

em cumprimento a decisão final da ASE
defendida pela Srta. Laurecir Gomes e aprovada
pela Comissão Julgadora.

31/10/84

PLA Araújo

" AÇÃO DA PROTEINASE DE Trypanosoma cruzi
SOBRE AS IMUNOGLOBULINAS IgA, IgM e IgG
HUMANAS. "

LAURECIR GOMES

LAURECIR GOMES

" AÇÃO DA PROTEINASE DE Trypanosoma cruzi SOBRE AS
IMUNOGLOBULINAS IgG, IgA e IgM HUMANAS."

Tese de Mestrado
Apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Microbiologia e Imu
nologia

Orientador:

Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo

Campinas - S.P.

1984

AGRADECIMENTOS

As instituições relacionadas abaixo pelos recursos fornecidos ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia da UNICAMP:

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES)

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)

Durante o desenvolvimento deste trabalho o autor foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Aos meus pais

ABREVIATURAS

AFNE - Acetil-DL-Fenilalanina-2-Naftil Ester

BANA - Benzoil-L-Arginina Naftil Amida

BAPNA - Benzoil-DL-Arginina-p-Nitro Anilida

BSA - Albumina Bovina Sérica

CYS - Cisteína

DEAE celulose - Dietilaminoetil celulose

DMSO - Dimetil sulfóxido

DTT - Ditiotreitól

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetracético

EGPA - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

FS - Fração Solúvel

FSp - Fração Solúvel precipitada

IEC - Imunoeletroforese Cruzada

IES - Imunoeletroforese Simples

Ig - Imunoglobulina

LIT - Liver Infusion Tryptose

2Me - 2-Mercaptoetanol

p-AFMA - para-Aminofenil Mercuriacetato

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

TCA - Ácido Tricloroacético

Tris - Tris (hidroximetil) aminometano

INDICE

	Pag.
Introdução.....	01
Material e Métodos.....	09
Reagentes.....	09
<u>Trypanosoma cruzi</u>	09
Preparo da Fração Solúvel (FSp).....	10
Purificação da Proteinase de <u>Trypanosoma cruzi</u>	10
A - Precipitação com acetona.....	10
B - Cromatografia de Gel Filtração.....	11
C - Cromatografia de Afinidade.....	11
Atividade Enzimática.....	12
Purificação das Imunoglobulinas.....	13
A - Imunoglobulina IgG.....	13
B - Imunoglobulina IgM.....	13
C - Imunoglobulina IgA.....	14
Imunossoros.....	14
Tratamento das Imunoglobulinas com Proteinase.....	15
Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS.....	15
Imunoeletroforese Simples e Imunoeletroforese Cru zada.....	16
Dosagens de Proteínas.....	17
Resultados.....	18
Obtenção da Proteinase.....	18
Ação Enzimática sobre Imunoglobulinas Humanas.....	19
A - Imunoglobulina IgG.....	20

	Pag.
B - Imunoglobulina IgA.....	22
C - Imunoglobulina IgM.....	23
Discussão.....	25
Resumos e Conclusões.....	32
Referências Bibliográficas.....	34

INTRODUÇÃO

O protozoário causador da doença de Chagas, ao penetrar no seu hospedeiro vertebrado, desencadeia um processo infeccioso com várias manifestações (chagoma, febre e altas parasitemias) que caracterizam a fase aguda. Com o desaparecimento dessas manifestações, segue-se uma fase crônica tardia, na qual poderá ocorrer um comprometimento do trato cardíaco e/ou digestivo (Coura, 1972). O desenvolvimento desse quadro com fases distintas dependentes da relação parasito-hospedeiro, estabelecida a partir da influência de fatores inerentes ao parasito (polimorfismo, tropismo, constituição antigênica, etc) ou ao hospedeiro (fatores relacionados com resistência natural ou adquirida como idade, constituição antigênica, espécie animal, etc) (Tafuri, 1974).

Após penetração no organismo os tripanosomas localizam-se em células do sistema fagocitário de vários órgãos e/ou fibras musculares cardíacas (Coura, 1972). Os resultados obtidos de experimentos com diferentes animais demonstraram que o alojamento desses protozoários no músculo cardíaco causam lesões que dependem do tropismo da cepa (Andrade & Andrade, 1978; Tafuri e cols, 1980; Ramirez e cols, 1982; Figueiredo e cols, 1983), da sua virulência (Schlemper e cols, 1982) ou do número de parasitos inoculados (Ramirez e cols, 1982).

No infiltrado inflamatório do órgão parasitado, há

predominância de células mononucleares em íntima relação com as fibras do miocárdio. Essas fibras podem estar normais ou apresentarem completa dissociação com desorganização e lise (Figueiredo e cols, 1982). Nas regiões afetadas são encontradas células com conteúdo citoplasmático desorganizado e organelas alteradas (Higrichi e cols, 1978; Tafuri e cols, 1980). Os macrófagos se apresentam com intensa atividade fagocitária, onde são encontrados grande número de lisossomos, e os vacúolos citoplasmáticos contém restos de colágeno e raras formas amastigota (Andrade & Gremaud, 1982).

Apesar das numerosas observações histológicas de lesões produzidas pelo Trypanosoma cruzi, pouco se sabe à respeito do mecanismo patogênico desta infecção. Há sugestões de uma associação desses mecanismos com a presença de toxinas (neurotoxinas), ou enzimas liberadas pelo parasito no citoplasma da célula (Köerbele, 1974); ou por produtos de lise lisossomal liberados das células do infiltrado inflamatório (Tafuri, 1974).

A hipótese de enzimas proteolíticas, produzidas pelo parasito, participarem na doença de Chagas deve ser considerada, uma vez que elas participam de importantes processos biológicos inclusive na interação parasito-hospedeiro. Os estudos com microorganismo têm fornecido grande parte das informações sobre essas enzimas, demonstrando sua participação em numerosos fenômenos fundamentais à vida da célula, como por exemplo a regulação do "turnover" proteico, com a degra

dação hidrolítica de proteínas, uma das principais funções das proteases intracelulares (Holzer e cols, 1975). Com organismos superiores tem-se definido a ativação ou inativação de numerosos sistemas biológicos através da proteólise limitada: ativação trípica do quimotripsinogênio, conversão do plasminogênio em plasmina, do tripsinogênio em tripsina, de fibrinogênio em fibrina, ativação do sistema complemento, etc (Mihalyi, 1972; Reich, 1975). As enzimas proteolíticas teriam portanto um papel regulador sobre variados mecanismos biológicos.

Algumas exoproteases liberadas poderiam participar na diferenciação celular, a exemplo da Leishmania mexicana amazonensis (Fong & Chang, 1981); ou facilitariam a implantação e multiplicação do microorganismo. Dessa forma enzimas proteolíticas atuariam em patologias como na gangrena gasosa, onde as enzimas do Clostridium perfringens e Clostridium histolyticum que lisam o colágeno ajudariam a sua difusão nos tecidos (Bidwel & Van Heyning, 1948; Mac Lennan, 1962); ou como na penetração e movimentação das cercárias de Schistosoma mansoni na pele do hospedeiro (Dresden & Asch, 1972; Steriwalt e cols, 1973 e 1978).

O Trypanosoma cruzi que apresenta um ciclo vital complexo, exige constituintes proteicos para o seu crescimento e diferenciação (O'Dally, 1975 e 1976). Este penetra ativamente na célula e aí se multiplica (Meyer e cols, 1958; Dvorak e cols, 1977). As enzimas favoreceriam tanto a penetração quanto a migração dentro dos tecidos.

Em vista da importância que as enzimas proteolíticas teriam nesta relação parasito-hospedeiro, estudos foram realizados inicialmente com extratos de Trypanosoma cruzi detectando atividades proteolíticas em pH 7.0 e pH 3.0 usando hemoglobina como substrato (Repka e cols, 1972). Itow & Camargo (1977) demonstraram em extratos similares atividades proteolíticas com características do tipo tripsina, quimotripsina e aminopeptidase utilizando substratos sintéticos; e uma outra com substrato proteico não específico (azocaseína). Rangel e cols (1977) e Araújo e cols (1978) demonstraram independência entre três enzimas de extratos de Trypanosoma cruzi sendo duas dessas com ação sobre substratos sintéticos (AFNE e BANA) e outra com ação sobre substratos proteicos (hemoglobina e caseína). Bongertz & Hungerer (1978) isolaram e caracterizaram a protease com atividade do tipo tripsina; com um ótimo de atividade a pH 8.5 sobre BAPNA e PM 200.000. Rangel e cols (1981a) isolaram e caracterizaram a proteinase com características SH-dependente sendo portanto ativada por compostos sulfidrílicos (Me e Cys) ou inibida por reagentes de grupamentos tióis (Hg^{2+} , ácido iódico, etc). Possui um ótimo de atividade em torno do pH 7.0 ou pH 3.0 frente aos substratos proteicos caseína e hemoglobina respectivamente; com peso molecular de 60.000.

Esta proteinase foi demonstrada em ninhos de amastigota de tecido cardíaco de camundongos infectados, através da reação de imunoperoxidase com imunossoro específico (Pereira e cols, 1980). Com esse imunossoro foi possível detec

tar a proteinase nas formas epimastigotas da cepa Y através dos testes de aglutinação, imunofluorescência e imunoperoxidase. Essas duas últimas reações também foram positivas, quando testadas as formas tripomastigota e amastigota de cinco cepas (Y, CL, Colombiana, Argentina e Peruana) (Rangel e cols, 1981b).

A presença dessa enzima nas diferentes formas isoladas de Trypanosoma cruzi e nos ninhos de amastigota pode sugerir uma participação no mecanismo de inflamação. Sua ação sobre diferentes substratos proteicos causaria lesão endotelial alterando a permeabilidade capilar e ativando os componentes do sistema complemento. Um processo inflamatório similar poderia também ser desencadeado por ação das proteases das próprias células do hospedeiro (Cammer e col, 1978).

Inúmeros são os mecanismos utilizados pelo parasito para sua sobrevivência. Mitchell (1979) propôs que na tentativa de evasão, o parasito manifestaria esta capacidade através de vários fenômenos de escape como a diminuição na sua antigenicidade, o "mimetismo" molecular, inacessibilidade anatômica, efeitos anti-complementares e anti-inflamatórios, degradação de anticorpos e outros.

O alojamento dos tripanosomas em células onde a defesa humoral do hospedeiro não consegue atingi-lo, seria o mecanismo utilizado em uma das fases do ciclo, onde os ninhos de amastigota formados ocupam praticamente toda a célula (Tafari e cols, 1980).

Outra forma eficaz de evasão, esta relacionada com a presença no Trypanosoma cruzi de substâncias inativadoras do complemento. Kipnis e cols (1981) demonstraram que o tratamento enzimático do parasito retirava essas substâncias anti-complementares da sua superfície.

A presença de imunoglobulinas do hospedeiro na superfície do parasito também constitui um dos mecanismos que o ajudaria a sobreviver. Kloetzel & Deane (1977), em experimentos com camundongos, observaram que parasitos da cepa F (pico parasitémico 30^o e 45^o dia) e não na cepa Y (pico parasitémico 7^o dia) de Trypanosoma cruzi, continham imunoglobulinas das classes IgM e IgG na superfície, decorrente do período de parasitemia. Em Trypanosoma lewise foi verificado (Ferrante & Jenkin, 1977) que as imunoglobulinas do hospedeiro presentes na superfície do parasito eram incapazes de fixar complemento ou participar na fagocitose. Andrade (1978) infectando cobaias com cepa Peruana e/ou Colombiana não detectaram imunoglobulinas na superfície dos parasitos. O mesmo aconteceu com Tabel & Lasos (1980) quando isolaram Trypanosoma vivax de gado bovino. Entretanto esses pesquisadores detectaram anticorpos na superfície desses tripanosomas quando eram obtidos de camundongos infectados. Com esses dados eles propuseram que a mesma espécie de tripanosoma teria comportamento diferente em diferentes hospedeiros.

Torpier e cols (1979) e Auriault e cols (1981) demonstraram que a ligação da molécula de IgG no Schistosoma mansoni ocorre através de receptores para fragmento Fc, e

que essa imunoglobulina é clivada em pequenos peptídeos por enzimas produzidas pela glândula pré-acetabular, característica do estágio schistosomula. Receptores para Fc de IgG em protozoários patogênicos Trypanosomatidae foi observado por Miranda Santos & Campos Neto (1981).

No mecanismo de escape envolvendo anticorpos específicos produzidos pelo hospedeiro, enzimas proteolíticas do parasito degradariam essa molécula impedindo sua atividade biológica específica. Krettli e cols (1980) sugeriram que os tripomastigotas poderiam sintetizar proteases as quais clivariam as imunoglobulinas aderidas à sua superfície. Uma porção do produto clivado permaneceria na membrana facilitando assim o escape. Esse fenômeno conhecido como fubulação (presença de fragmento Fab) foi descrito por Eisen & Tallan (1977) no protozoário Tetrahymena pyriformes que produz enzimas capazes de clivarem imunoglobulinas livres ou aderidas ao protozoário.

Enzimas proteolíticas com propriedades semelhantes à papaína ou catepsina B, produzidas pela Fasciola hepatica, degradam imunoglobulinas humanas IgG e IgM (Chapman & Mitchell, 1982). IgA humana é digerida "in vitro" por proteases liberadas de Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Streptococcus sanguis e Haemophilus influenzae (Plaut, 1975 e 1978; Kilian e cols, 1980).

Esse conjunto de informações sugerem que os anticorpos, específicos ou não, sofrem a ação de enzimas proteolíticas produzidas pelos parasitos, os quais degradam essas molé

culas impedindo sua atividade biológica. Com o objetivo de determinar se a proteinase de Trypanosoma cruzi poderia estar associada a um fenômeno similar na doença de Chagas, neste trabalho procurou-se investigar a sua ação "in vitro" sobre as imunoglobulinas IgG, IgA e IgM humanas.

MATERIAL E METODOS

Reagentes

Os reagentes indicados a seguir, foram obtidos das seguintes fontes comerciais:

Substratos sintéticos - AFNE e BANA da Sigma Chemical Co.

Proteínas - Hemoglobina Bovina preparada no laboratório (Araújo, 1979), Albumina Sérica Bovina, Caseína do Leite (thechemical) da Sigma Chemical Co.

Resinas - Sephadex G-200; Sepharose 4B da Pharmacia Uppsala; DEAE celulose da Sigma Chemical Co.

Outros reagentes - 2-Mercaptoetanol da Baker Analyzed; Ditiotreitól da Bio-Rad; Ácido Etilenodiamino Tetracético de Fisher Scientific Co; "Fast Garnet Salt" da Sigma Chemical Co e para-Aminofenil Mercuriacetato (p-AFMA), foi sintetizado em nosso laboratório segundo as indicações de Dimroth (1902); os solventes orgânicos tinham a especificação de quimicamente puros; a acetona foi redistilada a 56°C e conservada a -20°C até o momento do uso.

Trypanosoma cruzi

Parasitas da cepa Y de Trypanosoma cruzi (Silva & Nussensweig, 1953), cultivados em meio LIT - Liver Infusion

Tryptose - (Fernandes & Castellani, 1966), durante sete dias à 28°C; eram lavadas três vezes com salina fisiológica à 4°C. Os parasitos lavados foram lisados com água destilada gelada e liofilizados.

Preparo da Fração Solúvel (FS)

Os parasitos liofilizados eram submetidos a delipidação pelo tratamento com acetona e éter. O material resultante foi tratado com salina fisiológica à 4°C durante uma hora e a seguir centrifugado a 3020 g por 15 minutos. A fração FS (sobrenadante) era mantida à 4°C até o uso. Relação parasito-salina, 1%.

A importância dessa delipidação foi reestudada, processando-se a extração da FS em diferentes partidas do parasito submetidas ou não ao tratamento. Nenhuma diferença significativa da atividade enzimática foi observada nessa análise, concluindo-se que o tratamento seria dispensável.

Purificação da Proteinase de *Trypanosoma cruzi* (Araújo, 1979)

A - Precipitação com Acetona - A FS mantida a 4°C foi ajustada para pH 4.5 por adição de HCl 0.1 N e centrifugada a 3020 g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um banho gelado a -20°C, fracionado pela precipitação a 80% com acetona gelada sob agitação lenta e constante. O material precipitado foi mantido por 18 horas a -20°C sendo

a seguir centrifugado a 3020 g por 15 minutos. O precipitado foi suspenso em salina fisiológica, dialisado contra água destilada a 4°C e liofilizado, sendo denominado fração solúvel precipitada (FSp).

B - Cromatografia de Gel Filtração - A cromatografia de exclusão foi realizada segundo condições descritas por Flodin (1962), empregando-se colunas (2 x 100 cm) de Sephadex G-200 equilibradas a 4°C com tampão Acetato de Sódio 0.05 M pH 5.0. Alíquotas de 5 ml de FSp (22 mg/ml), dialisadas contra este tampão foram aplicadas, e o material eluído a um fluxo de 10 ml/hora, coletando-se amostras de 2 ml.

A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm e a atividade enzimática pesquisada individualmente em cada amostra utilizando-se os diferentes substratos (caseína, BANA e AFNE).

C - Cromatografia de Afinidade - A Sepharose 4B foi ativada e acoplada com p-AFMA com o método de Sluyterman & Wijednes (1970).

A fração da cromatografia de exclusão (F3), contendo a atividade sobre caseína e AFNE, foi submetida à cromatografia de afinidade em Sepharose p-AFMA. Alíquotas de F3 dialisadas contra tampão Acetato de Sódio 0,05 M pH 5.0 contendo KCl 0.1 M, Na₂SO₃ 10 mM, EDTA 1 mM e DMSO 10%, eram aplicadas à coluna de Sepharose equilibrada com o mesmo tampão. Nessas condições passava livremente a fração proteica contendo

do atividade sobre o substrato AFNE. Após lavagem da resina com tampão Acetato de Sódio e DMSO 10%, a proteinase foi e luida com este tampão acrescido de 2-Me 15 mM.

Atividade Enzimática

A atividade proteínásica nas diferentes preparações foi determinada segundo as indicações de Anson (1938), modi ficadas por Araújo (1979).

Os ensaios foram realizados no pH 7.0 com tampão Fosfato de Sódio 0.05 M e pH 3.1 com tampão Citrato-Fosfato 0.05M frente aos substratos caseína e hemoglobina respective mente. Alíquotas de 0.2 ml de enzima foram misturadas a 0,1 ml de ativadores (EDTA 5 mM + 2-Me 15 mM) e 1.0 ml de subs trato (6.0 mg/ml de caseína ou 40 mg/ml de hemoglobina bovi na). Controles contendo apenas enzima ou substrato foram feitos em paralelo. As misturas foram incubadas a 37°C por 1 h. e 40' e a seguir adicionadas de 1.0 ml de TCA, 0.2 ml de enzima, 0.1 ml de ativadores e 1.0 ml de substrato. Todos os tubos foram incubados a 45°C por 15 minutos, centrifuga dos e a seguir determinada a absorbância dos sobrenadantes em espectrofotômetro a 280 nm. A atividade enzimática relati va foi determinada com base na diferença das leituras dos produtos TCA-solúveis do tubo reação e controle. Uma unidade de enzima corresponde a uma diferença de absorbância (A) de 0.1.

A atividade sobre substratos sintéticos AFNE e BANA

foi realizado de acordo com as indicações de Uriel (1971) para determinações qualitativas.

Purificação das Imunoglobulinas

A - Imunoglobulina IgG

Soro de mieloma humano de IgG foi precipitado com Sulfato de Amônia a 50%. Esta fração foi submetida à cromatografia em DEAE-celulose (dietilaminoetil celulose) segundo Kabat & Mayer (1961), usando tampão Fosfato de Sódio 0.005 M pH 8.0. A IgG purificada está contida na fração eluída livremente nessas condições.

B - Imunoglobulina IgM

Soro de mieloma humano de IgM foi precipitado com Sulfato de Amônia a 50%. Esta fração foi submetida à cromatografia de exclusão em coluna de Sephadex G-200 utilizando PBS 0.15 M pH 7.1 (Micheli & Isliker, 1966). A fração 19S foi a seguir cromatografada em coluna de Sepharose Protefina A com tampão Citrato-Fosfato 0.2 M pH 7.0 (Duhamel, 1979). A IgM isenta de contaminantes de IgG foi obtida na primeira fração.

C - Imunoglobulina IgA

A IgA foi purificada de colostro humano segundo as condições de Newcomb e cols (1968) usando cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose equilibrada com tampão Tris-HCl 0.01 M pH 8.0 onde é discriminada uma fração rica em IgA. Essa fração foi submetida à cromatografia de exclusão em Sephadex G-200 com PBS 0.01 M pH 8.0, com reciclagens sucessivas (três vezes) obtendo-se a IgA na segunda metade do primeiro pico.

As imunoglobulinas foram testadas por imunoelctrorese simples e cruzada frente a um soro pluriespecífico anti-SHT. Os resultados dessas análises demonstraram que as imunoglobulinas purificadas constituíam preparações homogêneas.

Imunessoros

Os imunessoros anti-IgG, anti-IgA e anti-IgM humanas foram preparados em carneiros empregando-se o seguinte esquema de imunização: na primeira dose foi aplicado 1.0 ml do antígeno (1.5 mg) emulsionado com adjuvante completo de Freund com injeção subcutânea; após cinco semanas a mesma dose com adjuvante completo de Freund foi dividida em duas alíquotas e aplicadas intramuscular em cada uma das coxas. Quinze dias após o sangue foi colhido e o soro testado. Doses re

forço foram feitas a cada vinte dias.

O soro de cavalo anti-SHT foi proveniente do Instituto Pasteur.

Os soros monoespecíficos anti-o e anti-c humanas foram preparados a partir dos soros de carneiro anti-IgG e anti-IgA com absorções específicas, sendo afastada qualquer reatividade com cadeias leves ou outra imunoglobulina.

Tratamento das Imunoglobulinas com Proteinase

Utilizando a relação enzima-imunoglobulina de 1:100, tomou-se 50 ul de enzima (1.25 mg/ml de concentração proteica e atividade específica de 1460) e 500 ul de imunoglobulina (5.0 mg/ml de proteína) em tampão Fosfato de Sódio 0.1 M pH 7.0 e/ou tampão Citrato-Fosfato 0.1 M pH 3.1. Esse material foi incubado na ausência ou presença de ativadores (2Me 15 mM e EDTA 5 mM), a 37°C durante 1 hora e 40' e a seguir congelados a -20°C até o uso.

O seguinte esquema foi obedecido:

Tubo 01 - Ig + Tampão

Tubo 02 - Ig + Tampão + Ativadores

Tubo 03 - Ig + Tampão + Enzima

Tubo 04 - Ig + Enzima + Ativadores

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS (SDS-EGPA)

A eletroforese em gel de poliacrilamida (Fairbanks

e cols, 1971) foi utilizada pelo caráter discriminatório das bandas que representam peptídeos de diferentes pesos moleculares.

O gel de poliacrilamida foi utilizado numa concentração de 5.6% e preparado com tampão Tris-Acetato de Sódio pH 7.5 com 1% de SDS (dodecil sulfato de sódio).

As amostras na concentração inicial (5.0 mg/ml) ou diluídas (2.5 mg/ml), acrescidas de 1% de SDS e 100 mM de DTT, foram aplicadas em colunas (8.5 x 0.5 cm) e submetidas à corrente eletroforética usando-se uma diferença de potencial de 1 mA/tubo/20 minutos para estabilização e a seguir 3 mA/tubo/4 horas e 30'.

A coloração para o gel de poliacrilamida foi feita de acordo com o método de Segrest(1972).

Imunoeletroforese Simples (IES) e Imunoeletroforese Cruzada (IEC)

Com a utilização desses dois testes imunquímicos pode ser observada a discriminação eletroforética das moléculas degradadas ou não pela ação enzimática, associada ao caráter específico da interação antígeno-anticorpo.

As amostras foram analisadas em placas de gel de agarose 1% (9.0 x 12 x 0.15 cm) por eletroforese segundo indicações de Grabar & Willian (1953), com tampão Veronal 0.05 M pH 8.6 e submetidas à uma diferença de potencial de 6 volts/cm/1 hora e 20'. A seguir 100 ul do antissoro foi

aplicado nas canaletas e após 24 horas o gel foi lavado e corado.

A IEC segundo as indicações de Axelsen (1973) foi feita em placas de vidro (9.0 x 12 x 0.15 cm) com agarose 1% em tampão Veronal 0.05 M pH 8.6. As amostras foram analisadas com uma diferença de potencial de 6 volts/cm/1 hora. A seguir, uma faixa central da placa de gel foi substituída pela mistura de gel e imunossoro, procedendo-se a corrida com uma diferença de potencial de 1.5 volt/cm/15 horas.

Os antissoros utilizados na IEC foram diluídos : anti-IgG 1:80, anti-IgM 1:10 e anti-IgA 1:30.

Dosagem de Proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Biureto segundo Weichselbaun (1946); o método de Lowry modificado por E.F: Hartree (1972), utilizando como padrão BSA com $E_{1\%}^{1\text{cm}} \lambda = 280 \text{ nm} = 6.61$. E absorções a 280 nm em espectrofotômetro Zeiss PMQ-II usando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico.

RESULTADOS

Obtenção da Proteinase

O perfil cromatográfico (figura I) representa o fracionamento do extrato de Trypanosoma cruzi (FSp) em Sephadex G-200, uma das principais etapas de purificação da proteinase. A ocorrência da separação de diferentes constituintes moleculares, permitiu a discriminação entre a atividade proteolítica e outras duas proteases ativas sobre substratos sintéticos (BANA e AFNE).

A atividade proteolítica foi concentrada na fração 3 de eluição, conjuntamente com a protease ativa sobre o substrato AFNE (tipo quimotripsina), representando cerca de 20% do material analisado. O volume de eluição comparado com padrões moleculares, confirmou a estimativa do peso molecular (60.000) da proteinase, determinado anteriormente por SDS-EGPA (Araújo, 1979).

Na sequência da purificação, esta fração F3 foi submetida à cromatografia de afinidade em Sepharose mercurial (p-AFMA) com base na propriedade SH-dependente da proteinase, permitindo sua separação da outra enzima contaminante (tipo quimotripsina). A proteinase eluída por ação do 2Me, apresentou uma atividade específica de 1460 (1825 unidades/1.25 mg de proteína), estando purificada 56 vezes.

Testes analíticos de eletroforese e imunoeletrofore

se, bem como ensaios enzimáticos específicos, confirmaram a pureza e especificidade da preparação enzimática empregada a seguir neste trabalho.

Ação Enzimática sobre Imunoglobulinas Humanas

Imunoglobulinas IgG, IgA e IgM purificadas, foram submetidas à ação da proteinase nos pHs 7.0 e 3.1 demonstrados como ótimos para esta enzima.

Os seguintes ensaios foram realizados neste estudo:

1 - Ig + Tampão - controle da imunoglobulina sem ação enzimática, sujeita apenas ao tratamento do pH

2 - Ig + Ativadores - controle onde é acrescentado o efeito dos ativadores

3 - Ig + Enzima - ação enzimática sem efeito dos ativadores

4 - Ig + Ativadores - ação enzimática sob efeito dos ativadores requeridos.

Os ensaios 2 e 3 foram suprimidos na análise das preparações de IgA e IgM porquanto nenhuma diferença significativa com relação aos ensaios 1 e 4 foram observados nos testes analíticos.

Amostras das preparações de imunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) submetidas as diferentes condições foram analisadas pelas técnicas de SDS-EGPA, IES e IEC.

A - Imunoglobulina IgG

Analisando as preparações de IgG a pH 3.1 por SDS-EGPA (figura II) nos tubos controles 1 e 2, a IgG apresenta duas bandas similares, tratando-se de cadeia leve a inferior e cadeia pesada a superior. Nos tubos 3 e 4 com ação da enzima, duas bandas estão presentes, uma delas de baixo peso molecular, não aparecendo nos controles, e outra correspondente à cadeia leve. A banda relacionada com a cadeia pesada não mais aparece sugerindo uma degradação enzimática. A presença dos ativadores parece ter acelerado a reação, por isso no tubo 4 as bandas são menos intensas.

Na análise a pH 7.0 nos tubos 1' e 2' (controles) a dissociação da molécula de IgG é igual apresentando três bandas principais, duas das quais correspondendo à cadeia leve e pesada e uma outra de maior peso molecular, provavelmente a molécula ainda íntegra. Nos tubos 3' e 4' onde houve ação enzimática, estão presentes duas bandas idênticas às encontradas em 3 e 4. Na ausência dos ativadores, como visto no tubo 3', ainda são visíveis várias bandas de fraca intensidade com pesos moleculares intermediários. Na presença dos ativadores, tubo 4', praticamente inexistem essas bandas, sugerindo também uma degradação mais rápida.

Na IES das preparações de IgG frente ao soro anti-IgG a pH 3.1 (figura III), um único sistema precipitante é observado com as quatro amostras. Entretanto com as amostras 3 e 4 a área de precipitação está aumentada com relação aos

controles 1 e 2. A pH 7.0 a presença de um sistema precipitante com as preparações controles 1' e 2' coincide com a amostra 3' submetida a ação enzimática sem ativadores, enquanto a amostra 4' apresenta pelo menos três sistemas precipitantes indicando a atuação dessa enzima sobre a imunoglobulina.

Com o soro anti- δ (figura IV) no pH 3.1, os controles 1 e 2 se apresentam com um único sistema precipitante, o mesmo acontece com o 3 embora com mobilidade eletroforética diferente e com fraca reatividade que desaparece totalmente na amostra 4. A pH 7.0 um único sistema se apresenta nas amostras 1', 2', e 3' (submetida a ação enzimática), enquanto que na amostra 4' pode ser visto dois sistemas com mobilidade eletroforética distinta, indicando presença de fragmentos de cadeia pesada que reagiram com o antissoro.

Na IEC (figura V) frente ao soro anti-IgG, pelo menos dois sistemas precipitantes aparecem com a amostra 3, enquanto apenas um sistema está presente com os controles 1 e 2. Na amostra 4 pode ser visto um único sistema com fraca reatividade diferindo também dos demais controles. A pH 7.0 na reação com as amostras 1', 2' e 3' é visto um único sistema precipitante, enquanto com a amostra 4' observa-se dois sistemas diferentes com alteração no padrão de precipitação.

B - Imunoglobulina IgA

As preparações de IgA resultantes do tratamento enzimático nos dois pHs, quando analisados pelos métodos de SDS-EGPA (figura VI) apresentaram o mesmo padrão de dissociação da molécula de imunoglobulina em todos os tubos, não havendo distinção entre tubos controle e reação. Por essa análise observa-se três bandas principais onde a mais inferior representa cadeia leve, a segunda, cadeia pesada e uma terceira, com peso molecular maior de 70.000, correspondendo provavelmente a peça secretora. Traços de duas outras bandas intermediárias estão presentes podendo tratar-se da molécula dissociada de uma maneira diferente ou contaminantes não identificados. Não estão presentes bandas de baixo peso molecular que correspondam a material digerido.

Na IES (figura VII) das preparações de IgA a pH 3.1 e pH 7.0, frente ao soro anti-IgA pode ser visto um único sistema que se repete com todas as amostras. Resultados similares foram obtidos com o soro anti- α .

Nos testes de IEC (figura VIII) embora os dados se repitam, pode ser notado que sob a ação da proteinase, nos dois pHs, houve uma ligeira alteração do sistema precipitante das amostras 2 e 2' em relação as amostras controles 1 e 1'.

C - Imunoglobulina IgM

Na análise das preparações de IgM por SDS-EGPA (figura IX) são observadas diferentes dissociações da molécula nos dois pHs de tratamento. A pH 3.1, no tubo controle 1, houve pouca dissociação da molécula sem discriminação de bandas. No tubo reação, amostra 2, pode ser visto bandas de fraca intensidade, com a concentração de um componente de baixo peso molecular, sugerindo uma fragmentação enzimática. A pH 7.0, no tubo controle 1', a molécula apresenta-se dissociada em pelo menos três bandas principais. Uma delas a mais inferior correspondendo a cadeia leve e as duas superiores podendo tratar-se de cadeia pesada ou agregados desta. No tubo reação 2', as duas superiores desaparecem e está presente uma banda de componentes de baixo peso molecular, o igual observado no tubo 2.

Na IES (figura X) das preparações de IgM a pH 3.1, frente ao soro anti-SHT, um sistema precipitante foi obtido com as amostras 1 e 2, sendo que na reação com IgM tratada pela enzima o sistema precipitante apresenta-se com mobilidade eletroforética alterada. A análise do controle 1' a pH 7.0 também apresenta um único sistema comparável com o controle 1 a pH 3.1. Com a amostra 2' estão presentes três sistemas precipitantes confirmando uma degradação enzimática. Com o soro anti-IgM, a pH 3.1, uma fraca reação é vista com amostra 2 comparado com o controle 1. A amostra 2' do tratamento no pH 7.0, apresenta um único sistema precipitante com

reação de baixa intensidade, e uma mobilidade eletroforética diferente do controle 1'.

Na IEC (figura XI) com soro anti-IgM no pH 3.1, um sistema precipitante único é observado com a amostra controle 1 enquanto dois sistemas estão presentes com as preparações tratadas com a enzima; a pH 7.0 com a amostra controle 1' também resulta num único sistema precipitante, e com a amostra 2' praticamente desaparece esta reação. Nos resultados em ambos pHs, a reação com as amostras 2 e 2', sugerem uma degradação da molécula.

DISCUSSÃO

A proteinase de Trypanosoma cruzi obtida segundo as condições padronizadas por Araújo (1979), apresentou-se como uma preparação homogênea nos diferentes testes realizados. As características de enzima SH-dependente foram igualmente detectadas nos ensaios realizados em condições ótimas de pH com os substratos caseína a pH 7.0 e/ou hemoglobina pH 3.0. Como sugerido anteriormente, a diversidade do ótimo de pH para a caseína e hemoglobina se deve provavelmente à influência desses substratos no favorecimento da interação com a enzima. Se por um lado a insolubilidade da caseína em pH abaixo de 5.0 limita a ação enzimática, por outro com a protonação da hemoglobina, apareceriam novas cargas na molécula tornando-a mais susceptível à catalise ou favorecendo a combinação enzima-substrato.

As enzimas digestivas a exemplo da pepsina, parecem preferir substratos proteicos desnaturados (Christensen, 1965) enquanto para proteases mais específicas, a conformação molecular do substrato parece ser um requerimento fundamental para a catálise (Habermann, 1970).

A ação da proteinase de Trypanosoma cruzi sobre as imunoglobulinas IgG, IgA e IgM humanas foi estudada nos pHs 7.0 e 3.1, considerando-se que as duas condições podem ser viabilizadas na relação parasito-hospedeiro. A ação a pH 7.0 facilmente ocorrerá em função das condições fisiológicas do

hospedeiro. A ação a pH 3.1 poderá ser favorecida a partir da acidez local mediada por fatores do hospedeiro ou do parasito. A exemplo, no processo inflamatório, com a migração de polimorfonucleares, haverá a produção de ácido láctico local que propicia a atividade das catepsinas liberadas das células. Essas enzimas, são proteases ácidas, com atividade hidrolítica numa faixa de pH 2.5 a 3.5. A acidez produzida para a ação dessas enzimas do hospedeiro poderá favorecer a atuação de enzimas liberadas pelo parasito, (Thomas, 1974).

Diferentes padrões de atuação da proteinase são demonstrados quando as preparações foram analisadas pelos métodos de SDS-EGPA, IES e IEC:

Os testes realizados com a IgG demonstraram a fragmentação enzimática da sua cadeia pesada. O pH ácido parece favorecer uma maior desagregação da molécula de imunoglobulina deixando-a mais susceptível à hidrólise. Nesse pH não se detectou bandas correspondentes à cadeia pesada em SDS-EGPA (figura II), nem reação de precipitação na IES frente ao imunossoro anti- δ (figura IV).

No pH fisiológico, embora o padrão de hidrólise pareça ser o mesmo, a atuação da enzima foi mais branda aparecendo na SDS-EGPA bandas de PM intermediários (figura II).

Na IES frente ao soro anti-IgG (figura III), estão presentes três sistemas precipitantes enquanto apenas dois destes resultam na reação com o soro anti- δ indicando ainda reatividade com determinantes da cadeia pesada. A reação de precipitação observada na IES frente ao imunossoro anti-IgG, resulta

provavelmente da interação com a cadeia leve.

Com outras enzimas proteolíticas a molécula de IgG tem sido fragmentada de diferentes maneiras, permitindo o estudo da estrutura molecular e a sua correlação com a função biológica. Porter (1973) utilizando papaína, obteve dois fragmentos (Fab) que se ligavam ao antígeno e um outro cristalizável (Fc) que fixava complemento. Com a pepsina (Nisonoff e cols, 1975) ou catepsinas D e E (Ghetie & Mihaescu, 1973) são obtidos fragmentos $F(ab')_2$ com a capacidade de se ligarem com o antígeno e pequenos peptídeos. Utsumi (1969) tratando a IgG com papaína em diferentes pHs, obteve fragmentos Fc de variados tamanhos, alguns dos quais não fixavam mais o complemento.

Os resultados da ação da proteinase, demonstraram o comprometimento do fragmento Fc da IgG, visto que a cadeia pesada foi destruída.

Nas diferentes preparações de IgA pouca ou nenhuma ação da enzima de Trypanosoma cruzi foi observada. Nos testes de SDS-EGPA (figura VI) não são encontrados peptídeos de baixo peso molecular que representem produtos de digestão. Nas IES e IEC o número de sistemas precipitantes são coincidentes entre a reação e o controle. Talvez tenha ocorrido um rearranjo na molécula da IgA tratada com a enzima, pois a área do sistema precipitante com esta molécula está ligeiramente aumentada em relação à observada com a IgA controle.

Enzimas proteolíticas liberadas por bactérias patogênicas digerem a molécula de IgA. Essas enzimas são especí

ficas para a subclasse IgA₁, não degradando a IgA₂, que seria resistente, (Plaut, 1978). Somente a cadeia pesada da IgA₁ é degradada por essas proteases enquanto que a peça secretora, cadeia J e cadeia leve não são hidrolisadas (Kilian e cols, 1980).

Os resultados aqui apresentados são decorrência talvez da preparação de IgA obtida de colostro, onde a concentração das moléculas da subclasse IgA₁, susceptíveis à hidrólise, estaria em baixa concentração (Grey e cols, 1968); ou, a própria estrutura da molécula associada à cadeia J e peça secretora, constituiria um fator de resistência à ação enzimática da proteinase.

A presença de peptídeos de baixo peso molecular foi demonstrado nas diferentes preparações de IgM submetidas à proteinase e analisadas por SDS-EGPA (figura IX). Isto sugere uma digestão da molécula de IgM nos dois pHs, havendo entretanto padrão de fragmentação diferente. A dissociação da molécula em pH ácido é reduzida penetrando pouco no gel. Os testes imunoeletroforéticos mostram a alteração no tamanho dos arcos de precipitação (figuras X e XI) e o aparecimento de outros sistemas (figuras X e XI) indicando uma provável ação da proteinase.

A análise da molécula de IgM ficou limitada devido aos imunossoros empregados que apresentaram baixos títulos, e também a falta de um soro anti- μ que iria confirmar ou não a degradação da cadeia pesada.

Na análise da molécula de IgM de diferentes mamífe

ros submetida à ação das enzimas papaína, pepsina e tripsina; essa molécula é hidrolisada em diferentes pontos com produção de fragmentos Fab e Fc (Beale & Van Dort, 1982).

Enquanto a imunoglobulina IgA secretória foi pouco alterada após ação da proteinase, as imunoglobulinas IgG e IgM foram digeridas em diferentes padrões. A presença do ativador acelera a hidrólise enzimática nos pHs 7.0 e 3.1. Na sua ausência a IgG (figura II) e IgM (dados não apresentados) foram igualmente digeridas pela proteinase nos dois pHs.

Considerando a importância das imunoglobulinas na resposta imune humoral, o seu comprometimento pode ser um dos fatores que colaborem para a permanência e instalação do parasito. Com a digestão da cadeia pesada, a porção Fc perde sua capacidade de fixar complemento e atuar na fagocitose (Ferrante & Jenkin, 1977).

Imunoglobulinas na superfície de formas sanguícolas de Trypanosoma cruzi já foram descritas anteriormente, através das técnicas de imunofluorescência com soros anti-imunoglobulinas marcadas ou através da reação de lise mediada por complemento (Brener, 1982).

Se a clivagem enzimática das imunoglobulinas ocorrer "in vivo" serão justificados os resultados de Krettli e cols (1980), que demonstraram a presença de fragmentos Fab aderidos ao parasito; bem como reproduzirá o mecanismo de fagocitose descrito em outro modelo experimental (Eisen & Tallan, 1977), onde fragmentos Fab são encontrados na super

ficie de Tetrahymena pyriformes.

A proteinase de Trypanosoma cruzi está presente na superfície das formas evolutivas de várias cepas, como de mostrado com soro anti-proteinase (Rangel e cols, 1981b). Utilizando os anticorpos IgG purificados anti-proteinase Araújo e cols (1981), observaram que esses anticorpos não interferem na atividade enzimática "in vitro" pois a enzima no complexo antígeno-anticorpo (enzima-anti-enzima) continua ativa sobre o substrato. A inexistência da neutralização dessa enzima, decorre provavelmente do fato desses anticorpos não possuírem especificidade para o sítio ativo. É possível que anticorpos similares produzidos durante a infecção chagásica (dados não publicados) não constituam um impedimento para a atividade da proteinase.

Embora o papel biológico dessa enzima não esteja esclarecido, a sua atividade à distância é provavelmente limitada, pois os inibidores plasmáticos alfa₁-antitripsina, alfa₂-macroglobulina e anti-trombina III, como demonstrado "in vitro", inibem a proteinase (Atta, 1982). Por outro lado os resultados da atividade inibitória e os níveis desses inibidores no soro de pacientes chagásicos na fase crônica, sugerem uma inativação de partes dessa proteína durante esta fase da doença. Sua ação deve estar restrita à moléculas de proteínas aderidas à superfície do parasito ou contidas no local da infecção. Desta maneira, moléculas de anticorpos ou outros fatores séricos poderão ser comprometidos.

O significado da degradação enzimática das imunoglo

bulinas, em especial da IgG, está sendo investigada neste laboratório, tendo sido apresentados dados preliminares que indicam o comprometimento do fragmento Fc na atividade de fixação do complemento (Araújo e cols, 1983).

RESUMOS E CONCLUSOES

As imunoglobulinas humanas IgG e IgM séricas e IgA de colostro foram submetidas à ação da proteinase de Trypanosoma cruzi "in vitro". A enzima obtida em condições padrões do extrato de epimastigotas (Araújo, 1979) foi purificada 56 vezes e contendo 1825 unidades/mg. As preparações de imunoglobulinas resultantes do tratamento enzimático em condições ótimas de pH (pH 7.0 e pH 3.1) e os controles adequados, foram analisados em eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS 1% e DTT 100 mM), imunoeletroforese simples e bidimensional frente a imunóssoros específicos.

A degradação da molécula de IgG foi observada na eletroforese em gel de poliacrilamida, na comparação entre a preparação controle e a tratada com a enzima, onde a banda correspondente à cadeia pesada desaparece, havendo concentração de fragmentos de baixo peso molecular em nova banda de proteínas. A imunoeletroforese com os soros anti-IgG e anti- δ , comprovam o comprometimento da molécula, pois desaparece a reatividade da cadeia pesada com o soro anti- δ .

Com as preparações de IgA, tratadas ou não com a enzima, não foi detectada fragmentação da molécula de imunoglobulina, nem nos testes de eletroforese em gel de poliacrilamida, nem nas reações de precipitação das imunoeletroforeses. Pouca ou nenhuma ação da proteinase sobre a IgA secretória deve ter ocorrido.

Na análise das diferentes preparações de IgM por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, bandas de baixo peso molecular são detectadas nos géis contendo IgM tratada com enzima. Padrões diferentes de precipitação são observados entre controles e preparações com enzima nos testes de imunoeletroforese frente aos imunossoros anti-SHT e anti-IgM. Estas observações sugerem uma degradação da molécula de IgM não se podendo concluir sobre o grau de comprometimento da molécula, especialmente a degradação da cadeia pesada pela ausência de testes com um soro anti- μ .

As diferenças de pH influenciaram nos padrões de degradação enzimática das preparações de IgG e IgM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, S.G., 1978. Possibilidade de incorporação de proteínas do hospedeiro pelo Trypanosoma cruzi. Revta. Inst. Med. Trop., S. Paulo, 20 (5): 279
- _____ & Andrade, Z.A., 1978. Estudo comparativo das lesões produzidas por uma cepa do Trypanosoma cruzi no homem e em outros vertebrados. In: Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 5., Caxambú, M.G. Resumo
- _____ & Gremaund, J.A., 1982. Miocardite chagásica crônica experimentalmente do camundongo : estudo histológico e ultraestrutural, imunotipagem do colágeno. In: Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 9., Caxambú, M.G. Resumo
- Anson, M.L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. gen. Physiol., 22: 79
- Araújo, P.M.F.; Costa, M.G.; Repka, D. & Rangel, H. A., 1978. Isolation and characterization of

a neutral proteinase of Trypanosoma cruzi. In: Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 5., Caxambú, M.G. Resumo

_____ Isolamento e caracterização de uma proteínase dos lisados de Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909). Campinas, 1979. p.46. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia

_____; Sakurada, J.K.; Gomes, L. & Rangel, H.A., 1981. Influência de anticorpos anti-proteinase de Trypanosoma cruzi na atividade proteolítica "in vitro". In: Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 8., Caxambú, M.G. Resumo

_____; _____; Repka, D. & Rangel, H.A. 1983. Comprometimento da fixação de complemento pela IgG de soros humanos chagásicos após ação da proteínase de Trypanosoma cruzi. In: Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 10., Caxambú, M.G. Resumo

Atta, A.M. Ação dos inibidores plasmáticos humanos sobre a atividade da proteinase do Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909). Campinas, 1982. p.

72. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia

Auriault, C.; Ouaiissi, M.A.; Torpier, G.; Eisen, H. & Capron, A., 1981. Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of Schistosoma mansoni schistosomula. Parasite Immunol., 3: 33

Axelsen, N.H.; Kroll, J. & Weeke, B., 1973. A manual of quantitative immunoelectrophoresis: methods and applications. Oslo, Universitetsforlaget.

Beale, D. & Van Dort, T., 1982. A comparison of the proteolytic fragmentation of immunoglobulins M from several different mammalian species. Comp. Biochem. Physiol., 71B (3): 475

Bidwell, E. & Van Heyniger, W.E., 1948. The biochemistry of gas gangrene toxins. The K toxin of Clostridium welchii. Biochem. J., 42: 140

Bongertz, V. & Hungerer, K.D., 1978. Trypanosoma cruzi: Isolation and characterization of a protease. Expl. Parasit., 45:8

- Brener, Z., 1982. Recent developments in the field of Chaga's disease. Bull. World Health Org., 60 (4): 463
- Cammer, W.; Bloom, B.R.; Norton, W.T. & Gordon, S., 1978. Degradation of basic proteins in myelin by neutral proteases secreted by stimulated macrophages: a possible mechanism of inflammatory demyelination. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. , 75 (3): 1554
- Chapman, C.B. & Mitchell, G.F., 1982. Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by Fasciola hepatica. Vet Parasitol., 11: 165
- Christensen, L. K., 1965. Concerning the pH optimum on peptic hydrolyses. Arch. Biochem. Biophys., 57: 163
- Coura, J.R., 1978. Características da doença de Chagas. In: Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 5., Caxambú, M.G. Resumo
- Dresden, M.H. & Asch, H.L., 1972. Proteolytic enzymes in extracts of Schistosoma mansoni cercariae. Biochem. biophys. Acta , 289 (2), 378

- Duhamel, R.C.; Schur, P.H.; Brendel, K. & Meezan, E.
1979. Gradient elution of human IgG₁, IgG₂
and IgG₄ from Protein A. J. Immun. Meth., 31:
211
- Dvorak, J.A., 1977. Host-Parasite relationship
at the cellular level in Trypanosoma cruzi infec
tion. PAHO, 347: 1
- Eisen, H. & Tallan, I., 1977. Tetrahymena pyrifo
rmis recovers from antibody immobilisation by
producing univalent antibody fragments. Natu-
re, Lond, 270:514
- Fairbanks, G.; Steck, T.E. & Wallach, D.F.H., 1971.
Electroforetic analysis of the major polypepti
des of the human erythrocyte membrane. Bioche
mistry, N.Y., 10 (13): 2606
- Fernandes, J.P. & Castellani, O., 1966. Growth
characteristics and chemical composition of
Trypanosoma cruzi. Expl. Parasit., 18: 195
- Ferrante, A. & Jenkin, C.R., 1977. Surface immu
noglobulins, a possible mechanism for the persis
tense of Trypanosoma lewise in the circulation
of rats. Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 55(3):
275

Figueiredo, F. & Ribeiro dos Santos, R., 1982.

Cardite chagásica produzida em coelhos experimentalmente infectados com Trypanosoma cruzi. In: Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 9., Caxambú, M.G. Resumo

_____ ; Rossi, M.A. & Ribeiro dos Santos, R., 1983.

Estudo ultraestrutural do coração de coelhos cronicamente infectados pelo Trypanosoma cruzi. In: Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas,, 10., Caxambú, M.G. Resumo

Flodin, J., 1962. Dextran gels and their application in gel filtration. Sweden, Uppsala, 85 p

Fong, D. & Chang, K.P., 1981. Protease activity of a parasitic protozoan, Leishmania mexicana. J. Cell Biol., 91 (2 part 2): 43a

Ghetie, V. & Mihaescu, S., 1973. The hydrolisis of rabbit immunoglobulin G with purified cathepsins D and E. Immunochemistry, 10: 251

Grabar, P. & William, C.A., 1953. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines: application au sérum sanguin. Biochim.

biophys. Acta, 10: 193

Grey, H.M., Avel, C.A. & Yount, W.J., 1968. A subclass of human δ A-globulins (δA_2) which lacks the disulfide bonds linking heavy and light chain. J. exp. Med., 128: 1223

Habermann, E., 1970. Kininogens. In: Erdős, E. G., ed. Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. Berlin, Springer-Verlag. p. 250 (Handbook of Experimental Pharmacology, v. 25)

Hartree, E.F., 1972. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Analyt. Biochem., 48: 422

Higrichi, M.L.; Lopes, L.A.; Hawabe, L. & Pillegi, F. 1978. Aspectos ultraestruturais da miocardite chagásica crônica humana. In: Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 5., Caxambú, M.G. Resumo

Holzer, H.; Bertz, H. & Ebner, E., 1975. Intracellular proteinolysis in microorganisms. In: Horvick, B.L. & Stadtman, E.R., ed. Current Topics in Cellular Regulation, New York, Press. p. 103, v.9

- Itow, S. & Camargo, E. P., 1977. Proteolytic activities in cell extracts of Trypanosoma cruzi. J. Protozool., 24 (4): 591
- Kabat, E.A. & Mayer, M.M., 1968. Immunoquimica Experimental. In: Kabat, E.A. & Mayer, M.M.ed. La Prensa Medica Mexicana.
- Kilian, M.; Mestecky, J.; Kulhavy, R.; Tomona, M. & Butler, W.T., 1980. IgA₁ proteases from Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis and Streptococcus sanguis: comparative immunochemical studies. J. Immun., 124 (6): 2596
- Kipnis, T.L.; David, J.R.; Alper, C.A.; Sher, A. & Silva, W.D., 1981. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of Trypanosoma cruzi into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake macrophages. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 78 (1): 602
- Kloetzel, J. & Deane, M.P., 1977. Presence of immunoglobulins on the surface of bloodstream Trypanosoma cruzi. Capping during differentiation in culture. Revta. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 19 (16) : 397

- Körberle, F., 1974. Pathogenesis of Chagas' Disease. Ciba Fnd. Symp., 20: 137
- Krettli, A.U.; Thomas, M. & Eisen, H., 1980. Escape mechanisms of Trypanosoma cruzi from the host immune system. In: Israel, L.; Lagrange, P. & Salomon, J.C., ed. Les Colloques de l'IN SERN. v. 97. 553
- Mac Lennan, J.D., 1962. The histotoxic clostridial infection of man. Bacteriol. Rev., 26:117
- Meyer, H.; Mussachio, M.O. & Mendonça, I.A., 1958. Electron microscopic study of Trypanosoma cruzi in thin sections of infected tissue culture and blood agar forms. Parasitology, 48:1
- Micheli, A. & Isliker, H., 1966. Cleavage of γ M globulin by means of reducing enzyme systems. Immunochemistry, 3:385
- Mihalyi, E., 1972. Application of proteolytic enzymes to protein structure studies. In: Weast, R.C., ed. C.R.C. Press; 279 p.
- Miranda Santos, I.K.F. & Campos Neto, A., 1981. Receptor for immunoglobulin Fc on pathogenic but

on nonpathogenic protozoa of the Trypanosomatidae. J. exp. Med., 154: 1732

Mitchell, G.F., 1979. Responses to infection with metazoan and protozoan parasites in mice. Adv. Immun., 28: 451

Newcomb, R.W.; Normasell, D. & Stanworth, D.R., 1968. A structural study of human exocrine IgA globulin. J. Immun., 101: 905

Nisonoff, A.; Hopper, J.E. & Spring, S.B., 1975. The antibody molecule. New York, Academic.

O'Dally, J., 1975. A new liquid medium for Trypanosoma cruzi. J. Protozool., 22 (2): 265

_____, 1976. Effect of fetal calf serum fractions and proteolysis on division and transformation of Trypanosoma cruzi in vitro. J. Protozool., 23 (4): 577

Pereira, S.M.G.; Repka, D.; Rangel, H.A.; Bonfinto, M.; Araújo, P.M.F.; Sakurada, J.K.; Atta, A.M. & Camargo, I.J.B., 1980. Localização da proteinase do Trypanosoma cruzi em tecidos de camundongos infectados. In: Reunião Anual de Pesquisa

Básica em Doença de Chagas, 7., Caxambú, M.G.

Resumo

Plaut, A.G.; Gilbert, J.V.; Artenstein, M.S. & Capra, J.D., 1975. Neisseria gonorrhoeae and Neisseria meningitidis: extracellular enzyme cleaves human IgA. Science N.Y., 190: 1103

_____, 1978. Microbial IgA proteases. New. Engl. J. Med., 298 (26): 1459

Porter, R.R., 1973. Structural studies of immunoglobulins. Science N.Y., 180: 713

Ramirez, L.E.; Vargas, M. & Brener, Z., 1982. Histopathology of rabbits chronically infected with Trypanosoma cruzi. In: Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 9., Caxambú, M.G. Resumo

Rangel, H.A.; Araújo, P.M.F. & Costa, M.G., 1977. A neutral proteinase of the epimastigotes forms of Trypanosoma cruzi. In: Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 4., Caxambú, M.G. Resumo

_____; _____; Repka, D. & Costa, M.G., 1981a.

Trypanosoma cruzi: Isolation and characterization of a proteinase. Expl. Parasit., 52: 199

Rangel, H.A.; Araújo, P.M.F.; Camargo, I.J.B.; Bonfido, M.; Repka, D.; Sakurada, J.K. & Atta, A.M., 1981b. Detection of a proteinase common to e pimastigote, trypomastigote and amastigote of different strains of Trypanosoma cruzi. Tropen - med. Parasit., 32: 87

Reich, E.; Rifkin, D.N. & Shaw, E., 1975. Proteases and biological control. In: Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, ed. v.2

Repka, D.; Rangel, H.A. & Costa, M.G., 1972. Atividade proteolítica de Trypanosoma cruzi. Cien. Cult. S. Paulo, 24 (6): 296

Schlemper Jr, B.R.; Avila, C.M.; Coura, J.R. & Brenner, Z., 1982. Histopathological lesions in mice chronically infected with seventeen Trypanosoma cruzi strains. In: Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, 9., Caxambú, M.G. Resumo

Segrest, J.P. & Jackson, R.L., 1972. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis

crilamide gel electrophoresis in SDS. Methods
in Enzymology, 28: 54

Silva, L. H. & Nussensweig, V., 1953. Sobre uma
cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta pa-
ra o camundongo branco. Folia Clin. Biol., S.
Paulo, 20:191

Sluyterman, L.A. & Wijdenes, J., 1970. An agaro-
se mercurial column for the separation of mer-
captopapain and nonmercaptopapain. Biochem.
biophys. Acta, 200: 590

Stirewalt, M.A. & Austin, B.E., 1973. Collection
of a secreted protease from the preacetabular
glands of cercariae of Schistosoma mansoni. J.
Parasit., 59 (4): 741

_____, 1978. Quantitative collection and pro-
teolytic activity of preacetabular glands enzy-
me(s) of Schistosoma mansoni. Am. J. trop.
Med. Hyg., 27 (3): 548

Tabel, H. & Lasos, G.J., 1980. Absence of host
protein from the surface of Trypanosoma vivax of
cattle. Vet Parasitol., 7: 297

Tafari, W.L. Alterações ultra-estruturais dos com

ponentes muscular, intersticial e nervoso do coração e intestinos, na doença de Chagas experimental e humana. Belo Horizonte, 1974. p. 211
Tese (professor titular). Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Anatomia e Medicina Legal

Tafuri, W.L.; Rocha, O.A.; Chiari, C.A.; Raso, P. & Bambirra, E.A., 1980. Microscopia eletrônica do miocárdio e do tecido muscular estriado esquelético do camundongo albino inoculado com Trypanosoma cruzi da cepa Colombiana. In: Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas. 7., Caxambú, M.G. Resumo

Thomas, L., 1974. Inflammation as a disease mechanism. In: Zweifach, B.W.; Grant, L. & McCluskey, R.T., ed. New York. v.3

Torpier, G.; Capron, H. & Ouaiissi, M.A., 1979. Receptor for IgG (Fc) and human β_2 -mioglobulin on Schistosoma mansoni schistosomulo. Nature, 278: 447

Uriel, J., 1971. Methods in immunology and immunology. In: Williams, C.A. & Chase, M.W., ed. New York, Press. v. 3 , p. 249

Utsumi, S., 1969. Stepwise cleavage of rabbit immunoglobulin G by papain and isolation of four types of biologically active Fc fragments. Biochem. J., 112: 343

Weichselbaum, T.E., 1946. An accurate and rapid method for determination of protein in small amount of blood serum and plasma. Amer. J. clin. Path. tech., 10, 40

Errota

página 07, 3º parágrafo, 3ª linha

... pelos parasitos, os quais degradam... (lê-se)

... pelos parasitos, as quais degradam...

página 15, 2º parágrafo, 1ª linha

... monoespecífico anti-o e anti-c ... (lê-se)

... monoespecífico anti- δ e anti- α ...

página 19, 1º parágrafo, 11ª linha

4 - Ig + Ativadores - ... (lê-se)

4 - Ig + Ativadores + Enzima - ...