

Proteasa de *Trypanosoma cruzi*. Utilidad en el diagnóstico inmunoenzimático de la enfermedad de Chagas

Dr. Esteban Alberti Amador,* Lic. Alberto Fachado Carvajales,** Lic. Ana M. Montalvo,***
Lic. Lisset Fonseca Geigel,**** Dr. Luis Fonte Galindo*****

RESUMEN. Se normalizó un sistema inmunoenzimático en fase sólida para la detección de anticuerpos en suero de pacientes chagásicos crónicos, utilizando como antígeno una proteasa de *Trypanosoma cruzi* (GP 57/51 KDa). Para el cálculo de sensibilidad, especificidad y valores predictivos del procedimiento, se tomaron como referencias los resultados obtenidos por serología convencional (IFI, HAI) y lisis mediada por complemento para la detección de anticuerpos antitrypanosoma cruzi en suero. Excepto una, las muestras positivas por estas técnicas también lo resultaron por nuestro método. Estos resultados demuestran que GP 57/51 podría ser utilizado en el diagnóstico de la enfermedad chagásica crónica.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, cisteíno-proteína-sa, xenodiagnóstico, lisis mediada por complemento.

Aproximadamente 90 millones de personas en América Latina, 1/4 de la población total de nuestra región, está en riesgo de infectarse con *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*),^{1,2} agente causal de la enfermedad de Chagas. De éstos, un estimado de 16 millones están actualmente infectados y en riesgo de convertirse en pacientes crónicos de esta parasitosis.³

Dos son las vías por las que se transmite esta enfermedad: mediante vectores (triatomas) y por transfusiones de sangre infectada.^{4,5} El incremento de la población urbana ha provocado que la transmisión de la infección a consecuencia de la hemoterapia sea un hecho cada vez más frecuente en hospitales y bancos de sangre de Centro y Sud-América.^{4,5} Para enfrentar este problema, la prueba diagnóstica más comúnmente utilizada es la hemaglutinación,⁶ procedimiento que tiene tres limitaciones: la amplia diferencia de resultados entre laboratorios debido a que los reactivos por lo general son preparados en cada uno de ellos, falsos positivos consecuentes de la utilización del parásito completo como antígeno (lo que ha llevado a descartar un número importante de donaciones san-

SUMMARY. An immunoenzymatic system on solid phase for antibody detection in chronic Chagasic patients, was normalized. The major protein from *Trypanosoma cruzi* GP 57/61 kDa was used as antigen and optimal values for the related variables were established. The sensitivity, specificity and predictive values of the procedure were calculated taking into account the results obtained from conventional serologic (IFI, IHA) and complement-mediated lysis test, for antibody detection to *T. cruzi* in serum. Except one, the positives samples by those techniques, were positives also by our method. These results demonstrates that FP 57/51 may be useful for the diagnosis of the chronic forms of Chagas' disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, cysteine proteinase, xenodiagnostic, complement-mediated lysis test, ELISA.

guíneas) y una sensibilidad no siempre adecuada, lo que conduce a la transmisión de la enfermedad.⁶ Existe, por lo tanto, necesidad de definir moléculas antigénicas de *T. cruzi* que pudieran ser mejores reactivos para la detección de la infección por este protozoo. En este sentido, se han obtenido numerosos antígenos procedentes de este parásito por medio de ingeniería genética;⁷ sin embargo, pese a las modificaciones técnicas introducidas, éstos siguen siendo muy caros para uso masivo. Recientemente, fue descrita una cisteíno-proteinasa de *T. cruzi* (GP 57/51 KDa), la cual participa en los procesos de destrucción de tejidos, asociados a fenómenos autoinmunes.^{8,9} Evidencias de que epimastigotes y trypomastigotes de *T. cruzi* liberan proteasas durante la metaciclologénesis,¹⁰ y que éstas a su vez son reconocidas por anticuerpos protectores que circulan durante la infección chagásica crónica, nos han hecho suponer que la utilización de esta molécula en un ensayo inmunoenzimático ayudaría a la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* de manera muy específica y a relativo bajo costo. Este es el objetivo fundamental del presente trabajo.

Material y métodos

Sueros humanos. Se procesaron un total de 145 muestras de suero, 100 fueron obtenidas de individuos no chagásicos provenientes de un área endémica de Chile y utilizados

* Especialista de I grado de microbiología. Investigador agregado. IPK.

** Licenciado en bioquímica. Investigador auxiliar. IPK.

*** Licenciada en biología. Investigadora agregada. IPK.

**** Licenciada en bioquímica. Aspirante investigadora. IPK.

***** Especialista de I grado en inmunología. Investigador auxiliar. IPK.

como grupo control negativo de anticuerpos a *T. cruzi*, por tanto, fueron la base para el establecimiento del criterio de positividad del ensayo; las muestras restantes, 45, correspondieron a un grupo de sueros de pacientes considerados como chagásicos crónicos, que además de las manifestaciones clínicas propias de esta parasitosis presentaban serología convencional (SC) positiva o lisis mediada por complemento (LMC) positivas, o ambas.

El suero control negativo se obtuvo a partir de una mezcla de sueros de donantes de sangre, que resultaron no reactivos por las técnicas de hemaglutinación indirecta (HAI), e inmunofluorescencia indirecta (IFI) $< 1/40$.

El suero control positivo fue elaborado con diferentes sueros reactivos a *T. cruzi*, sus títulos de anticuerpos variaron de 1/80 a 1/1024, medidos por la técnica de HAI.

Con la finalidad de evaluar la reactividad cruzada con la glicoproteína estudiada, fueron estudiadas muestras séricas de individuos que padecían otras afecciones parasitarias: leishmaniasis,²⁰ malaria,¹⁰ toxoplasmosis,¹⁰ toxocariasis,³ y cisticercosis.³

Inmunofluorescencia indirecta. Epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* provenientes de cultivo, fueron lavados y fijados con formalina según Camargo (1966).¹¹ Un conjugado anti IgG humana marcada con fluoresceína (Instituto Pasteur, París, Francia) fue utilizado en el ensayo. Todas las preparaciones se examinaron con un microscopio de luz ultravioleta (Leitz, Heerbrugg, Switzerland). Las muestras con títulos $\geq 1/20$ fueron consideradas positivas.

Hemaglutinación indirecta. Eritrocitos humanos o negativos preservados con aldehído,¹² fueron sensibilizados con un extracto antigénico de *T. cruzi*. Todas las muestras se analizaron por duplicado y los títulos $\geq 1/40$ se consideraron como positivos.

Lisis mediada por complemento. El ensayo de (LMC) fue realizado según la metodología descrita por Gazzinelli et al, (1993).¹³ Brevemente, trypomastigotes obtenidos de cultivos de células Vero (RFMI 1640 + suero fetal de ternera [SFT] 5%) fueron concentrados por centrifugación a 400 g por 10 minutos y suspendido a una concentración de 10^7 parásitos por mL con medio TC-199 suplementado con (SFT) 5%. Cincuenta microlitros de la suspensión fueron incubados con anticuerpos durante 1 h a 37° C seguido de un lavado a 1,300 g durante 10 minutos a 4° C, a continuación se realizó una nueva incubación a 37° C por 1 h, pero esta vez con complemento diluido 1/10. Los tubos controles incluyeron parásitos incubados con anticuerpos + complemento inactivado a 56° C durante 30 minutos y parásitos incubados con anticuerpos preinmune y complemento.

El conteo de parásitos se realizó por duplicado en un hemocitómetro y el por ciento de lisis fue determinado como sigue: por ciento de lisis = $100 - (100 \times \text{el número de trypomastigotes móviles en suero humano normal/número de trypomastigotes móviles en suero humano inactivados})$. Fueron considerados positivos los ensayos que mostraron un por ciento de lisis superior a 20%.

Preparación del extracto crudo de epimastigote. El extracto crudo antigénico fue preparado a partir de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* cultivados en medio líquido de

tryptosa infusión de hígado (LIT),¹⁴ suplementado con 10% de suero fetal bovino y 100 U/mL de penicilina G, posteriormente se realizó el conteo parasitario en cámara de Neubauer, obteniéndose una concentración de 20×10^6 parásitos por mL. A continuación los epimastigotes fueron lavados 3 veces por centrifugación en tampón fosfato-salino (PBS) 0.1 M pH 7.2. El volumen total de la suspensión, 20 mL, fue colocado en un sonicador (Soniprep 150) y sometido a 3 ciclos de un minuto con intensidad de 18 Khrz e intervalos de reposo de 30 segundos. El producto final se centrifugó a 12,000 g durante una hora a 4° C, el precipitado fue desechado y el contenido proteico del sobrenadante fue estimado mediante el método de Lowry.¹⁵ Se prepararon alícuotas de 1 mL que fueron conservadas a -20° C hasta su uso.

Purificación de GP 57/51. La GP 57/51 KDa fue purificada a partir de un extracto crudo de epimastigote de *T. cruzi* empleando la cromatografía líquida de alta resolución (FPLC), Pharmacia, LKB⁹ con algunas modificaciones. Brevemente, para el fraccionamiento se utilizó una columna de filtración en gel Superdex - 200. Las alícuotas recolectadas durante la cromatografía fueron utilizadas en los estudios de actividad enzimática sobre el sustrato sintético benziloxycarbonil-arginil-arginina 2-(4-metoxi) naftilamida (Z-Arg-Arg-Mna). (Bachem, Switzerland). La pureza de la fracción con actividad enzimática fue determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-Page)¹⁶ al 12.5%, en condiciones reductoras. Las bandas fueron visualizadas tiñendo uno de los geles con azul de Coomassie R 250.

Actividad enzimática. Se siguió la metodología descrita por Barret,¹⁷ con las siguientes modificaciones. Una solución de incubación de 0.5 mL, conteniendo amortiguador glicina-HCl 100 mM pH 9.5 + EDTA 2 mM + L-cisteína 2 mM + sustrato 1 mM como concentración final durante 10 minutos a 37° C.

La reacción fue detenida con 500 μ L de solución detenedora (fast garnet 2.25% + NaNO₃ 0.2 mM + EDTA 2 Na 25 mM + P-cloromercuribenzoato 50 mM + T-20 1% pH 6). La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 520 nm.

Inmunoensayo enzimático (ELISA). Consistió en un método indirecto que utilizó como fase sólida placas de poliestireno de fondo plano (Polysorp, Nunc), que fueron recubiertas durante 16 horas a 4° C con 100 μ L por pocillo de diferentes concentraciones de la enzima (0.5 - 8 μ g) preparado en solución 0.1 M de carbonato de sodio pH 9.6. Los espacios libres fueron bloqueados con seroalbúmina bovina (BSA), al 1% durante 1 hora a 37° C. Finalizada la incubación, se añadieron 100 μ L por pocillo de las muestras de sueros previamente diluidas 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, e incubadas durante una hora a 37° C. Posteriormente, las placas fueron lavadas cuatro veces con 0.015 M de PBS más 0.05% de Tween 20 (PBS - T). A continuación se añadieron 100 μ L por pocillo de la solución de IgG de conejo conjugada con peroxidasa anti-IgG humana previamente diluida en PBS - T más BSA al 1%, (1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/6000, 1/8000) incubándose una hora a 37° C. Las placas fueron lavadas cuatro veces con PBS - T y finalmente se añadieron 150 μ L del sustrato (10 μ L H₂O₂ al

30% p/v + 25 mL del tampón 0.1 M de citrato de sodio pH 5 + 10 mg O - fenilenediamina clorhidrato), el cual se incubó durante 30 minutos en condiciones de oscuridad. La reacción enzimática fue detenida mediante la adición de 50 μ L por pocillo de ácido sulfúrico al 12.5%. La lectura fue realizada en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Titertek Multiskan Plus). Las muestras séricas de 100 individuos utilizadas como grupo control negativo fueron estudiados por duplicado. Al valor de densidad óptica media de las dos determinaciones le fue restado la media de los blancos utilizados en cada ensayo. El valor de corte fue determinado según la fórmula: $DO \pm 3 DS$. Para el cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de nuestro ELISA, se tomó como referencia la SC y LMC, previamente utilizados en la clasificación de las muestras, para ello se confeccionó la tabla de contingencia de doble entrada correspondiente.

Resultados

La figura 1 muestra el perfil cromatográfico obtenido por filtración en Superdex - 200 del extracto crudo de epimastigotes. Se obtuvieron seis picos (P1 a P6) y sólo la fracción correspondiente al P2 mostró actividad enzimática. Cuando la fracción con actividad (P2), fue corrida en SDS-Page y luego de coloreado el gel, observamos una sola banda en los límites de peso molecular de 57/51 KDa (Figura 2).

Las condiciones de reacción y las concentraciones, se evaluaron mediante titulación cruzada de los reactivos empleados en el sistema, seleccionándose finalmente aquellos que ofrecieran una mejor relación entre controles positivos, y negativos ($P/N \leq 10$), y mayor seguridad en los resultados. Seleccionamos 4 μ g como concentración óptima de la enzima para el recubrimiento porque éste es un valor intermedio en la meseta de la curva de titulación, donde se evitan errores en los resultados a consecuencia de imprecisiones de dilución.

Cromatografía. Gel Filtración de un extracto crudo en Superdex - 200.

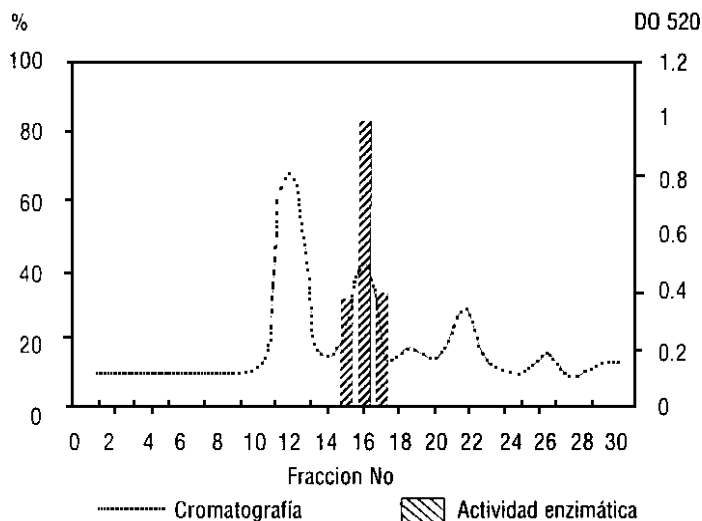


Figura 1. Muestra el perfil de elución, del fraccionamiento en Superdex - 200 de un extracto de *T. cruzi*. La muestra (1 mL) fue aplicada con Tris - HCL 100 mM pH 8.2 a un flujo de corrida de 0.8 mL/min. Las fracciones 16 y 18 con actividad proteolítica eluyó a un volumen de 48 a 54 mL.

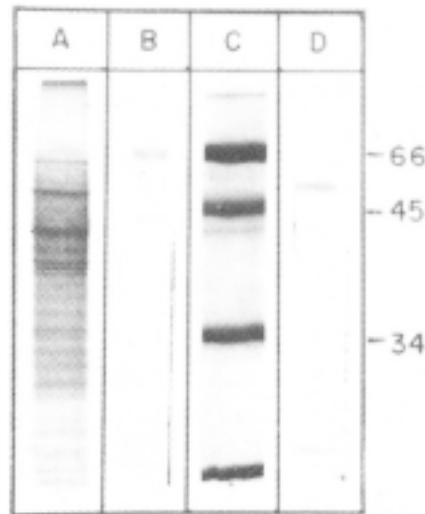


Figura 2. SDS- Page (12.5% en condiciones reductoras). Extracto crudo de epimastigotes de *T. cruzi* (línea a). Muestra de proteína utilizada como control (línea b). Patrones de pesos moleculares en KDa (línea c). Fracción purificada GP 57/51 KDa (línea d, e). Azul de Coomassie R 250 fue utilizado para teñir el gel.

Cuadro 1. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos

	Serología Convencional	Lisis M.	Complemento total
	+	-	
ELISA	+	0	44
	-	100	101
Total	45	100	145

Sensibilidad = 97.7% V. Predictivo (+) = 100%

Especificidad = 100% V. Predictivo (-) = 99%

Siguiendo el mismo análisis, se seleccionó la dilución del suero 1/100 y del conjugado 1/4000, porque éstas ofrecieron una mayor discriminación entre controles positivos y negativos, además de resultar mucho más económicas. Fueron consideradas positivas las muestras cuya densidad óptica excedió el valor de $0.173 \pm 3 (0.095)$ de las 100 muestras del grupo control negativo, con este valor de corte todos los valores de densidad óptica de las muestras de los individuos normales resultaron negativas y todos los valores de muestras de los pacientes con trypanosomiasis resultaron positivas, excepto un caso que presentó valores por debajo del corte.

El cuadro 1 muestra los resultados de sensibilidad (97.7%) y especificidad (100%) del ELISA, tomando como referencia la SC y LMC. En correspondencia con ello, los valores predictivos para sueros positivos y negativos fueron de 100% y 99% respectivamente.

La especificidad del test de ELISA con la GP 57/51 fue evaluada con sueros de pacientes con otras infecciones parasitarias (Figura 3). Solamente dos sueros de pacientes con leishmaniasis mostraron reacciones cruzadas con este antígeno; ningún suero de los pacientes infectados con otro protozoo o helminto resultó positivo.

Discusión

La importancia de hacer una adecuada selección de las diferentes variables que intervienen en la buena realización de cualquier ensayo inmunoenzimático está bien establecida.¹⁸ En

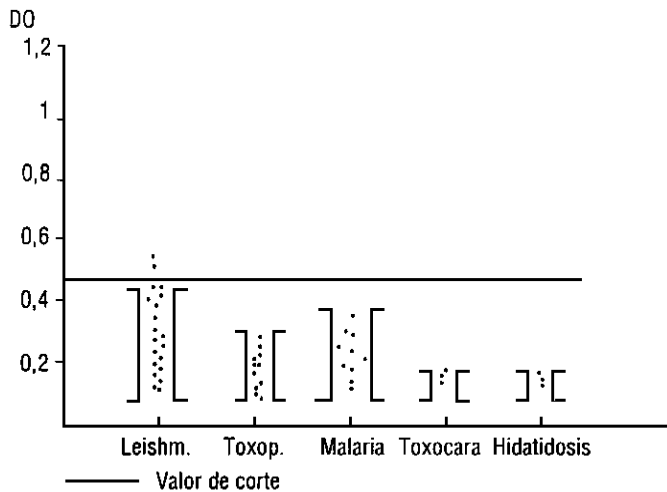


Figura 3. Reacciones cruzadas.

nuestro trabajo, al valorar la concentración óptima de la enzima para el recubrimiento de la placa, encontramos que ésta se logra 4 µg/mL, concentración más baja que la que informaron Gazzinelli et al (1993)¹³ empleando, como en nuestro estudio, placas de poliestireno y un proceder similar al nuestro en la obtención del enzima. No tenemos explicación absoluta para esto, pero pensamos que en ello pudo influir la calidad del material antigénico purificado por esos autores, el cual fue previamente tratado con inhibidores de proteasas y ello pudo provocar una disminución en la actividad del enzima. El valor de corte escogido en nuestro ensayo fue de 0.458, (DO + 3 DS) del grupo control negativo, pues con éste, todos los sueros negativos confirmados por los métodos de referencia, fueron negativos y sólo un caso de los sueros positivos confirmado por SC y LMC fue negativo por el método que se compara. Quizás esto se debió a que, tratando de ganar en especificidad, se obtuvo un resultado falso negativo. Evidencias acumuladas después de un largo seguimiento de pacientes con trypanosomiasis indican que anticuerpos detectados por SC pueden existir en total ausencia de infección activa.¹³ De cualquier modo, nuestro método tiene en relación con un grupo control negativo, constituido por sueros de un área endémica sin antecedentes de trypanosomiasis, índices de sensibilidad y especificidad de 97.7% y 100% respectivamente.

La reactividad cruzada de GP 57/51 con un número pequeño de sueros de individuos con leishmaniasis no fue sorprendente, pues *T. cruzi* y *Leishmania sp* poseen epitopes semejantes. Glicoproteínas que contienen galactosil (Gal) terminal¹⁹ y proteínas derivadas del citoesqueleto, como la tubulina son semejantes en muchos trypanosomátides.

En el caso específico de la LMC, este método ha sido empleado durante muchos años^{13,20} para el monitoreo de pacientes bajo tratamiento y es utilizado como criterio de curación, ya que detecta anticuerpos que están dirigidos contra antígenos presentes en la superficie del trypomastigote, pero el mismo tiene el inconveniente de que para su normalización necesita de la manipulación de parásitos vivos infectantes y de una fuente de complemento no disponibles por todos los laboratorios.¹³

En consecuencia a lo anteriormente expuesto, pensamos que la detección por ELISA de anticuerpos a GP 57/51 pudiera ser una variante más sencilla y específica para la detección de respuesta humoral a *T. cruzi*, teniendo en cuenta, además, la alta sensibilidad, fácil ejecución y obtención rápida de los resultados que nos brindan los sistemas inmunoenzimáticos.

Referencias

1. Brener Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. Adv Parasitol 1980;18:247-292.
2. Hudson L. Immunobiology of *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas' disease. Trans R Soc Trop Med Hyg 1981;75:493-498.
3. Hernández-Munain C, Fernández AM, Alcina A, Fresno M. Characterization of a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane protein from *Trypanosoma cruzi*. Infec Immun 1991;59:1409-1415.
4. Teixeira ARL, Pereira LM. Discrepancias entre resultados de tres reações serológicas para diagnóstico de doença de Chagas. Rev Bras Biol 1981;41:789.
5. Deas JCP. Control of Chagas' disease in Brazil. Parasit Today 1987;3:336-341.
6. Zicker F, Smith PG, Luquetti AO, Oliveira OS. Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination test on serum samples and blood eluates from filter paper. Bull WHO 1990;68:465-471.
7. Carbonetto CH, Malchiodi EL, Chiaramonte M, Durante De E, Fossati CA, Margni RA. Isolation of *Trypanosoma cruzi* antigen by affinity chromatography with a monoclonal antibody preliminary evolution of its possible applications in serological test. Clin Immunol 1990;82:93-96.
8. MC Kerrow JH. New insights into the structure of a *Trypanosoma cruzi* protease. Parasitol Today 1991;7:132-133.
9. Scharfstein JM, Schechter M, Senna M, Peralta JM, Mendocaprevalto, Miles M. *Trypanosoma cruzi*: Characterization and isolation of 57/51 M.W. surface glycoprotein (GP 57/51) expressed by epimastigotes and blood stream trypomastigote. J Immunol 1986;137:1336-1341.
10. Bonaldo MC, D'Escoffier LN, Salles JM, Goldenberg S. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Experimental Parasitology 1991;73:44-51.
11. Camargo ME. Fluorescent antibody test for serodiagnosis technical modification employing preserved cultured forms of *T. cruzi* in slide test. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1966;8:227-234.
12. Camargo ME, Hshino S, Sequeira GRV. Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serological diagnosis of American trypanosomiasis 1973;15:81-85.
13. Gazzinelli RT, Galvao MC, Krautz G, Lima APCA, Romeu-Concado J, Scharfstein J, Kretzli AU. Use of *Trypanosoma cruzi* purified glycoprotein (GP 57/51) or trypomastigote shed antigen to assess cure for human Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg 1993;49:625-635.
14. Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosoma in liquid media. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1964;6:93-101.
15. Lowry DH, Rosebraugh NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. Biolog Chem 1951;193:265-275.
16. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.
17. Barrett AJ. The classification of proteinases. Ciba Found Symp 1980;75:1-13.
18. Bullock SL, Walls TD. Evolution of some of the parameters of the enzyme linked immunospecific assay. J Infect Dis 1977;136:276-285.
19. Avila JL, Roja MA, Galactosyl (1-3 mannose) epitope on phospholipids of *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* recognized by trypanosomatide infected human sera. J Clin Microbiology 1990;28:1530-1537.
20. Gazzinelli RT, Leme UMC, Romeu-Concado J, Gazzinelli G, Scharfstein J. Identification and partial characterization of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by T cells and immune sera from patients with Chagas' disease. Infec Immun 1990;58:1437-1444.