de solventes clorofórmio-metanol 4:1. A Fig. 2 mostra o resultado de uma destas experiências, em que se constata a presença de duas bandas reveladas por vapor de iodo: uma na origem e outra pró-

xima do "front" esta com  $R_f = 0,90$ . Ambas mostraram-se ativas ao teste de fixação do complemento com soros de pacientes portadores de calazar. As duas frações foram raspadas da placa, eluídas em metanol e recromatografadas em placas de sílica, alterando-se o sistema de solventes para clorofórmio-metanol-amônia (80:20:0,8). Os eluatos do material de origem e o do "front" revelaram, por vapor de iodo, a presença de três bandas completamente inativas à fixação do complemento, sugerindo tratar-se de complexo cuja dissociação destrói a atividade biológica.

Comparação da cromatografia em camada fina do extrato metílico bruto de BCG (Fig. 3) e do material purificado (Fig. 2) mostra que se atingiu alto grau de purificação constatando-se a presença de duas frações ativas.

A análise do material revelou a inexistência de fósforo e presença de nitrogênio, além de polissacarídeos.

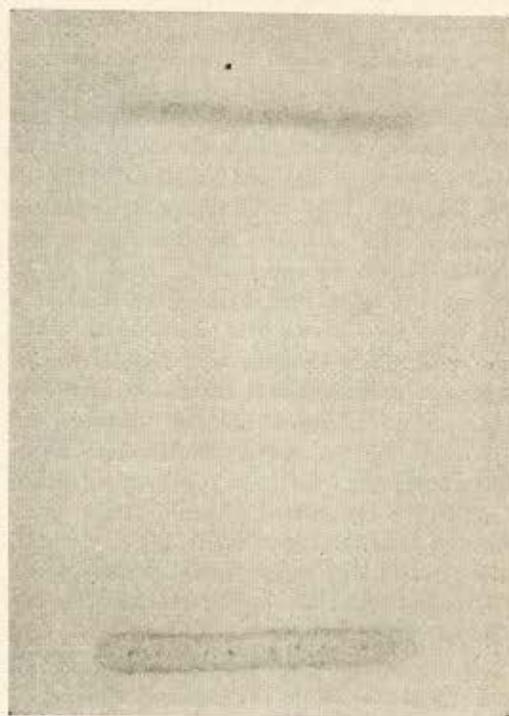


Fig. 2 — Cromatografia em camada fina da fração ativa de BCG obtida por cromatografia em coluna. Sistema de solvente: clorofórmio-metanol 4:1. Observam-se duas frações reveladas por vapor de iodo

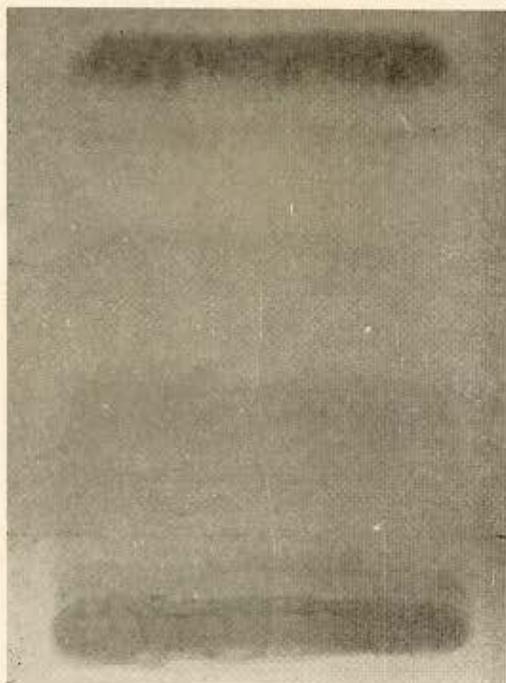


Fig. 3 — Cromatografia em camada fina do extrato bruto de BCG. Sistema de solvente: clorofórmio-metanol 4:1. Constatou-se a presença de pelo menos 7 frações reveladas por vapor de iodo

Estes resultados em conjunto sugerem ser o material ativo complexo lipopolissacarídico, cuja dissociação leva à perda da atividade. Estudo para a caracterização química do material está sendo realizado.

#### S U M M A R Y

#### *Fractionation of BCG methylic extract and purification of antigenic fractions related with Leishmania donovani*

1. BCG methylic extract is able to induce complement fixation when mixed with serum of Kala-Azar patients. 2. The antigenic fraction of BCG related with *Leishmania donovani* may be purified by column chromatography followed by thin layer chromatography of the active material. 3. Refractionation of the purified material leads to a loss of its biological activity. 4. Analysis of the active material indicate absence of phosphorus and presence of nitrogen and polysaccharide.

#### A G R A D E C I M E N T O

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio do BNDE (FUNTEC) e Conselho de Pesquisas da UFMG.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIER, O. & PLANET, N. — Aplicação do processo Witebsky ao preparo de um antígeno para a fixação do complemento na lepra com o "*Streptothrix leproides*" (Delke). *Fol. Clin. Biol.* 8:72-75, 1936.
2. CISALPINO, E. O.; MAYRINK, W. & BASTISTA, S. M. — Antígeno metilico em Calazar. *Hospital (Rio)* 61:156-160, 1962.
3. DHARMENDRA, M. & BOSE, R. — Complement in leprosy with antigens prepared from various acid-fast bacilli. *Ind. J. Med. & Res.* 29:7-21, 1941.
4. FREITAS, J. L. P. & ALMEIDA, J. O. — Nova técnica de fixação do Complemento para Moléstia de Chagas. *Hospital (Rio)* 35:35-50, 1949.
5. KONOPKA, E. A.; GOBLE, F. C. & LEWIS, L. — Effects of prior infection with *Leishmania donovani* on the course of experimental tuberculosis in mice. *Bact. Proc. Med.* 129: 134-138, 1961.
6. LOWE, J. & GREVAL, S. D. S. — Complement fixation in leprosy and other diseases by the Witebsky-Klingenstein and Kuhn (W.K.K.) antigen. *Ind. J. Med. Res.* 26: 833-841, 1939.
7. MAYRINK, W. — *Antígenos Homólogos em Calazar*. Tese. Escola de Farmácia e Bioquímica de Ouro Preto, F.U.O.P., 1961.
8. NAKAMURA, G. R. — Microdetermination of Phosphorus. *Anal. Chem.* 24:1372-1374, 1952.
9. NUSSENZWEIG, V. — *Contribuição para o Estudo da Reação de Fixação do Complemento da Leishmaniose Visceral com Antígeno extraído de bacilo de tuberculose*. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1958.
10. SEIFTER, S.; DAYTON, S.; NOVIC, B. & MUNIWYLER, E. — The estimation of glycogen with Anthrone reagent. *Arch. Biochem.* 25:191-200, 1950.

Recebido para publicação em 22/12/1972.