

ESTUDO DAS MANIFESTAÇÕES DE VÁRIAS PROTEINASES DO *Trypanosoma cruzi*: ANTICORPOS MONOCLONAIS

Maria Angela Orsi

Orientadora: Prof. Dra Julia Keiko Sakurada

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Maria Angela Orsi
e aprovada pela Comissão Julgadora.

20/11/95
Julia Sakurada

Tese apresentada à Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Imunologia.

Campinas

1995

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
* CHAMADA :	T/UNICAMP
	Or8e
Ex.	
COMBO BC/	27/09
ROC.	667/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
RECO	86.11.09
DATA	21/03/96
* CPDC	M.00025344-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Or8e Orsi, Maria Angela
Estudo das manifestações de várias proteinases do
T. cruzi : anticorpos monoclonais / Maria Angela Orsi.
-- Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador : Julia Keiko Sakurada.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia.

1. Proteinase. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Anticorpos
monoclonais. I. Sakurada, Julia Keiko. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 20 de novembro de 1995.

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Profa. Dra Júlia Keiko Sakurada (Orientadora)

Júlia Keiko Sakurada

Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo

Paulo Maria Ferreira de Araújo

SUPLENTE

Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel

APROVADA

**ESTUDO DAS MANIFESTAÇÕES DE VÁRIAS PROTEINASES DO *Trypanosoma*
cruzi: ANTICORPOS MONOCLONAIS**

À Giulia, pela sua presença, e
ao Anthony, pelo companherismo.

Aos meus pais, por terem
dado sentido à minha vida.

*À Dirce, que com a sua presença
amiga, suavizou minha caminhada.*

"NÃO ME IMPORTA A DURAÇÃO DA JORNADA, O QUE IMPORTA É QUE MEUS PÉS NÃO PAREM DE CAMINHAR, QUE AS MINHAS MÃOS AJUDEM A CONSTRUIR, QUE A MINHA MENTE SE ENRIQUEÇA PARA COMPREENDER, QUE O MEU CORAÇÃO SE ENCHA DE AMOR PARA DAR. O QUE IMPORTA É QUE QUANDO A CAMINHADA CHEGAR AO FIM, EU TENHA DEIXADO ALGO ATRÁS DE MIM, QUE MINHAS MÃOS NÃO ESTEJAM VAZIAS, ENFIM, A MINHA JORNADA NÃO TENHA SIDO EM VÃO."

autor desconhecido

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); contou com apoio financeiro das seguintes instituições: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da Unicamp (FAEP).

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Julia Keiko Sakurada, pelo estímulo e conselhos no direcionamento dos trabalhos.

À direção da coordenadoria de Laboratórios do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, e ao Sr. José Guedes Deak, chefe do LARA/Campinas.

Aos amigos do LARA, do curso de Pós-graduação em Imunologia, funcionários e amigos dos Laboratórios 2 e 3 onde o trabalho foi desenvolvido, e amigos pessoais, pelo companheirismo e horas de prazer e dúvidas.

À Maria Altina da Conceição Luiz "Tatá Maria", por sua disponibilidade e compreensão.

Aos professores: Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo e Dr. Humberto de Araújo Rangel, pelas críticas e sugestões ao presente trabalho, por ocasião de sua análise prévia.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Imunologia e aos seus professores, pelo apoio recebido.

ABREVIATURAS

DMSO - Dimetil sulfóxido

EDTA - Ácido dissódico etilenodiamino tetracético

FS - Fração solúvel do parasita

ME - 2- Mercaptoetanol

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TCA - Ácido tricloroacético

TLCK - Tosil-L-lisina clorometil cetona

PMSF - Fluoreto de fenil metil sulfonil

SFB - Soro fetal bovino

SPF - Livre de patogénos específicos

BSA - Soro albumina bovino

LIT - Meio Triptose infusão de fígado

LLC-MK2 - Célula de rim de macaco Rhesus

SDS/PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida
contendo SDS

PBS-GE-T - PBS contendo 0,25% de gelatina e 0,05% de
Tween 20

PBS-T-PBS contendo 0,05% de tween

Ig - Imunoglobulina

I.p. - Via intraperitoneal

S.c. - Via subcutanea

PEG - Polietileno glicol

HAT- Hipoxantina, aminopterina e timidina

HT - Hipoxantina e timidina

TS - Tripomastigota sangüícola

E - Epimastigota

P - Proteinase

TC- Tripanosoma de cultura celular

PBS - Salina fosfato tamponada

AcMO - Anticorpo monoclonal

IFI - Imunofluorescência Indireta

ÍNDICE

	pág.
I - INTRODUÇÃO.....	01
II - MATERIAIS E MÉTODOS.....	09
1. Animais.....	09
2. Cepas do <i>T. cruzi</i>	09
3. Purificação da Proteinase.....	10
4. Dosagem da atividade enzimática.....	11
5. Determinação da concentração proteica.....	12
6. Preparo de antígenos do parasita.....	12
7. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	13
8. Atividade enzimática em SDS-PAGE-Gelatina.....	13
9. Immunoblotting.....	14
10. Preparação de anticorpos monoclonais.....	15
10.1. Esquema de Imunização.....	15
10.2. Suspensões celulares.....	15
10.3. Soluções e meios de cultura para hibridização.....	16
10.4. Hibridização.....	17
10.5. Clonagem.....	18
10.6. Indução de Ascites.....	18
11. Caracterização dos anticorpos monoclonais.....	19
11.1. Determinação da classe e subclasses Ig dos AcMo...19	
11.2. Imunofluorescência indireta.....	19
11.3. ELISA direto e Indireto.....	20

12. Efeito biológico AcMo "in vitro".....	22
12.1. Opsonização do parasita.....	22
12.2. Efeito do AcMo na penetração do parasita.....	22
12.3. Efeito do AcMo na proliferação do parasita.....	23
III - RESULTADOS	25
1. Estudo da proteinase de <i>T.cruzi</i>	25
2. Obtenção e caracterização dos AcMo.....	33
3. Clonagem dos híbridos	35
4. Caracterização dos AcMo por ELISA, IFI e classe e isótipo de imunoglobulina.....	41
5. Caracterização dos antígenos do <i>T.cruzi</i> reativo com AcMo.....	45
6. Efeito biológico dos AcMo.....	50
6.1. Penetração do parasita em células hospedeiras.....	50
6.2. Proliferação do <i>T.cruzi</i>	51
IV - DISCUSSÃO	57
V - CONCLUSÕES	68
VI - RESUMO	70
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado, transmitido em condições naturais, pelo triatómideo hematófago da família Reduviidae. O estágio infectante do parasita, o tripomastigota metacíclico, é eliminado nas fezes do vetor. De forma geral, a infecção do homem e de outros hospedeiros se dá através da contaminação de lesões ou de mucosas intactas. Existem outras formas de transmissão que são típicas de áreas urbanas desenvolvidas: transfusão sangüínea e infecção oral (DIAS, 1979), infecções acidentais em laboratórios (MARSDEN, 1983; BRENER, 1987), transmissão congênita (HOWARD et alli, 1968; DIAS, 1979; BRENER, 1987) e transplantes de órgãos (BRENER, 1987).

A forma tripomastigota do *T. cruzi* infectam uma variedade de hospedeiros vertebrados e diferentes células, apresentando um acentuado tropismo por vários tipos celulares, fibras musculares, tecido nervoso e especialmente células macrofágicas (ZINGALES AND COLLI, 1985). Nestas, transformam-se em amastigota e multiplicam-se intensamente; diferenciam-se em tripomastigota (forma com flagelos) que, rompendo as células do hospedeiro, circulam no sangue e invadem outras células, dando seqüência a um novo ciclo.

Os danos teciduais do hospedeiro resultam, freqüentemente, em miocardite, devido à destruição do músculo cardíaco e de gânglios associados; ou em mega-esôfago e mega-cólon, distensão e alargamento do esôfago e intestino, causados pela destruição e

desnervação das células do músculo liso desses órgãos.

Existem evidências de importante participação das proteases dos parasitas, atuando na interação com o hospedeiro, na destruição de tecidos, e facilitando a invasão e inativação das proteínas dos hospedeiros que são deletérias ao parasita (MCKERROW et alli, 1985; MCKERROW et alli 1993).

Atividades proteolíticas foram identificadas nos extratos da forma epimastigota do *T. cruzi* (REPKA et alli, 1972 ; BONGERTZ AND HUNGERER, 1978; RANGEL et alli, 1981 b). Esses estudos mostraram a existência de atividade proteolítica em extrato de epimastigota, detectada tanto em pH 3, quanto em pH 7, utilizando como substrato respectivamente a hemoglobina e a caseína (REPKA et alli, 1972).

Estudos posteriores indicavam também a presença de atividade esterásica nesse extratos de epimastigota (RANGEL et alli, 1977). ITOW AND CAMARGO (1977), utilizando quatro diferentes substratos de protease, demonstraram a presença de atividades proteolíticas dos tipos aminopeptidásica, tripsina-símile, quimiotripsina-símile, e uma grande quantidade de protease com ação sobre a azocaseína nesses extratos.

BONGERTZ AND HUNGERER (1978) isolaram e caracterizaram uma proteína, com peso molecular de 200 kDa, dos extratos de epimastigota que apresentavam atividade transamidásica. Uma proteinase, SH-dependente, com 60 kDa, foi isolada, caracterizada por RANGEL et alli (1981 a) e detectada na superfície das formas epimastigota, amastigota e tripomastigota, de cinco diferentes cepas do parasita (RANGEL et alli, 1981 b).

Posteriormente, BONTEMPI et alli (1984) isolaram uma glicoproteína de 58-60 kDa, caracterizada como uma cisteína proteinase. Esta cisteína proteinase, denominada cruzipaina (CAZZULO et alli, 1989), apresentava homologia com a papaína e a catepsina L, e foi detectada nos lisossomos e na bolsa flagelar do parasita (BONTEMPI et alli, 1989; SOUTO-PADRÓN et alli, 1990). MURTA et alli (1990) mostraram que a glicoproteína GP 57/51, de superfície, anteriormente isolada por SCHARFSTEIN et alli (1986), possuía atividade proteinásica SH-dependente e era homóloga à catepsina L. EAKIN et alli (1992) consideram que as enzimas isoladas por RANGEL et alli (1981 a), BONTEMPI et alli (1984) e SCHARFSTEIN (1986) não diferem entre si.

Com a utilização do método de eletroforese, em gel de poliacrilamida na presença de gelatina, GREIG AND ASHALL (1990) constataram, no extrato de epimastigota da cepa Y, a existência de cinco bandas com atividade enzimática e com pesos moleculares variando de 200 a 50 kDa. Quatro dessas enzimas apresentavam características de cisteína-proteinases, com atividade ótima em pH 5,0. Uma outra, com 60 kDa, associada à membrana, foi caracterizada como sendo uma metalo-proteinase ativa em pH alcalino.

Estudos realizados no sentido de caracterizar as proteinases SH-dependentes têm mostrado uma variação muito ampla no seu peso molecular, seja nos extratos brutos ou em frações purificadas. BONALDO et alli (1991 b) mostraram, em estudos com epimastigota metabolicamente marcado, que a cruzipaina é sintetizada como uma molécula de 60 kDa e, por processo

autocatalítico, é convertida em uma molécula madura de 45-50 kDa. MARTINEZ AND CAZZULO (1992) mostraram que o peso molecular da cruzipaina pode variar de 51 a 33 kDa, dependendo das condições experimentais.

A proteína recombinante, obtida por EAKIN et alli (1992), com peso molecular de 28 kDa, apresentava as mesmas características das proteinases descritas anteriormente, com aumento da atividade enzimática com ditionitrito e inibida por TLCK e E64, inalterada pelo PMSF e pela 1,10-Fenantroline.

O estudo do seqüenciamento da região amino terminal da proteína recombinante, realizado por EAKIN et alli (1992), apresenta homologia de 59,2% com a cisteína protease do *T.brucei*, e 42,2% com a catepsina L murina, conforme descrito anteriormente por CAZZULO et alli (1989) e MURTA et alli (1990).

A análise de mRNA feita por EAKIN et alli (1992) mostrou que diferentes formas do parasita apresentam a mesma enzima e que a forma intracelular (amastigota) apresenta nível 2X maior de expressão da enzima. Entretanto, nos estudos realizados por CAMPETELLA et alli (1990), com os extratos de parasita, a atividade enzimática mostrou um nível 10X maior da enzima na forma epimastigota, quando comparada com as formas tripomastigota e amastigota.

Estudos dos genes que codificam a preproenzima das cisteína-proteinases dos tripanosomatídeos mostram que são compostos de uma extensão de 145 aminoácidos na porção carboxi terminal, caracterizada por repetição de 6 resíduos de treonina. Na enzima madura, esses resíduos de treonina se localizam na

porção amino terminal da proteinase. O mecanismo de processamento da preproenzima para enzima madura não está claro. Estudos realizados com a papaína, também pertencente à família cisteína-proteinase, mostraram que a mobilização de resíduos de treonina não ocorre nessa enzima. Nos tripanosomatídeos, esse domínio pode ser removido autocataliticamente, conforme as evidências apresentadas por ASLUND et alli (1991).

O isolamento e seqüenciamento do gene que codifica a cruzipaina puderam esclarecer as variações no peso molecular. EAKIN et alli (1992) encontraram peso molecular de 36 kDa para a enzima, e de 14 kDa para o domínio carboxi-terminal, aproximadamente a metade do valor encontrado para preparações endógenas (60 e 25 kDa).

A diferenciação da forma epimastigota para tripomastigota metacíclico é acompanhada pela redução de 2 a 5X na concentração da GP57/51, determinada pelo método de radioimunoensaio realizado por BONALDO et alli (1991 b).

A maioria dos estudos sobre as proteases do *T. cruzi* foram realizados utilizando-se a forma epimastigota do parasita, embora a enzima SH-dependente tenha sido detectada nas diferentes formas evolutivas do parasita (RANGEL et alli, 1981 b). Um estudo sistemático das enzimas presentes em tripomastigota e amastigota ainda se faz necessário. Nesse sentido, CAMPETELLA et alli (1990) realizaram estudos comparativos das enzimas presentes nas formas epimastigota de diferentes cepas do *T. cruzi* e das diferentes formas evolutivas da cepa RA. Estes autores observaram que o *T. cruzi* expressava uma banda de 60 kDa com

atividade enzimática. No estudo das três formas do parasita, realizado em pH ácido, verificaram que a forma amastigota apresentava moléculas com atividade enzimática de peso molecular ligeiramente superior às encontradas nas formas tripomastigota e epimastigota.

A caracterização da presença da enzima em diferentes formas evolutivas do parasita foi realizada utilizando-se antisoros específicos para a proteinase isolada da forma epimastigota (RANGEL et alli, 1981 a; CAMPETELLA et alli, 1990 ; SAKURADA et alli, 1992 ; BONALDO et alli, 1991 a). Esses autores mostraram que tais anticorpos reconheciam estruturas similares nas diferentes formas evolutivas do parasita.

O papel biológico da proteinase não está bem elucidado, além de existirem controvérsias quanto à sua localização lisossomal (SOUTO-PADRÓN et alli, 1990), ou na superfície do parasita (RANGEL et alli, 1981 b). O mesmo se pode dizer sobre a sua importância no metabolismo do parasita (BONTEMPI et alli, 1989; HARTH et alli, 1993), na diferenciação do *T. cruzi* (BONALDO et alli, 1991 a). SOUTO-PADRÓN et alli, (1990) mostraram que as enzimas proteolíticas do *T. cruzi* favorecem a interação do parasita e das células hospedeiras. ARAÚJO-JORGE et alli (1986) estudando o efeito do inibidor plasmático alfa-2-macroglobulina, concluíram que a protease da superfície e/ou secretada pelo *T. cruzi*, pode modular sua habilidade para infectar células do hospedeiro.

Estudos recentes mostram que os inibidores sintéticos da protease do parasita, derivados do diazometano e do fluometil

cetona, inibem a invasão de células e detem a proliferação do parasita (MEIRELES et alli, 1992), bem como a transformação de tripomastigota para amastigota, e também de amastigota para tripomastigota (HARTH et alli, 1993).

Estudos desenvolvidos em nosso laboratório mostraram que a enzima do parasita é capaz de degradar cadeia pesada das imunoglobulinas humanas da classe IgM e IgG em fragmentos de baixo peso molecular (GOMES, 1984).

Mais recentemente, BONTEMPI AND CAZZULO (1990) confirmaram esse achado, utilizando Imunoglobulina G humana, que eram clivadas pela protease do parasita em fragmentos (Fab')₂ e digerindo a cadeia pesada em pequenos peptídeos. SAKURADA et alli (1991) também observaram utilizando a IgM e IgG murina, a digestão da cadeia pesada em pequenos fragmentos, dentre os isótipos de IgG murina, IgG1 e IgG2b foram degradadas tanto as cadeias pesadas como as cadeias leves em pequenos peptídeos. Observaram ainda que o colágeno, a alfa-2-macroglobulina e a proteína básica de mielina podiam ser clivadas pela proteinase do *T.cruzi* em pequenos fragmentos. O conjunto destes resultados apontam para um papel da enzima SH-dependente no escape do parasita as defesas do hospedeiro. SAKURADA et alli (1992) mostraram que anticorpos policlonais anti-proteinase induziam proteção contra desafio com o parasita em até 30 LD₅₀, sugerindo sua especificidade contra a sítio ativo da enzima.

Estudos sobre a estruturas da enzima permitiram a construção e utilização de peptídeos sintéticos, inibidores da penetração do parasita em células hospedeiras. Este tipo de

estudo poderia abrir novas perspectivas terapêuticas para a doença de Chagas.

Diversas funções foram propostas para a cisteína-proteinase do *T. cruzi*: na invasão, no metabolismo e na interação com células do hospedeiro. Utilizando-se inibidores sintéticos específicos, pode-se verificar que todos os estágios do ciclo de vida do parasita têm alguma susceptibilidade à ação desses inibidores da cisteína-proteinase (MEIRELES et alli, 1992).

Eventos de transformações parecem ser particularmente susceptíveis (HARTH et alli, 1993). Desta forma, é possível que tenhamos uma mesma enzima desempenhando funções diferentes ou, então, proteinases distintas atuando nas diferentes formas do parasita.

Assim, o presente estudo tem como objetivo analisar a(s) proteinase(s) das diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*, não só quanto à sua capacidade para degradar o substrato gelatina, caracterizando sua atividade em pH ácido e neutro, com também quanto à sua importância para a penetração do parasita em células hospedeiras.

Para a realização deste estudo, é também nosso objetivo a obtenção de anticorpos monoclonais específicos contra a proteinase extraída das formas epimastigota do parasita. Esses reagentes nos permitirão realizar estudo comparativo com as proteinases das diferentes formas evolutivas do ciclo do parasita.

MATERIAIS E MÉTODOS

II - MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Camundongos CBA ou BALB/c, com 8-12 semanas de idade, de ambos os sexos, provenientes de colônias livres de patógenos específicos (SPF), fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB-UNICAMP).

2. CEPAS DO *T. cruzi*

A amostra Y de *T. cruzi* (SILVA AND NUSSENZWEIG, 1953), foi mantida nas seguintes condições :

1- Em camundongos das linhagens CBA ou BALB/c, através de passagens semanais com 10^5 formas de tripomastigota;

2- Em meio LIT (Liver Infusion Tryptose), segundo indicações fornecidas por FERNANDES AND CASTELANI (1966), modificado pelo uso de soro bovino fetalizado (SANTOS AND NAKAETH, 1986). Os parasitas foram cultivados durante 7 dias, a 28° C;

3- Cultura em células da linhagem celular LLC-MK2, mantidas em cultivo em meio RPMI-1640, contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB). Após 72 horas de infecção, o meio era substituído por meio fresco suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB).

3. PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

A proteinase foi isolada segundo indicações de RANGEL et alli (1981 a). A fração solúvel do parasita (FS) foi preparada a partir da massa de 8×10^{12} parasitas, os quais foram ressuspensos em 400 ml de água destilada, acrescida de igual volume de salina 0,3 M, mantidos sob agitação por 1h, a 4°C e centrifugados a 4810g, por 20 minutos (min). O sobrenadante foi designado "Fração Solúvel" (FS). Para a purificação da enzima, o pH da FS foi ajustado para 4,5, com HCl 0,1 N. A seguir, centrifugada a 4810 g, por 20 min, e o sobrenadante, denominado FspH 4,5. A fração FspH 4,5 foi transferida a -20°C , submetida a precipitação com acetona 80%, sob agitação constante por 20 horas e, então, centrifugada a 4810 g, a 5°C .

O precipitado foi ressuspensão em 40 ml de NaCl 0,15 M, e dializado a 4°C , por 20 horas, contra salina, e 2 h com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0. O material dialisado foi submetido a centrifugação a 4810g, durante 30 min, e o sobrenadante, denominado Fsp, foi liofilizado. Uma amostra de 3,0 ml da Fsp, contendo 31,0 mg de proteínas totais, foi cromatografada em coluna de 93,5 cm X 2,2 cm contendo Sephacryl S 300, previamente equilibrada com solução de NaCl 0,15 M e tamponada com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0.

A eluição foi realizada com o mesmo tampão, a 4°C , a um fluxo de 10 ml/h, e coletadas frações de 2 ml/tubos.

A eluição da amostra foi acompanhada através de leitura da absorbância a 280nm, pela atividade proteolítica utilizando-se

o método de dosagem enzimática descrito por ANSON (1938), modificado por RANGEL et alli (1981 a), e o método de eletroforese em SDS-PAGE-GELATINA, segundo LACKS AND SPRINGHORN (1980).

Após a cromatografia em Sephacryl S 300, foram obtidas 02 frações proteicas com atividade enzimática. Entre essas frações a fração 1 (F1) exibiu maior atividade enzimática, apresentando 180-200 $\mu\text{g/ml}$ de proteína, 28 unidades enzimáticas, em pH 7,0, e atividade específica de 155,5 U/mg proteína. Em pH 5,0, a fração apresentou 40 unidades enzimáticas e atividade específica de 222 U/mg. A análise eletroforética dessas frações mostrou uma única banda correspondente à atividade enzimática sobre gelatina imobilizada no gel. Essa fração foi denominada "proteínase".

4. DOSAGEM DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi determinada segundo o método original de ANSON'S (1938), modificado por RANGEL et alli (1981 a), misturando-se 0,1 ml da fração com 1,0 ml do substrato (caseína 6 mg/ml, 5mM de ácido dissódico etilenodiamino tetracético, "EDTA", 15mM de 2-Mercaptoetanol, "2ME"), em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0, ou tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0, durante duas horas, a 37°C. A reação foi bloqueada com ácido tricloro-acético(TCA).

A unidade de enzima/ml foi definida, como a absorvância dos produtos TCA-solúveis, equivalente a 10^{-1} absorvância.

5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEÍCA

A determinação da concentração proteica foi realizada utilizando-se o método de LOWRY, modificado segundo HARTREE (1972). Como proteína padrão foi utilizada a soro albumina bovina (BSA).

6. PREPARO DE ANTÍGENOS DO *T. cruzi* PARA ELETROFORESE

Epimastigotas provenientes do cultivo em meio LIT, ou tripomastigotas e amastigotas provenientes de cultivo celular, em fase exponencial de crescimento, foram lavadas 3 X a 1732 g, 20 min, a 4°C, com salina 0,15 M, ou salina 0,15 M contendo 2% de glicose, no caso dos tripanosomas de cultivo celular e tripomastigota sangüícola. O número de parasitas foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. Os parasitas sedimentados por centrifugação foram congelados a -20°C. Os antígenos das diferentes formas foram extraídos, ressuspendendo-se os sedimentos em tampão Tris HCl 10 mM, pH 6,8, contendo 1% de Nonidet 40 (NP40), 1 mM de TLCK (Tosil-L-Lisina clorometil cetona) e 1 mM de PMSF (Fluoreto de fenil metil sulfonil), os quais foram mantidos a 4°C, durante 30 min, sob agitação constante. A mistura foi centrifugada a 1085 g, por 20 min, e o sobrenadante foi armazenado a -20°C, em alíquotas de 100 µl.

Para a análise eletroforética, foi adicionado, a cada alíquota de antígeno, igual volume de tampão de amostra, 2X concentrado (Tampão Tris HCl, pH 6.8, 2ME, glicerol, SDS,

bromofenol).

A proteinase (180-200 ug/ml de proteína) foi acrescida com igual volume do tampão de amostra, 2 X concentrado.

7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS/PAGE).

A eletroforese em gel de poliacrilamida 10% foi realizada, segundo as condições descritas por LAEMMLI (1970), em mini géis com dimensões de 80mm X 100mm X1 mm, aplicando-se uma corrente de 25 mA, por 1:30h, à temperatura ambiente. Os seguintes padrões de pesos moleculares foram utilizados: miosina (205 kDa), B galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), soro albumina bovina (66 kDa), cadeia pesada de Ig de camundongo (55 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e inibidor da tripsina (20 Kda). Após a eletroforese, os géis foram corados com amido black 0,2 %.

8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO GELATINA.

A atividade enzimática das amostras foi analisada segundo o método descrito por LACKS AND SPRINGHORN (1980), incorporando-se 0,2% de gelatina (substrato) à poliacrilamida 10%, contendo 0,1% de SDS. As frações foram eletroforeticamente separadas a 4°C, aplicando-se uma corrente de 20mA, por 2 horas. Após a eletroforese, o gel foi lavado 2 X por 15 min com água destilada, e 1 X com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, ou tampão

acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0. Para revelação da atividade proteolítica, os geis foram mergulhados nos respectivos tampões, na presença ou ausência de 5 mM EDTA e 15 mM 2-ME, e incubados por um período de 4 ou 16 horas, a 37°C. A reação enzimática foi bloqueada com solução de ácido acético 5-10%; o gel foi corado com amido black 0,2%, descorado com solução contendo 50 % de metanol e 10 % ácido acético.

9. IMMUNOBLOTTING

O ensaio de immunoblotting foi realizado segundo método descrito por TOWBIN et alli (1979). Os antígenos foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Após a eletroforese, o material foi transferido para membrana de nitrocelulose Ba 85 (Schleicher & Schuell) por eletroforese, aplicando-se uma corrente de 80 V, por 4h a 4°C. Os antígenos transferidos foram fixados com glutaraldeído a 0,25 %, em PBS, durante 15 min e, a seguir, lavados com PBS. A tira dos padrões de peso molecular foi corada com amido black 0,02%, e o material restante foi tratado com PBS, contendo 1% de BSA, e 0,05 % Tween 20, por 1h, à temperatura ambiente, ou por 18 horas, a 4°C. Após lavagem com PBS, contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T), as tiras foram cortadas e incubadas durante 1 hora, à temperatura ambiente, com anticorpos diluídos apropriadamente em PBS, contendo 0,5 % de gelatina e 0,05% de Tween 20 (PBS-GE-T). Após 4 lavagens de 5 min cada, com PBS-T, as tiras foram incubadas com imunoglobulina (Ig) de carneiro, anti-Ig de camundongo, conjugada

com peroxidase na diluição de 1:1000 em PBS-GE-T, durante 1h, à temperatura ambiente. Após 4 lavagens de 5 min cada, com PBS-T, as tiras foram reveladas com a mistura cromogeno/substrato (5 mg de 3,3 diaminobenzidina, em 10 ml de PBS, pH 7,0, e 5 ul de H₂O₂) até o desenvolvimento de cor. A reação foi interrompida com água destilada.

10. PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

10.1. Esquema de Imunização

Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com 50 µg, da fração Fsp, em alúmem de potássio, por via subcutânea (S.c.). Após quinze dias, os animais receberam a mesma dose de antígeno em alúmem de potássio por via S.c. Quinze dias após a segunda dose, os animais foram sangrados pelo plexo orbital e os soros obtidos foram testados pela técnica de ELISA contra antígenos do parasita. Os animais que apresentaram as melhores respostas contra os antígenos do parasita foram inoculados com uma dose de 50 µg de antígeno, em salina, por via intraperitoneal(I.p.), 4 dias antes da fusão.

10.2. Suspensões celulares

Células de mieloma

Células de mieloma SP2/0 foram cultivadas em meio RPMI, com 10% SFB, e repicadas 12 h antes da fusão celular.

Células peritoneais

Células peritoneais de camundongos foram coletadas através de lavagem da cavidade peritoneal, com 5 ml de RPMI, contendo 10% SFB. Aliquotas de 0,5 ml da suspensão celular, contendo 4×10^4 células/ml, foram distribuídas em cada poço das placas de cultura de 24 poços.

Células esplênicas

Células Esplênicas de camundongos imunizados com a fração Fsp foram retiradas assepticamente. A suspensão celular foi lavada e ressuspensa em meio RPMI sem soro fetal, e sua concentração foi determinada utilizando-se câmara de Neubauer.

10.3. Soluções e meios cultura utilizados para hibridização

Solução de polietilenoglicol

Solução de polietilenoglicol (PEG) à 50% da Serva com 4000 Da ou Merck com 1000 kDa contendo 15% de dimetilsulfoxido (DMSO).

Solução de aminopterina 100X

Solução de aminopterina 100X concentrada foi preparada dissolvendo-se 1,76 mg de aminopetrina (Sigma) em 90 ml de água bidestilada e 0,5 ml de hidróxido de sódio 1.0 N, neutralizado com HCl 1,0 N, o volume final ajustado para 100 ml de água bidestilada. A esterilização foi realizada por filtração em membranas Millipore $0,22\mu\text{m}$, alíquotado em 1 ml estocado -20°C protegido da luz.

Solução de hipoxantina-timidina

Solução de hipoxantina-timidina 100X concentrada (HT 100X)

foi preparada dissolvendo-se 38 mg de timidina (Sigma) e 140 mg de hipoxantina (Sigma) em 100 ml de água bidestilada a 80⁰C. A solução foi esterilizada por filtração e estocada -20⁰C.

Meio HAT

Meio HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina) foi obtido pela adição de 1 ml de HT 100X e de 1 ml de A 100X em 100 ml de meio RPMI de cultura contendo 15-20% de SFB.

10.4. Procedimento de Hibridização

A fusão celular foi realizada segundo as de indicações de FAZEKAS DE ST. GROTH AND SCHEIDEGGER (1980). A suspensão celular foi preparada obedecendo-se a relação 5:1 (5 células de baço para 1 célula de mieloma SP/2). A mistura celular foi centrifugada a 200g durante 10 min. Ao "pellet" celular foi adicionado 1 ml de PEG, a 37⁰C, gota a gota, sob agitação branda. A suspensão foi incubada por 1 min, a 37⁰ C e, a seguir, diluída em 3 ml de meio, sem soro fetal, lentamente, até completar 10 ml, sob agitação lenta. O volume foi completado para 50 ml, e centrifugado a 200 g, durante 10 min. As células foram lavadas e ressuspendas na concentração de 2X10⁶ células/ml, em meio HAT. As células foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de 2X10⁵ células/poço. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂, a 37⁰C. Após 4 dias, verificou-se o crescimento das culturas. Em torno do 7^a dia após fusão, procedeu-se a substituição do meio de cultura por meio contendo HT. As células que proliferaram foram transferidas para placas com 24

poços. Os sobrenadantes foram testados pelos métodos de ELISA e Imunofluorescência e os híbridos secretores foram congelados.

10.5. Clonagem dos hibridomas

A clonagem foi realizada segundo o método de diluição limite, preconizado por WALDMANN et alli (1984) e LEFKOVITS et alli (1984). As células das culturas secretoras foram contadas, diluídas em meio RPMI com 15% SFB, de maneira a se obter suspensões celulares com 5 células por ml, que foram distribuídas em placas de 96 poços, na densidade de 1 célula/poço. Estas placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂. Os clones secretores de anticorpos foram selecionados pelo método de ELISA. As células foram reclonadas quando necessário .

10.6. Indução de Ascites

Camundongos BALB/c, previamente estimulados com nujol, foram inoculados por via intraperitoneal, com uma suspensão contendo 1×10^6 hibridomas secretores de anticorpos monoclonais.

Os ascites foram colhidos cerca de dez dias após a injeção das células, centrifugados a 200g, por 10 min, e os sobrenadantes conservados a -20°C até o uso.

11. CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS

11.1. Determinação da classe e subclasses de Imunoglobulina dos anticorpos monoclonais.

As classes e os isótipos de imunoglobulinas dos anticorpos monoclonais foram caracterizados pelo método de imunodifusão dupla (OUCHTERLONY, 1958), em agar a 1%, utilizando-se os anticorpos monoespecíficos para cadeia pesada de IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 produzidos no laboratório de Imunoquímica do Depto. de Microbiologia e Imunologia, IB, UNICAMP.

11.2. Método de imunofluorescência Indireta

O método foi realizado conforme indicações de CAMARGO (1966). Suspensões contendo 10^6 parasitas/ml de formas de cultivo celular (TC) (tripomastigota e amastigota), epimastigota (E) ou tripomastigota sangüícola (T.S.), fixados em solução de formaldeído a 1% em PBS, foram assentadas em uma lâmina teflonada por 10 min, à temperatura ambiente. O excesso foi retirado e seco à mesma temperatura. As lâminas foram conservadas a -20°C , até o momento de uso.

Em cada lâmina foram utilizados: soro normal de camundongos F1 (CBA X C57BL/10) como controle negativo, diluído a 1/20, e soro de camundongo F1 na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* e diluído a 1/20, como controle positivo. Os ascites a serem titulados foram usados nas diluições de 1/20 a 1/20.480 na

razão dois. As lâminas foram incubadas durante 2 horas, em câmara úmida, a 37^o C. As lâminas foram, então, lavadas 3X com PBS e, a seguir, incubadas por 1h, com o conjugado anti-Ig de camundongo, marcado com fluoresceína, produzido no nosso Laboratório, e diluído a 1/20 em azul de Evans 0,02%. Após esse período, as lâminas foram lavadas 3X com PBS e montadas com glicerina tamponada com tampão carbonato a pH 8,5.

As leituras das reações foram realizadas em microscópio de fluorescência (Zeiss), com sistema de epi-iluminação.

11.3. Método de ELISA

Os anticorpos com especificidade para as diferentes formas de parasita foram avaliados utilizando-se placas de microtitulação, que foram sensibilizadas com 100 µl de uma suspensão contendo 1X10⁶ parasitas/ml em PBS, durante a noite, a 4^oC, ou 2X10⁶ parasita/ml, durante 4 horas, à temperatura ambiente. Após o período de sensibilização os parasitas foram fixados com uma solução de glutaraldeído, a 0,5% em PBS, durante 15 min a 4^oC. As placas foram lavadas com solução de PBS, na temperatura de 4^oC, e bloqueadas com solução de PBS, contendo 0,5% de gelatina e 0,05% de Tween 20 (PBS-GE-T), lavadas com PBS a temperatura de 4^oC, e congeladas a -20^oC até o uso.

A caracterização dos anticorpos com especificidade para proteinase foi realizada utilizando-se tanto o método de ELISA indireto como o método de ELISA direto.

a) **Método de ELISA Indireto** - As placas de microtitulação

foram sensibilizadas com soro de coelho anti-proteinase, produzidos em nosso laboratório, e diluídos em tampão Carbonato 0,1 M, pH 9,0, durante 1 hora, à temperatura ambiente, ou à noite, a 4°C. As placas foram lavadas 4 vezes com PBS. A seguir, foi adicionado 100 μ l da fração FS, contendo 500 μ g/ml de proteína e 2,5 mM de ácido iodoacético. As placas foram incubadas por 1 hora, à temperatura ambiente e, a seguir, lavadas 4 vezes com PBS. Adicionou-se, então, 100 μ l/poço de tampão PBS-GE-T e incubou-se por mais 1h à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, as placas foram mantidas a -20°C até o uso.

b) **Método de ELISA Direto** - As placas de microtitulação foram sensibilizadas com 100 μ l de uma solução da fração rica em proteinase, obtida através da cromatografia de gel filtração, e contendo 20 μ g de proteínas/ml, em tampão carbonato 0,1 M, pH 9,0. As placas foram incubadas por 1 h, à temperatura ambiente. A seguir foram lavadas com PBS-T, bloqueadas com PBS-GE-T e conservadas a -20°C, até o momento do uso.

O teste de ELISA foi realizado adicionando 100 μ l dos sobrenadantes de cultura, ou ascite que foram incubados por 1 h, à temperatura ambiente. A seguir as placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T. Após a lavagem, adicionou-se 100 μ l/poço do conjugado IgG de carneiro anti-Ig camundongo marcado com peroxidase, diluído a 1/1000, em tampão bloqueador PBS-GE-T. As placas foram incubadas por 1h, à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-T, adicionou-se 100 μ l de solução reveladora contendo: 5 mg de ortofenileno diamino (OPD) e 5 μ l de H₂O₂ 30%, em 10 ml de tampão fosfato citrato, 0,1M, pH 5,0, incubado 30 min, à

temperatura ambiente, no escuro. A reação foi bloqueada com 25 μ l de H_2SO_4 4N.

12. EFEITO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS SOBRE O *Trypanosoma cruzi* NA INFECÇÃO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS.

1) Células da linhagem LLC-MK2 (Rim de macaco Rhesus), em suspensão, na concentração de 1×10^5 células/ml, foi cultivada em microplacas com 96 poços, para cultura de tecidos, ou na concentração de 2×10^5 células/ml, em lâminas teflonadas com 8 poços, em estufas a $37^\circ C$, com 5 % de CO_2 .

2) Células foram coletadas da cavidade peritoneal de camundongo, com RPMI contendo 10 U/ml de heparina e 10% de soro fetal bovino (SFB), e cultivadas por 18 h em lâminas teflonadas, em uma densidade de 2×10^6 células/ml e 1×10^6 células/ml, em microplacas de 96 poços, em estufas com 5% de CO_2 , a $37^\circ C$.

12.1. Opsonização do parasita

Os parasitas provenientes de cultura de células ou de sangue de camundongos foram misturados com igual volume de soro normal, ou com diferentes concentrações de anticorpos, e incubados por 1 h, a $4^\circ C$.

12.2. Penetração do parasita em células hospedeiras

As lâminas contendo monocamadas de células LLC-MK2, ou

células peritoneais, foram infectadas com parasitas opsonizados por diferentes diluições de anticorpos. As células LLC-MK2, cuja relação foi de 5 parasitas/ célula, foram incubadas por 1 hora, e as células peritoneais, cuja relação parasita/célula foi de 2:1, foram incubadas durante 22 horas, em estufas de CO₂, a 37⁰ C. As lâminas foram, a seguir, lavadas, para retirar os parasitas livres. As lâminas contendo células foram fixadas com acetona gelada, durante 10 minutos, e coradas com Leishmann.

A porcentagem de parasitas associados às células foi determinada através do índice fagocitário (macrófago) ou de índice de penetração para célula LLC-MK2. O número parasitas/células foi determinado como capacidade fagocitária ou de penetração do parasita.

12.3. Proliferação do parasitas

As células LLC-MK2, ou macrófagos, cultivadas em microplacas, foram infectadas com parasitas da forma tripomastigota sangüícola. Duas condições foram utilizadas, para o teste do anticorpo. 1) Os parasitas previamente opsonizados foi adicionado na relação parasita/células de 1:1 para macrófago e 2:1 para células LLC-MK2. 2) Os parasitas foram adicionados simultaneamente com o anticorpo na mesma relação parasita/célula do item anterior e incubados por um período de 18h. Após este período, os parasitas que não penetraram nas células foram retirados por meio de lavagem com salina fosfatada com 2% de glicose (Fazekas), e os poços foram suplementados com

meio RPMI 2% de soro fetal bovino.

As células LLC-MK2 foram também infectadas com a forma tripomastigota de cultivo celular do parasita, adicionando-se sobre o tapete celular 3 parasitas/célula ou 7 parasitas/ célula, adicionando-se, a cada poço, igual volume de anticorpos monoclonais, ou ascite não-imune. Após 18 horas, os poços foram lavados com salina Fazekas, de modo a remover os parasitas que não penetraram.

As células foram examinadas diariamente em microscópio invertido. Sete dias após a infecção, os sobrenadantes de cultura foram utilizados para determinação do número de parasita.

RESULTADOS

III - RESULTADOS

1. ESTUDO DE PROTEINASES NAS DIFERENTES FORMAS DO *Trypanosoma cruzi*

A atividade proteolítica nos extratos de *T. cruzi*, obtidos das formas de cultivo em células LLC-MK2 (amastigota e tripomastigota) e da forma epimastigota provenientes do cultivo do parasita em meio LIT, foi analisada após a eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo 0,2 % de gelatina como substrato.

Em pH neutro, e na ausência de ativadores (EDTA e 2-ME), nenhum dos extratos do parasita nem a proteinase foram capazes de degradar o substrato, conforme mostrado na Figura 1A.

Em pH ácido (Fig.1B), a forma epimastigota e a proteinase (canais 7 e 8) apresentaram 2 polipeptídeos, um com 40 e outro com 48 kDa, com atividade proteolítica. O polipeptídeo de 48 kDa aparentemente apresentou maior atividade proteolítica.

A figura 2 mostra os resultados da análise da atividade proteolítica nos extratos do *T. cruzi*, realizada em pH neutro, na presença de ativadores, com 4 horas de incubação. A proteinase mostrou duas bandas de atividade com 46 e 40 kDa (canais 4 e 8); o extrato de epimastigota mostrou um polipeptídeo com atividade enzimática de 40 kDa; na forma tripomastigota observou-se uma banda de 35 kDa com atividade enzimática; e no extrato de amastigota, dois polipeptídeos, de 46 e 35 kDa, apresentavam atividade enzimática.

Nos experimentos conduzidos com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0, os extratos de amastigota e tripomastigota revelaram traços de atividade relacionados a três polipeptídeos com 55 , 48 e 40 kDa, respectivamente; o extrato de epimastigota e a proteinase apresentaram dois polipeptídeos de 48 e 40 kDa, respectivamente, com atividade enzimática, sendo que na fração purificada o polipeptídeo de 48 kDa apresentaram aparentemente maior atividade (Fig. 2 B). O conjunto desses resultados mostram que essas enzimas são pertencentes ao grupo das enzimas SH-dependentes.

Aumentando-se o tempo de atuação da proteinase do *T. cruzi* para 16 horas de degradação do substrato, os resultados apresentados na Fig.3 A mostraram o mesmo padrão descrito na figura anterior.

Em pH 5,0 (Fig.3 B), as formas tripomastigota e amastigota apresentaram 3 bandas com atividades enzimáticas correspondentes a polipeptídeos de 55, 48 e 40 kDa. Na forma epimastigota e na fração purificada foram encontrados 2 polipeptídeos com atividade enzimática com pesos moleculares de 48 e 40 kDa, respectivamente. Na tabela I encontram-se os pesos moleculares das formas do *T. cruzi* nos diferentes pH's. Comparando-se as diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*, a forma tripomastigota apresentou menor atividade específica de enzima nos seus extratos, visto que foi necessária uma concentração 2 X maior de parasita em relação à forma epimastigota e amastigota para a análise.

A análise das relações antigênicas das proteinases presentes nos extratos de amastigota, tripomastigota e

epimastigota foi realizada através de "Western-blot", utilizando-se soro anti-proteinase obtido em camundongos BALB/c imunizados. O resultado (Fig.04) mostra que os polipeptídeos com 48 e 55 kDa são revelados com esse anticorpo, sendo que o de 48 kDa encontra-se presente em todas as formas de cultivo do parasita e o de 55 kDa, na forma amastigota além da presença de traços na forma tripomastigota do parasita.

Comparando os resultados obtidos da atividade enzimática e banda blotadas pudemos verificar que o polipeptídeo de 35 kDa, que possuía atividade enzimática, não era revelado pelo soro hiperimune anti-proteinase utilizado; ao contrário, o polipeptídeos de 55 kDa era revelado por esse soro.

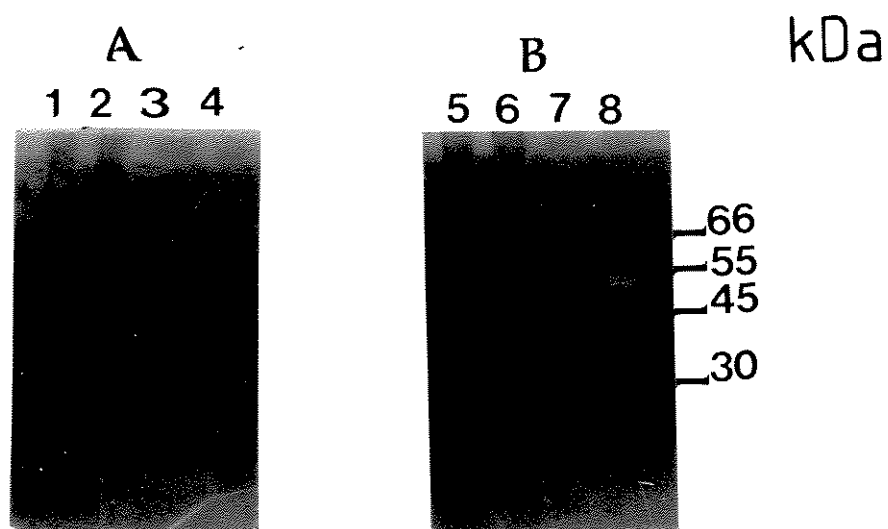


Fig.1. Detecção da atividade enzimática de extratos e proteinase de *T.cruzi*, após eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo 0,2 % de gelatina, na ausência de ativador. Padrão de P.M. se encontra no 1 canal à esquerda. Placa A: pH 7,0, Amastigota $8,0 \times 10^5$ (1), Tripomastigota $3,6 \times 10^6$ (2), Epimastigota $8,0 \times 10^5$ (3), Proteinase 250 ng (4). Placa B: pH 5,0, Amastigota $1,5 \times 10^6$ (5), Tripomastigota $3,6 \times 10^6$ (6), Epimastigota $1,5 \times 10^6$ (7), Proteinase 250 ng (8).

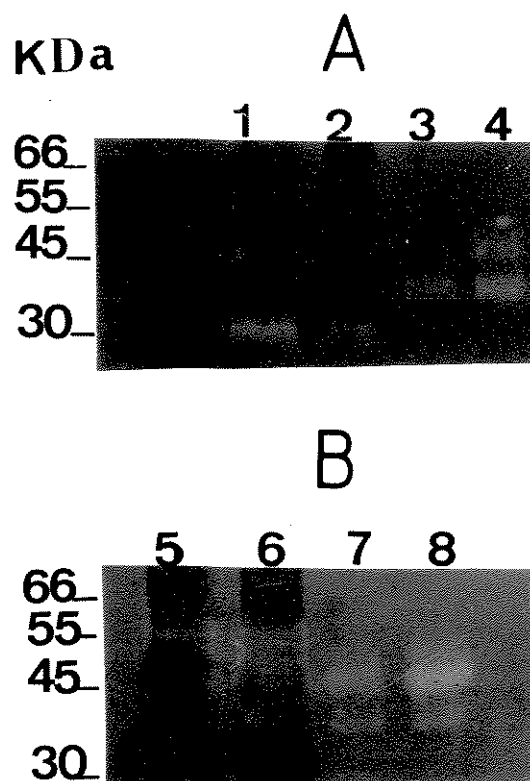


Fig. 2 - Efeito do pH na atividade enzimática de diferentes extratos de *T. cruzi*, em gel de poliacrilamida, contendo 0,2% de gelatina. A atividade proteolítica revelada em pH 7,0 (A) ou pH 5,0 (B), em presença de ativadores para proteinase (EDTA, 2-ME) durante 4 h. Amastigota $1,5 \times 10^6$ (1 e 5), Tripomastigota 3×10^6 (2 e 6), Epimastigota $1,5 \times 10^6$ (3 e 7), Proteinase 500ng (4 e 8). Os padrões de Peso Molecular estão assinalados à esquerda, em kDa.

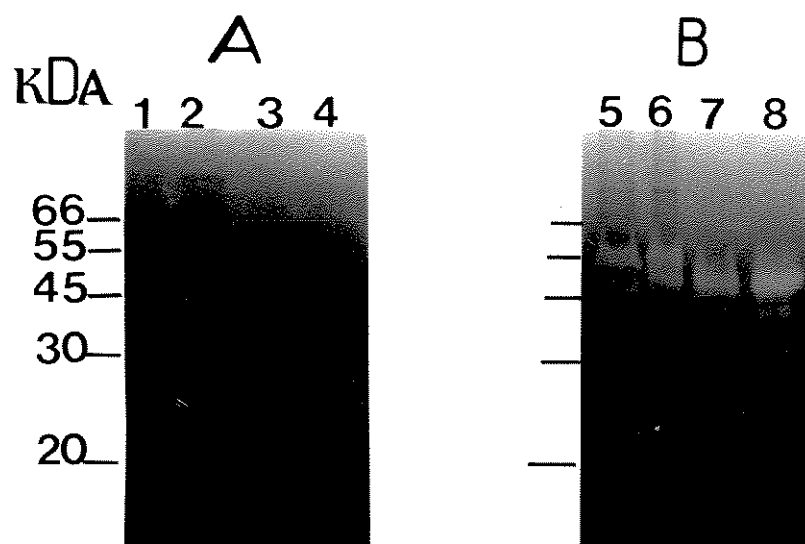


Fig. 3 - Efeito do pH na atividade proteolítica de extratos de formas evolutivas do *T. cruzi*, em gel de poliacrilamida contendo gelatina. Os extratos foram tratados com ativador de proteinase (EDTA+2-ME) durante 16 horas. Placa A: pH 7.0, Amastigota $8,0 \times 10^5$ (1), Tripomastigota $3,6 \times 10^6$ (2), Epimastigota $8,0 \times 10^5$ (3), Proteinase 250 ng (4). Placa B: pH 5.0, Amastigota $1,5 \times 10^6$ (5), Tripomastigota $3,6 \times 10^6$ (6), Epimastigota $1,5 \times 10^6$ (7), Proteinase 250 ng (8). À esquerda encontram-se assinalados os padrões de peso molecular, em kilodaltons.

TABELA I. POLIPEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA** CARACTERIZADOS NAS DIFERENTES FORMAS, DO *Trypanosoma cruzi* EM pH'S ÁCIDO E NEUTRO

Formas	pH 5,0*	pH 7,0*
Amastigota	55, 48, 40	46, 35
Epimastigota	48, 40	40
Tripomastigota	55, 48, 40	35
Proteinase	48, 40	46, 40

* PM em kDa

**Atividade enzimática detectada após 16 h de incubação

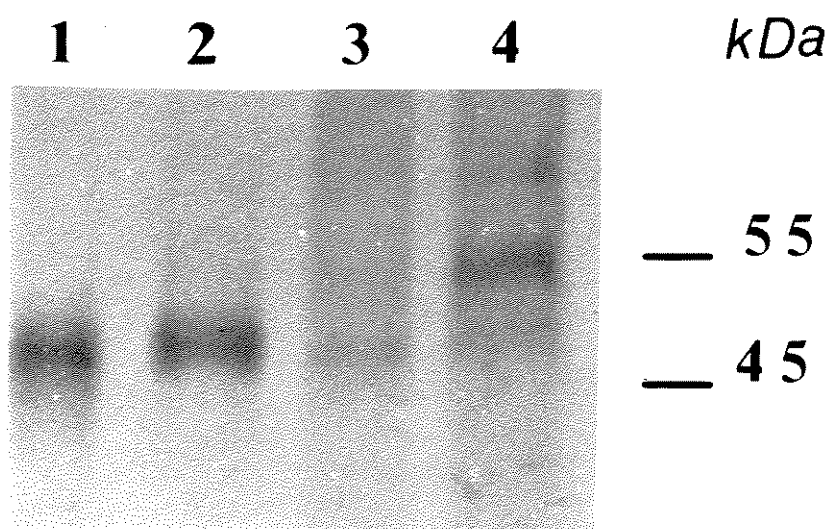


Fig.4. Western Blot dos diferentes antígenos de *T. cruzi*. (1) Proteinase 500 ng, (2) Epimastigota 2×10^6 , (3) Tripomastigota 4×10^6 , (4) Amastigota 4×10^6 . Revelados com antissoro anti-proteinase de *T. cruzi*, produzido em BALB/c diluído 1/10. Marcadores de pesos moleculares estão indicados em Kilodaltons, à direita.

2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS HÍBRIDOS

Células esplênicas de camundongos, sensibilizadas com fração enriquecida em proteinase (Fsp) foram fusionadas com células do mieloma SP2 de camundongo, utilizando-se o agente fusiogênico, polietilenoglicol (PEG), com peso molecular de 4000 e de 1000 Da .

Cerca de quinze dias após a fusão, os híbridos foram selecionados quanto à sua especificidade para antígenos epimastigota (E), tripanosoma de cultura (TC) e proteinase (P), utilizando-se o método de ELISA.

Os resultados mostram que o polietilenoglicol com peso molecular de 1000 Da foi mais eficiente como agente fusiogênico (62% dos poços com crescimento) do que o PEG 4000 Da (25% dos poços com crescimento).

Os híbridos que apresentavam reatividade para a proteinase, ou para a forma de cultivo do parasita, foram selecionados pelo método de ELISA, conforme os resultados apresentados na Tabela II. Podemos verificar que um maior número de híbridos reagiram simultaneamente com epimastigota e proteinase purificada, (54% dos clones produzidos). Com reatividade para proteinase, foram obtidos 16 híbridos (23%). Temos ainda que 17% dos híbridos obtidos reagiram com antígenos de epimastigota; 3% reagiram com epimastigota/tripanosoma de cultura/proteinase, 1,4% dos clones reagiram com apenas os antígenos das formas de cultura celular e 1,4% com tripanosoma de cultura/proteinase.

TABELA II. ESPECIFICIDADE DOS HÍBRIDOS SELECIONADOS

Antígenos	Números de clones	%
E-P	38	54,0
P	16	23,0
E	12	17,0
E-TC-P	02	3,0
TC	01	1,4
TC-P	01	1,4

E-epimastigota, TC-tripanosoma de cultura, P-proteinase.

3. CLONAGEM DOS HÍBRIDOS

Os híbridos que haviam sido selecionados com base em sua

reatividade apenas para a proteinase isolada de *T.cruzi*, foram submetidos à clonagem por diluição limite e os resultados estão apresentados na Tabela III. Pode-se verificar que, dos 07 hibridomas clonados, apenas 02 deles produziram os 03 clones reativos com as diferentes formas do parasita ou com a proteinase. Os demais hibridomas não secretaram anticorpos com reatividade para os antígenos testados (híbridos instáveis).

Face a esses resultados, foram clonados outros 07 híbridos que haviam mostrado reatividade para a proteinase e para a forma epimastigota do parasita. Os resultados estão apresentados na Tabela IV. Dessas clonagens foram obtidos 04 clones com especificidade para a proteinase derivados dos clones M1C5 e M1D3, acontecendo também a perda de dois híbridos durante a clonagem (M3D2 e M1D4). O clone M1C5B3 foi ampliado para produção de ascite. Dois clones derivados da cultura M1C5 (M1C5G9 e M1C5D12) foram reclonados, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela V. Podemos verificar que foram obtidos 13 clones com especificidade para proteinase, 04 com especificidade para epimastigota/proteinase e 02 com especificidade para a forma epimastigota. Quatro clones oriundos da cultura M1C5D12 (M1C5D12B4, M1C5D12E8, M1C5D12D5, M1C5D12D4), com especificidade para proteinase, mostraram-se estáveis e foram ampliados para produção de ascite. Da cultura M1C5G9, obtivemos somente um clone (M1C5G9A7) com especificidade para a proteinase, o qual foi ampliado para produção de ascite.

O híbrido M1C2 foi também submetido a clonagem, em função da sua reatividade com a forma epimastigota e com a proteinase.

Os clones obtidos foram submetidos a várias recloneagens, conforme resultado mostrado na tabela VI. Podemos verificar que o híbrido MLC2 produziu, na 1ª recloneagem, um clone (C2C3) com especificidade para epimastigota e tripanosoma de cultura. Na 2ª recloneagem foram obtidos outros clones (C3B6, C3F3), apresentando especificidades variadas, exceto para a proteinase. Na 3ª recloneagem sucessiva (clones F3D12 e F3C5) foram obtidos 06 clones, com especificidade para proteinase.

O híbrido M5C3, reativo para a forma tripomastigota de cultura e epimastigota, foi clonado, obtendo-se 14 clones. Cinco desses clones, todos reativos para a forma tripomastigota e epimastigota de cultura, foram expandidos para obtenção de ascite.

TABELA III. NÚMEROS DE CLONES REATIVOS PARA AS DIFERENTES FORMAS DO PARASITA E/OU PROTEINASE PURIFICADA PROVENIENTE DA CLONAGEM DE HÍBRIDOS REATIVOS PARA PROTEINASE

HÍBRIDOS	Antígenos					
	E	TC	P	EP	ETC	
M2B3	-	-	-	-	-	
M3A1	-	-	-	-	-	
M2D4	-	-	-	-	-	
M4C3	-	01	-	-	01	
S3A5	-	-	-	-	-	
M3D1	-	-	-	01	-	
M2B1	-	-	-	-	-	

E-epimastigota, TC-tripanosoma cultura, P-proteinase, ETC-epimastigota e T.cultura, EP-epimastigota e proteinase

TABELA IV. NÚMEROS DE CLONES REATIVOS DA CLONAGEM DOS HÍBRIDOS COM ESPECIFICIDADE PARA EPIMASTIGOTA E PROTEINASE

Híbrido	Antígenos						
	E	TC	P	EP	TCP	ETC	ETCP
M5C3	-	-	-	-	-	14	-
M1D3	-	33	01	-	-	-	-
M4A1	05	-	-	-	-	-	-
M3D2	-	-	-	-	-	-	-
M1D4	-	-	-	-	-	-	-
M1C2	-	-	-	04	-	-	-
M1C5	10	17	03	-	-	34	1

E-epimastigota, P-proteinase, TC-tripanosoma de cultura EP-epimastigota e proteinase, TCP-T.cultura e proteinase, ETC-epimastigota e tripanosoma de cultura, ETCP-epimastigota/T.cultura e proteinase.

TABELA V. RESULTADOS DA RECLONAGEM DOS CLONES M1C5

Clones	Antígenos			
	E	TC	P	E-P
M1C5G9	-	-	07	04
M1C5D12	02	-	06	-

TABELA VI. RESULTADO DA CLONAGEM E RECLONAGEM DO HÍBRIDO M1C2

Clone	Antígenos					
	E	TC	P	ETC	EP	TCEP
C2C3	08	08	-	-	-	-
C3B6	16	03	-	-	09	05
C3F3	-	07	-	-	-	29
F3C5	-	-	-	05	-	-
F3D12	-	-	06	-	01	01

E-epimastigota; TC-tripanosoma de cultura; P-proteinase; ETC-epimastigota e tripanosoma de cultura, EP-epimastigota e proteinase; TCEP-tripanosoma de cultura, epimastigota e proteinase .

4. CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS

Para a caracterização dos anticorpos, os clones foram expandidos para a produção de ascites. Os anticorpos obtidos foram titulados pelo método de ELISA (TAB.VII), pelo método de IFI (TAB. VIII), utilizando-se como antígenos a forma epimastigota, formas de cultivo celulares e a proteinase de *T. cruzi*. As classes e os isótipos de imunoglobulina foram determinados pelo método de difusão em gel com os soros monoespecíficos anti cadeia pesada dados apresentados nas tabela VII e VIII .

Na tabela VII, observa-se dois grupos de anticorpos, o 1ª com especificidade restrita às diferentes formas de cultivo, e o 2ª grupo com especificidade para a proteinase de *T. cruzi*. Entre esses hibridomas, observou-se um clone C2C3F3C5F4 que detectava epítomos presentes na forma epimastigota e na proteinase. Nas tabelas VII e VIII encontram-se listados os isótipos dos clones selecionados. Observa-se a predominância de anticorpos das classes IgM e IgG, dentre os anticorpos da classe IgG os isótipos IgG3 e IgG1.

A reatividade dos anticorpos monoclonais para antígenos de superfície das diferentes formas do parasita foi investigada através de reações de Imunofluorescência indireta. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela VIII. Os clones derivados da cultura M5C3 apresentaram especificidade para as diferentes formas do parasita. Em geral, esses anticorpos apresentaram menor reatividade com a forma epimastigota do parasita. Os

anticorpos M5C3H4 e M5C3C4 apresentaram maior reatividade para a forma intracelular, enquanto que os anticorpos M5C3G3 e M5C3F5, maior reatividade para antígenos de superfície da forma tripomastigota sangüícola. Dentre os anticorpos reativos com a proteinase no método de ELISA, apenas 2 deles foram capazes de interagir com antígenos da superfície da forma tripomastigota sangüícola do parasita pelo método de Imunofluorescência indireta (o M1C5D12D4, secretando anticorpos da classe IgM, e o M1C5D12D5 do isótipo IgG1).

O anticorpo M1C2C3F3C5F4, reativo para a proteinase e para a forma epimastigota nos ensaios de ELISA, foi capaz de interagir com antígenos de superfície da forma amastigota e tripomastigota sangüícola, pelo método de IFI, secretando imunoglobulina da classe IgM. Os anticorpos M1C5D12B4 e M1C5D12E8, embora detectassem a proteinase do parasita, não foram capazes de detectar antígenos presentes na superfície das diferentes formas do *T. cruzi*.

TABELA VII. ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA AS DIFERENTES FORMAS DE CULTIVO E A PROTEINASE DE *T.cruzi* PELO MÉTODO DE ELISA

Clones	Isótipos	Títulos de Anticorpos *		
		EPI	TC	P
M5C3H4	IgG3	400.000	200.000	0
M5C3C4	IgG3	200.000	200.000	0
M5C3D4	IgG3	800.000	200.000	0
M5C3G3	IgG3	200.000	200.000	0
M5C3F5	IgG3	200.000	100.000	0
M1C2C3F3C5F4	IgM	1.600	0	1.600
M1C5B3	IgM	0	0	25.000
M1C5G9A7	IgM	0	0	25.000
M1C5D12D4	IgM	0	0	12.800
M1C5D12D5	IgG1	0	0	12.800
M1C5D12B4	IgG1	400	0	12.800
M1C5D12E8	IgG1	0	0	12.800

TC-Tripanosoma de cultura, P-Proteinase, E-Epimastigota

*- inverso da maior diluição com resultado positivo

TABELA VIII. ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-*T. cruzi* PARA AS DIFERENTES FORMAS DE CULTIVO DO PARASITA FIXADO PELO MÉTODO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA E ISÓTIPOS.

Clones	Isótipos*	Títulos de anticorpos**		
		Epimastigota	Amastigota	T.S.
M5C3H4	IgG3	1.280	5.120	2.560
M5C3C4	IgG3	1.280	10.240	2.560
M5C3D4	IgG3	640	2.560	2.560
M5C3G3	IgG3	1.280	1.280	5.120
M5C3F5	IgG3	640	2.560	5.120
M1C2C3F3C5F4	IgM	0	1.000	1.000
M1C5B3	IgM	0	0	0
M1C5G9A7	IgM	0	0	0
M1C5D12D4	IgM	0	0	2.000
M1C5D12D5	IgG1	0	0	2.000
M1C5D12B4	IgG1	0	0	0
M1C5D12E8	IgG1	0	0	0

T.S-Tripomastigota sanguícola, IFI-Imunofluorescência Indireta;
 *Isótipos foram detectados pelo método de imunodifusão dupla radial.

** Inverso do maior diluição com resultado positivo

5. CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS DO *T. cruzi* REATIVOS COM ANTICORPOS MONOCLONAIS

Com a finalidade de caracterizar os antígenos reativos com anticorpos monoclonais obtidos, foram realizados experimentos de "imunoblotting", utilizando-se antígenos das diferentes formas da cepa Y do *T. cruzi* e a proteinase purificada. Os resultados das análises eletroforéticas dos antígenos imunodetectados pelos anticorpos monoclonais são mostrados na tabela IX. Pode-se verificar que os anticorpos monoclonais M5 (C3C4, C3D4, C3F5, C3G3, C3H4) reconhecem, na forma amastigota os polipeptídeos de 66 e 55 kDa, apresentados na Figura 05, enquanto que na forma tripomastigota sangüícola do parasita, um polipeptídeo com peso molecular de 94 kDa foi revelado. O anticorpo MLC5B3 reconheceu na forma amastigota, antígenos de peso molecular de 78 e 50 kDa, na forma tripomastigota sangüícola, polipeptídeos de 112, 98 e 81 kDa. O anticorpo monoclonal MLC5G9A7 reconheceu somente na forma sangüícola, polipeptídeos de 116, 104, 86 kDa, conforme dados mostrados na Figura 07.

TABELA IX. POLIPEPTÍDEOS RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS MONOCLONAIS NOS TRÊS ESTÁGIOS DO PARASITA E PROTEINASE DE *T. cruzi*

AcMo	POLIPEPTÍDEOS										
	T. SANGÜÍCOLA							AMASTIGOTA			
	116	112	104	98	94	86	81	78	66	55	50
M5C3H4					X				X	X	
M5C3G3					X				X	X	
M5C3C4					X				X	X	
M5C3D4					X				X	X	
M5C3F5					X				X	X	
M1C5B3		X		X			X	X			X
M1C5G9A7	X		X			X					

Dados obtidos em experimentos de " Western Blot "

AcMo-Anticorpos monoclonais anti-proteinase e formas de *T. cruzi*.

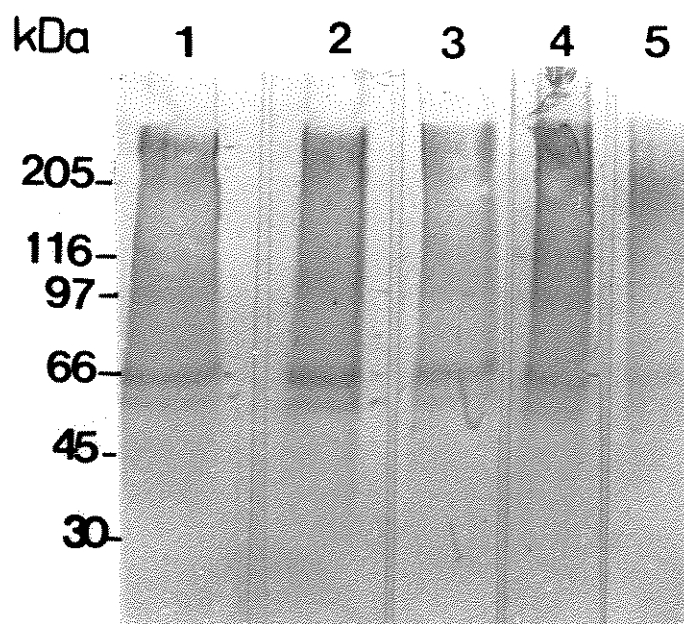


Fig 5. Western Blot de antígenos da forma amastigota de *T. cruzi* (2×10^6), revelados pelos anticorpos monoclonais anti-*T. cruzi*, (1) M5C3C4 diluído 1/500, (2) M5C3D4 1/500, (3) M5C3G3 1/250, (4) M5C3H4 1/250, (5) M5C3F5 1/500. Os padrões de peso moleculares estão colocados à esquerda.

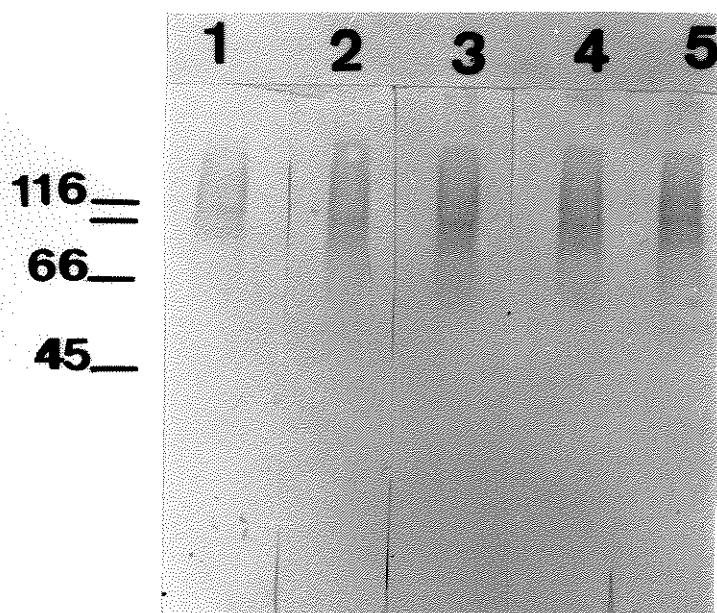


Fig. 6. Western Blot de antígenos da forma tripomastigota sangüícola (2×10^6) revelados com anticorpos monoclonais, (1) M5C3F5 diluído 1/1000, (2) M5C3C4 1/500, (3) M5C3D4 1/1000, (4) M5C3G3 1/1000, (5) M5C3H4 1/1000. Os padrões de pesos moleculares estão indicados à esquerda.

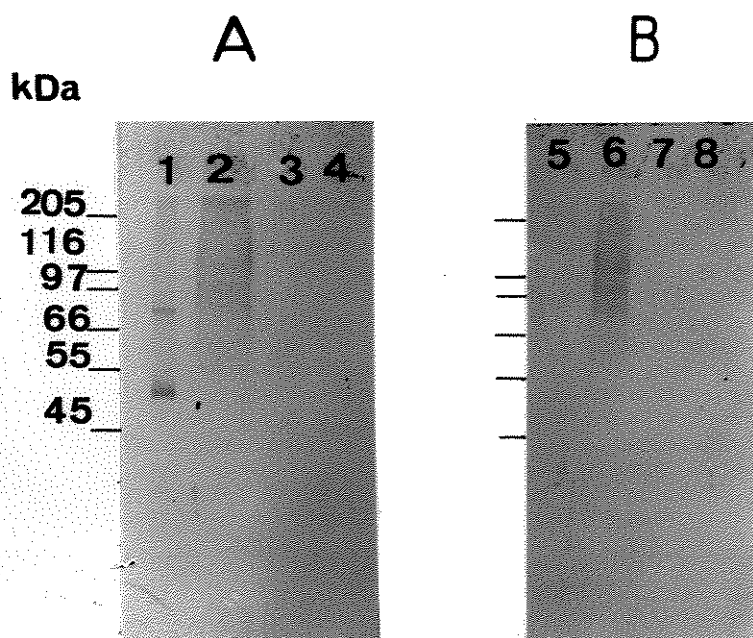


Fig. 7 - Western Blot de antígenos das diferentes formas e da proteinase do *T. cruzi* revelados com os anticorpos monoclonais M1C5B3 (A) e M1C5G9A7 (B). Antígenos de amastigota 2×10^6 (1 e 5), Antígenos de tripomastigota sanguícola 2×10^6 (2 e 6), Antígenos de epimastigota 2×10^6 (3 e 7), Proteinase 500ng (4 e 8). Os padrões de peso molecular estão indicados à esquerda.

6. EFEITOS BIOLÓGICOS DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS

Com o objetivo de verificar o efeito dos anticorpos monoclonais que detectavam antígenos de superfície das diferentes formas do *T. cruzi* sobre o curso da infecção (invasão e multiplicação) de células hospedeiras, pela forma sangüícola do *T. cruzi*; foram realizados os experimentos descritos a seguir

6.1. Efeito do anticorpo na penetração do parasita em células hospedeiras

Foram realizados os experimentos descritos a seguir: Tripomastigotas sangüícolas foram previamente incubados com dose sub-aglutinante dos diferentes anticorpos monoclonais.

Os parasitas opsonizados foram a seguir incubados com células aderentes, obtidas de lavados peritoneais de camundongos, ou com células LLC-MK2. A tabela X mostra os resultados obtidos nesses experimentos. É possível observar que a pré-incubação dos parasitas com os diferentes anticorpos resultou em aumento na porcentagem de macrófagos e de células LLC-MK2, infectados pelo parasita, em comparação com o grupo controle (ascite não-imune).

Utilizando-se a relação 10 parasitas/célula, observou-se, nos primeiros experimentos, que o tratamento com alguns anticorpos resultava na destruição das células infectadas, o que tornava impossível a determinação do grau de infecção dessas células, sugerindo que esses anticorpos aumentavam a capacidade infectiva do parasita. Desta forma, definiu-se, para os

macrófagos, a relação 2 parasitas/célula e, para LLC-MK2 a relação de 5 para 1.

6.2. Efeito do anticorpo monoclonal na proliferação do *T. cruzi*

Com o objetivo de verificar se a adição simultânea dos anticorpos monoclonais e dos parasitas às culturas de células altera a capacidade infectante do *T. cruzi*, foram realizadas duas séries de experimentos. Na primeira, os parasitas foram previamente opsonizados com anticorpos na diluição de 1/2000, e colocados em contato com as monocamadas de células por 1 hora, a 37°C, em estufa de CO₂. No segundo grupo de experimentos, os parasitas foram adicionados simultaneamente com os anticorpos monoclonais, às monocamadas celulares, as quais foram incubadas de modo semelhante ao grupo anterior. Após o período de incubação, os parasitas que não se interagiram com as células foram retirados por lavagem, e os orifícios foram suplementados com o meio fresco. Após 7 dias, o número de parasitas livres foi avaliado.

Os resultados apresentados na Tabela XI mostram que não houve diferença em termos de infecção das células LLC-MK2, quando comparamos ao grupo controle (parasitas tratados com ascite não-imune), aos resultados exibidos pelos grupos nos quais os parasitas foram adicionados simultaneamente ou pré-incubados com o anticorpo. O anticorpo M1C5B3 foi uma exceção, visto que foi capaz de inibir em 31% a infecção destas células, quando adicionado simultaneamente com o parasita, e promovem uma

infecção de 2,5 X maior que o controle, quando o parasita foi previamente opsonizado.

Em relação às células macrofágicas, observa-se que a sua infecção pelo parasita foi mais eficiente quando este se encontrava opsonizado, independente do anticorpo monoclonal considerado, com exceção do anticorpo monoclonal M5C3G3. No caso do anticorpo M1C5B3, observou-se que tanto a opsonização do parasita como a adição simultânea de anticorpo e parasita à cultura resultou em aumento do número de *T. cruzi* liberado pelas células macrofágicas infectadas.

Os experimentos descritos a seguir tiveram como objetivo verificar a capacidade infectante da forma tripomastigota de cultura, na presença dos anticorpos monoclonais que apresentavam especificidade para antígenos de superfície da forma tripomastigota sangüícola (M1C5D12D4), ou para antígenos de superfície de todas as formas do parasita (híbridos derivados da cultura M5C3). Nesses experimentos foram utilizadas monocamadas de células LLC-MK2 e diferentes relações de parasitas/célula (3:1 e 7:1). Os resultados desses experimentos estão resumidos na tabela XII.

Os anticorpos M1C2C3C5F4 e M1C5D12D4 não apresentaram nenhuma alteração na capacidade infectiva do parasita, quando utilizados na proporção de 3:1. Quando se aumentou a relação parasita/célula para 7:1, o anticorpo C2C3C5F4 promoveu um aumento de 2 X na concentração de parasitas liberados pela célula hospedeira.

É importante ressaltar que, independentemente do anticorpo

do grupo M5C3 utilizado, todos apresentaram em cultura uma grande capacidade de aglutinar a forma arredondada do parasita, a partir de 24 horas de cultivo. E independentemente de como os parasitas foram tratados com tais anticorpos, esse fenômeno foi sempre observado.

TABELA X. EFEITO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS SOBRE A FORMA TRIPOMASTIGOTA SANGÜÍCOLA DO PARASITA NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGO E CÉLULAS LLC-MK2

Anticorpo	Macrófago		Llc-Mk2	
	IF	CF	IP	CP
S. Normal	2,2	8,0%	8,0	51,0%
S. anti-T.cruzi	3,0	40,0%	10,0	150,0%
Asc. Normal	3,0	22,0%	4,0	8,0%
Anti-proteinase	3,0	24,0%	2,5	6,5%
M5C3F5	4,0	50,0%	10,0	45,0%
M5C3G3	5,0	60,0%	8,0	22,0%

IF-índice de fagocitose, CF-capacidade de fagocitose

IP-índice de penetração, CP-capacidade de penetração

TABELA XI. PROLIFERAÇÃO DA FORMA TRIPOMASTIGOTA SANGÜÍCOLA OPSONIZADO OU NÃO PELO ANTICORPO MONOCLONAL EM CÉLULAS LLC-MK2 E MACRÓFAGO .

Anticorpo	Macrófago		Llc-Mk2	
	+	-	+	-
A. Normal	0,2	0,1	4,8	7,6
M5C3F5	0,6	0,2	13,0	18,0
M5C3D4	1,6	0,1	10,0	15,0
M5C3C4	1,0	0,1	10,0	16,0
M5C3G3	0,2	0,1	10,0	14,0
M1C5B3	1,0	0,8	12,0	5,2

Número de parasita $\times 10^5$

+ = parasita opsonizado

- = parasita não-opsonizado

Relação célula LLC-MK2 / Parasita 2:1

Relação macrófago/ Parasita 1:1

TABELA XII - EFEITO DO ANTICORPO SOBRE A FORMA TRIPOMASTIGOTA DE CULTURA DO PARASITA NA INTERAÇÃO COM CÉLULAS LLC-MK2

Anticorpo		3:1*	7:1*
Ascite Normal	1/2000	4,0	15,5
M5C3H4	1/2000	11,2	38,0
M5C3C4	1/2000	13,6	32,0
M5C3G3	1/2000	9,2	30,6
M5C3F5	1/2000	10,4	26,6
M5C3D4	1/2000	12,6	25,0
M1C2C3C5F4	1/1000	4,6	30,6
M1C5D12D4	1/1000	4,4	10,4

Número de parasita X 10^5

* - Relação nº parasita/ nº célula.

Parasita não-opsonizado em contato de 18 horas

DISCUSSÃO

IV - DISCUSSÃO

A presença de proteinase nas diferentes formas evolutivas do *T.cruzi* foi investigada através de experiências de eletroforese em SDS-PAGE, com 0,2% de gelatina, onde se pode detectar polipeptídeos capazes de degradar a gelatina usada como substrato. As atividades enzimáticas foram realizadas tanto em pH ácido como em pH neutro. Os melhores resultados foram obtidos após 16 horas de incubação dos extratos de parasitas com o substrato. Nossos resultados mostram que em pH ácido, esses extratos apresentam bandas de 40 e 48 kDa com atividade proteolítica, comuns a todas as formas de cultivo do parasita. Uma banda de atividade enzimática com peso molecular de 55 kDa foi detectada apenas nas formas amastigota e tripomastigota. Estes resultados encontram apoio nas observações de CAMPETELLA et alii (1990), os quais haviam demonstrado que as diferentes formas evolutivas do parasita apresentam atividade proteolítica relacionada a polipeptídeos com 50-60 kDa.

No pH neutro, a forma epimastigota apresentou apenas uma banda com atividade proteolítica com peso molecular de 40 kDa, a qual havia sido também detectada em pH 5,0. A forma amastigota apresentou atividade enzimática relacionada a um polipeptídeo de 46 (48) kDa, também detectado em pH 5,0. Uma banda de 35 kDa, ausente em pH ácido, pode ser também detectada nas formas amastigotas e tripomastigotas de cultivo nos experimentos conduzidos em pH neutro.

O conjunto dos resultados obtidos no presente trabalho sugere que existe uma menor concentração da enzima com atividade cisteína-proteinase nos extratos da forma tripomastigota, pois foi necessário utilizar uma concentração de tripomastigota 2X maior que a de epimastigota e amastigota para se detectar polipeptídeos com atividade enzimática, nos experimentos de eletroforese. Estes resultados encontram apoio naqueles obtidos por BONALDO et alli (1991b) que observaram, durante a diferenciação da forma epimastigota para tripomastigota metacíclico, utilizando radioimunoensaio e anticorpos monoclonais, uma redução de 2-5 X na concentração da GP 57/51. CAMPETELLA et alli (1990), observaram que forma epimastigota, proveniente de diferentes cepas do *T. cruzi*, apresentavam níveis similares de atividade proteínásica. De forma similar aos nossos resultados, esses autores verificaram que as formas amastigota e tripomastigota apresentavam níveis 10X menores desta atividade em comparação com a forma epimastigota.

Em nossos experimentos de imunodeteção, utilizando soro de camundongo antiproteinase de epimastigota, observou-se que esses anticorpos detectavam uma banda correspondente àquela com atividade enzimática no extrato de epimastigota, tripomastigota, amastigota e na enzima purificada; mas também eram capazes de detectar a banda de 55 kDa, presente na forma amastigota, bem como traços dessa banda puderam ser detectados na forma tripomastigota.

Nenhuma reatividade foi observada entre esse soro imune e o componente de 35 kDa, presente em tripomastigota e amastigota,

sugerindo que este componente apresenta epítomos diferentes daqueles encontrados nas formas epimastigota. Esses resultados indicam que as diferentes formas evolutivas do parasita expressam enzimas da família cisteína-proteinase porém essas enzimas podem apresentar diferenças antigênicas.

Estudos recentes realizado por MEIRELLES et alli (1992), utilizando-se extrato de amastigota e, como revelador, um inibidor irreversível da cisteína-proteinase, o derivado peptídico diazometano marcado com I^{125} , mostraram a presença de enzimas na faixa de peso molecular da Gp 57/51, assim como uma banda difusa 25-35 kDa. Estes dados sugerem fortemente a presença de enzimas da família cisteína-proteinase, de baixos pesos moleculares nas formas amastigota e tripomastigota, distintas da caracterizada em epimastigota.

A presença de componentes de baixo peso molecular na faixa de 25-35 kDa, correlacionados com a proteinase da forma epimastigota do parasita, e reativos com os anticorpos mono-específicos induzidos por imunização com a proteinase derivada da forma epimastigota do *T. cruzi*, foram relatados por RANGEL et alli (1981a) e SAKURADA et alli (1992). Polipeptídeos de baixos pesos moleculares foram detectados por SCHARFSTEIN et alli (1986) em frações purificadas a partir da forma epimastigota. Esses autores sugerem que tais componentes poderiam ser resultantes da autodigestão da cruzipaina, pois em seu procedimento de purificação da GP 25, os inibidores de proteases foram omitidos. HELLMAN e colaboradores verificaram posteriormente (1991) que a GP 25 descrita por SCHARFSTEIN et

alli (1986) era, de fato, um produto de autodigestão da cruzipaina, e sugeriram a ausência de capacidade proteolítica neste polipeptídeo de baixo peso molecular.

No presente estudo, verificamos a ocorrência de um polipeptídeo enzimático, de 35 kDa, caracterizado em pH 7,0, o qual deve ser melhor estudado, um vez que foi encontrado nas formas do parasita (amastigota e tripomastigota) presente em hospedeiros vertebrados, provavelmente desempenhando diversas funções nesses organismos.

Diferentes funções têm sido atribuídas à cisteína-proteinase de *T. cruzi* tais como: invasão do hospedeiro (MEIRELES et alli, 1992), degradação de substâncias componentes dos tecidos (SAKURADA et alli, 1991), escape às defesas do hospedeiro (BONTEMPI AND CAZZULO, 1990); metabolismo do parasita (BONTEMPI et alli, 1989). Esses achados permitem levantar a hipótese de que a mesma enzima possa estar desempenhando funções diferentes ou, então, que proteinases distintas estejam presentes nas diferentes formas do parasita.

Com o objetivo de aprofundar os estudos sobre as funções dessa(s) enzima(s) na interação parasita-hospedeiro, propusemos-nos no presente trabalho, a obter anticorpos monoclonais específicos capazes de discriminar as diferentes cisteínas-proteinases que haviam sido detectadas inicialmente pelo soro anti-proteinase, derivado de epimastigotas. Tais reagentes nos permitiriam investigar qual a função da proteinase na penetração, infecção e multiplicação do parasita e, desse modo, tentar entender o seu papel na interação parasita/hospedeiro.

Através de experimentos de fusão de células SP2, com esplenócitos de camundongos BALB/c, imunizados com a fração purificada, contendo a cisteína-proteinase, foram obtidos 240 culturas contendo hibridomas. Verificou-se, no entanto, uma alta frequência de híbridos instáveis, os quais, após congelamento, descongelamento e clonagem, eram perdidos.

Os produtos de fusão são considerados geneticamente instáveis, segundo HARLOW et alii (1988), devido ou à perda do cromossoma que carrega os gens responsáveis pelo rearranjo funcional de cadeias leves ou pesadas de imunoglobulina, ou do cromossoma que contém o gen responsável pela síntese da enzima HGPRT, que permite a sobrevivência do híbrido em meio seletivo. Como consequência dessas perdas, pode ocorrer decréscimo na secreção de anticorpos, com predominância de células não secretoras, ou a morte celular.

Após os procedimentos de clonagem dos hibridomas obtidos nos dois experimentos de fusão celular, selecionou-se, para estudos, 5 clones que apresentaram, por ELISA, reatividade com epimastigota/triponosoma de cultura (tripomastigota e amastigota), 2 clones que apresentaram reatividade com epimastigota/proteinase, e 5 clones que reagiram apenas com a proteinase purificada (tabela VII). Esses híbridos foram expandidos para produção de ascites contendo anticorpos monoclonais.

Entre os clones capazes de interagir, por ELISA, com as três, formas do parasita, observou-se que alguns deles (M5C3H4 e M5C3C4) apresentavam altos títulos, por imunofluorescência, para

estruturas de superfície de amastigota, enquanto outros (M5C3G3 e M5C3F5) detectavam antígenos presentes na superfície do tripomastigota sangüícola. Estes resultados sugerem que tais anticorpos ou detectam antígenos de reações cruzadas presentes nas diferentes formas evolutivas do parasita, ou então, revelam a presença de maior ou menor concentração do mesmo antígeno nas diferentes formas evolutivas.

Um segundo grupo de anticorpos (M1C5D12D4 e M1C5D12D5) apresentou reatividade apenas para antígenos da membrana de tripomastigota sangüícola. Os demais anticorpos não reagiram com estruturas de superfície do parasita.

Os anticorpos monoclonais oriundos dos clones M5C3 revelaram, por Immunoblotting, somente os componentes de 66 e 55 kDa, na forma amastigota, e um polipeptídeo de 94 kDa na forma tripomastigota sangüícola. Ao correlacionar os polipeptídeos detectados por esses anticorpos e as bandas com atividade enzimática, pudemos verificar que todos os anticorpos oriundo dos clones M5C3 reconhecem apenas o polipeptídeo de 55 kDa com atividade enzimática, presente na forma amastigota e tripomastigota. Os demais polipeptídeos detectados por esses anticorpos não se correlacionaram com bandas de atividade enzimática. Estes resultados podem sugerir que o antígeno 94 kDa da forma tripomastigota sangüícola, reconhecido pelos anticorpos monoclonais derivados do clone M5C3 pode apresentar epítomos comuns à proteinase.

Os anticorpos monoclonais M1C5B3 e M1C5G9A7, inicialmente selecionados pelo método de ELISA, por apresentarem reatividade

com a proteinase isolada da forma epimastigota, não foram capazes de detectar por Imunofluorescência antígenos de superfície das formas do parasita estudadas. Além disso, esses anticorpos não foram capazes de revelar por immunoblotting antígenos na proteinase purificada. Entretanto o anticorpo monoclonal M1C5B3 detectou, em extratos da forma amastigota, polipeptídeos de 78 e 50 kDa, e na forma tripomastigota sangüícola, revelou as bandas de 112, 98 e 81 kDa. O M1C5G9A7 revelou, somente na forma tripomastigota sangüícola, os polipeptídeos de 116, 104 e 86 kDa. Por esses resultados, podemos dizer que os anticorpos monoclonais M1C5B3 e M1C5G9A7 reconhecem os mesmos epítomos na forma tripomastigota sangüícola.

Existem evidências que sugerem o envolvimento da proteinase do parasita no processo de interação com as células do hospedeiro (PIRAS et alli, 1985; ARAÚJO-JORGE et alli, 1986). Entretanto outras estruturas do parasita têm sido apontadas como fundamentais nesse processo (ZINGALES AND COLLI, 1985).

Com a finalidade de verificar o papel da proteinase na interação da forma tripomastigota sangüícolas com células LLC-MK2 e macrófagos, foram realizados experimentos de neutralização, empregando os anticorpos monoclonais capazes de detectar antígenos de superfície do parasita, correlacionados com polipeptídeos com atividade enzimática. A internalização do parasita (C.F ou C.P) foi aumentada na presença desses anticorpos (tabela X). O tratamento dos tripomastigotas com anticorpo M5C3F5, resultou em um aumento de 5,6 X no número de parasitas internalizados por LLC-MK2, e de 2,3 X nos fagócitos

profissionais, quando comparado com o controle. O tratamento dos tripomastigota com o anticorpo M5C3G3 resultou em discreto aumento na internalização dos parasitas por macrófagos (0,5X), e de cerca de 2 X por células LLC-MK2. Entretanto, a capacidade fagocítica ou internalização de ambas as células foi similarmente aumentada (cerca de 3 X) em relação aos controles.

Um outro conjunto de experimentos foi realizado para verificar se o tratamento de tripomastigota sangüícola com esse anticorpos influenciava a multiplicação do parasita nas células hospedeiras.

Em um primeiro grupo de experimentos, os parasita foram previamente incubados com os anticorpos monoclonais e, a seguir, adicionados às culturas de células macrofágicas, ou LLC-MK2. Em outro grupo de experimentos, os parasitas e os anticorpos foram simultâneamente adicionados às culturas de células.

Os resultados obtidos, após 7 dias de cultura, mostraram que o pré-tratamento dos tripomastigotas, com anticorpos monoclonais, exceto M5C3G3, resultou em um aumento de 3 a 8 X no número de parasitas liberados nos sobrenadantes das culturas de macrófagos, em relação ao grupo controle. A adição simultânea de parasitas e anticorpos na cultura de macrófagos praticamente não resultou em aumento no número de parasitas liberados após 7 dias de cultura, com excessão do tratamento com o monoclonal M1C5B3. Esses resultados indicam que o aumento no número de parasitas liberados pode ser devido a um aumento da fagocitose dos tripomastigotas opsonizados via receptor para Fc de Imunoglobulinas presentes em macrófagos.

Por outro lado, o tratamento previo, ou a adição simultânea de anticorpo e parasitas às culturas de células LLC-MK2, resultou em um aumento comparável no número de parasitas liberados nos sobrenadantes em relação ao grupo controle.

As células LLC-MK2 foram ainda infectadas com a forma tripomastigota de cultura celular, na presença de anticorpos que interagiram com: a) todas as formas evolutivas do parasita (anticorpos derivados de M5C3); b) com amastigota e tripomastigota sangüícola (M1C2C3F3C5F4) e c) apenas com tripomastigota sangüícola (M1C5D12D4). Os resultados obtidos nesse grupo de experimentos mostram claramente que os anticorpos capazes de detectar antígenos na superfície das formas de cultivo (anticorpos do grupo a) foram capazes de promover um aumento no número de parasitas liberados pela células hospedeiras em qualquer das proporções parasita/célula utilizada.

O anticorpo M1C2C3F3C5F4 não aumentou a capacidade infectiva dos parasitas, quando estes foram utilizados na proporção 3:1. Entretanto quando se aumentou a relação parasitas/células para 7:1, observou-se um aumento de 2 X na capacidade infectiva desses parasitas. Esses resultados sugerem que, embora o anticorpo M1C2C3F3C5F4 detecte antígenos da superfície de formas sangüícola e amastigota do *T. cruzi* fixados para IFI, ele foi capaz de interagir com antígenos presentes na superfície do tripomastigota metacíclico de cultura vivo.

O anticorpo M1C5D12D4, reativo apenas com tripomastigota sangüícola por IFI, não foi capaz de promover aumento no número de parasitas liberados pelas células hospedeiras.

O aumento na capacidade de penetração do parasita nas células LLC-MK2, induzido por anticorpos monoclonais, sugeria a hipótese de que esses anticorpos seriam capazes de interagir com as células LLC-MK2. Tal hipótese foi descartada pela ausência de reação positiva quando esses anticorpos foram testados pelo método de IFI.

Os resultados obtidos com experimentos em células LLC-MK2, infectadas com parasita opsonizado com anticorpos monoclonais do isótipo IgG3, reativos com as diferentes formas evolutivas do parasita (anticorpos derivados do M5C3), mostraram um aumento da capacidade infectiva da ordem de 2,1-2,7 X em relação ao grupo controle. Esses resultados se opõem aos obtidos por RODRIQUEZ DE CUNA et alli (1991), que observaram que não havia nenhuma alteração na capacidade infectiva do parasita, após tratamento com anticorpo monoclonais IgG3 com especificidade para amastigota.

Em alguns experimentos de infecção de células LLC-MK2, realizados com tripomastigotas de cultura, utilizando-se os anticorpos monoclonais derivados do clone M5C3, em doses sub aglutinantes, observou-se, após 24 horas de cultivo, uma grande número de formas do parasita arredondadas e aglutinadas.

Trabalhos recentes têm sugerido que a cisteína-proteinase estão envolvidas na degradação de proteínas do citoesqueleto celular, comprometendo a integridade das células do hospedeiro e, desta forma, permitindo a invasão pelo parasita (MCKERROW et alli, 1993).

Nossos resultados, no entanto, mostram que anticorpos

capazes de interagir com antígenos na forma tripomastigota sangüícola e de cultura por IFI; correlacionados ou não com polipeptídeos com atividade enzimática, facilitam a penetração do parasita na célula hospedeira. Esses resultados sugerem que as proteinases do *T. cruzi* interferem negativamente na penetração e na multiplicação do parasita na célula hospedeira.

No, entanto, outras estruturas do *T. cruzi* podem ser mais importante no fenômeno de penetração nessas células. Neste sentido, SCHENCKMAN et alli (1993) e MING et alli(1993) têm mostrado que a ligação dos resíduos de ácido siálico, presente na superfície do parasita com seus ligantes na superfície das células hospedeiras, tem participação na penetração do parasita nessas células.

ORTEGA-BARRIA AND PEREIRA (1991) têm relatado, ainda, que a proteína de 60 kDa "penetrin", que liga a heparina, promove a adesão e penetração do tripomastigota nas células de mamíferos.

HERRERA et alli (1994) mostraram que a invasão de células hospedeiras pelo *T. cruzi* era mediada pela interação da penetrin com o receptor heparan sulfato, presente nas células do hospedeiro.

O conjunto de informações sugerem que diferentes estruturas de superfície do parasita, ou estruturas expostas pela ação da neuraminidase ou da sialidase do parasita, podem estar correlacionadas com diferentes receptores nas células hospedeiras pelo fato de que o *T.cruzi*, possui a habilidade de invadir células de diferentes órgãos do hospedeiro.

CONCLUSÕES

V - CONCLUSÕES

As proteinases presentes nas formas amastigota e tripomastigota apresentam em pH ácido, atividade enzimática similar ao da proteinase isolada da forma epimastigota com bandas de atividade enzimáticas correspondentes aos polipeptídeos de 48 e 40 kDa. Em pH neutro foi caracterizada uma cisteína-proteinase de 35 kDa.

A forma tripomastigota apresenta concentração de enzima no mínimo 2X inferior àquela apresentada na forma amastigota e epimastigota.

O soro de camundongo antiproteinase da forma epimastigota imunodetectou polipeptídeos de 55 e 48 kDa, enquanto que o polipeptídeo de 35 kDa não apresentou nenhuma reatividade com esse imune soro.

Os anticorpos monoclonais obtidos imunodetectaram, na forma amastigota, o polipeptídeo de 55 kDa correlacionados com a atividade enzimática e na forma tripomastigota sangüícola um polipeptídeo de 94 kDa não-correlacionado com a atividade enzimática.

O efeito destes anticorpos na interação do parasita com as células macrofágicas ou LLC-MK2, mostraram um aumento na internalização do parasita, devido a neutralização do epítopo da proteinase ou da estrutura de superfície do parasita.

O conjunto desses resultados mostram que as diferentes formas evolutivas do parasita, expressam enzimas da família

cisteína-proteinase com estrutura antigênica relacionada à da proteinase isolada. Entretanto, nenhuma relação antigênica foi observada com a enzima neutra de 35 kDa.

As estruturas correlacionadas com a proteinase ou as estruturas de superfície do parasita interferem negativamente na penetração e na multiplicação do parasita nas células hospedeiras.

RESUMO

VI - RESUMO

Os estudos sobre as protease do *Trypanosoma cruzi* foram realizados utilizando-se as formas epimastigota do parasita. Embora a enzima SH-dependente tenha sido detectada nas diferentes formas evolutivas do parasita (RANGEL et alli, 1981 b). No entanto existem poucos estudos das enzimas presentes nas formas tripomastigota e amastigota.

Neste trabalho, procuramos investigar através da eletroforese em gel de poliacrilamida, a expressão da proteinase nas formas tripomastigota e amastigota com capacidade de degradar a gelatina e obtenção de anticorpos monoclonais reativos com a proteinase de epimastigota.

Os resultados obtidos, no presente trabalho mostram que as formas tripomastigota e amastigota expressam o mesmo polipeptídeo de 48 kDa com atividade enzimática em pH ácido. Entretanto em pH neutro foi detectada uma banda de 35 kDa, e esse polipeptídeo não apresentou nenhuma correlação antigênica com a proteinase de epimastigota.

O efeito dos anticorpos monoclonais com especificidade para a proteinase na invasão e multiplicação do *T. cruzi* nas células hospedeiras mostrou um aumento da infectividade, sugerindo que as proteinase do *T. cruzi* interferem negativamente na penetração e multiplicação do parasita nas células hospedeiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSON, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22:79-89.
- ARAÚJO-JORGE, T.C.; SAMPAIO, E.P. & SOUZA, W. 1986. *Trypanosoma cruzi*: Inhibition of host cell uptake of infective bloodstream forms by alpha-2-macroglobulin. *Z. Parasitenkd.* 72:323-329.
- ASLUND, L. ; HENRIKSSON, J.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A. C. C.; PETTERSSON, U. & CAZZULO, J.J. 1991. The C-terminal extension of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45:345-48.
- BONALDO, M.C.; D'ESCOFFIER, L.N.; SALLES, J.M. & GOLDENBERG, S. 1991 a. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Exp. Parasitol.* 73:44-51.
- BONALDO, M.C.; SCHARFSTEIN, J.; MURTA, A.C.M. & GOLDENBERG, S. 1991 b. Further characterization of *Trypanosoma cruzi* GP 57/51 as the major antigen expressed by differentiating epimastigotes. *Parasitol. Res.* 77:567-571.
- BONGERTZ, V. & HUNGERER, K.D. 1978. *Trypanosoma cruzi*: Isolation and characterization of a protease. *Exp. Parasitol.* 45:8-18.

- BONTEMPI, E.; FRANKE DE CAZZULO, B.M; RUIZ, A.M. & CAZZULO, J.J. 1984. Purification and some properties of an acid protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.** 77B:599-604.
- BONTEMPI, E.; MARTINEZ, J. & CAZZULO, J.J. 1989. Subcellular localization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 33:43-48.
- BONTEMPI, E. & CAZZULO, J.J. 1990. Digestion of human immunoglobulin G by the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.** 70:337-342.
- BRENER, Z. 1987. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 82:205-212.
- CAMARGO, M.E. 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 8:227-234.
- CAMPETELLA, O.; MARTINEZ, J. & CAZZULO, J.J. 1990. A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.** 67:145-150.

- CAZZULO, J.J; COUSO, R; RAIMONDI, A; WERNSTEDT, C. & HELLMAN, U. 1989. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33:33-42.
- CAZZULO, J.J; FRANKE, M.C.C.; MARTINEZ, J. & FRANKE DE CAZZULO, B.M. 1990. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1037:186-191.
- DIAS, J.C.P. 1979. Mecanismos de Transmissão em *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, Brener, Z. and Andrade, Z. A. Eds., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.152.
- EAKIN, A.E.; MILLS, A.A.; HARTH, G.; MCKERROW, J.H & CRAIK, C.S. 1992. The sequence, organization and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 267:7411-420.
- FAZEKAS DE ST. GROTH, S. & SCHEIDEGGER, D. 1980. Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics. *J.Immunol.Methods* 35:1-21.
- FERNANDES, J.F. & CASTELLANI, O. 1966. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 18: 195-202.

- GOMES, LAURECIR. 1984. Ação da proteinase de *Trypanosoma cruzi* sobre as imunoglobulinas IgA, IgM e IgG humanas. Tese de Mestrado. Campinas. Universidade Estadual de Campinas.
- GREIG, S. & ASHALL, F. 1990. Electrophoretic detection of *Trypanosoma cruzi* peptidases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 39:31-38.
- HARTH, G.; ANDREWS, N.; MILLS, A.A.; ENGEL, J.C.; SMITH, R. & MCKERROW, J.H. 1993. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58:17-24.
- HARTREE, E.F. 1972. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48:422-427.
- HARLOW, E. & LANE, D. 1988. Antibodies A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. p.139
- HELLMAN, U.; WERNSTEDT, C. & CAZZULO, J.J. 1991. Self-proteolysis of the cysteine proteinase, cruzipain from *Trypanosoma cruzi* gives a major fragment corresponding to its carboxy-terminal domain. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44:15-22.
- HERRERA, E.M.; MING, M., ORTEGA-BARRIA, E. & PERREIRA, M.E.A. 1994. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparan sulfate receptors on host cells and penetrin counter-receptors

on the trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65:73-83.

HOWARD, J. E. & RUBIO, M. 1968. Enfermedad de Chagas congênita I. Estudio clinico y epidemiológico de 30 casos. *Bol. Chil. Parasitol* 23:107-112.

ITOW, S. & CAMARGO, E.P. 1977. Proteolytic activities in cell extracts of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* 24:591-595.

LACKS, S.A. & SPRINGHORN, S.S. 1980. Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* 255:7467-473.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

LEFKOVITS, I. & WALDMANN, H. 1984. Limiting dilution analysis of the cells of immune system. 1- The clonal basis of the immune response. *Immunol. Today* 5:265-268.

MARSDEN, P.D. 1983. The transmission of *Trypanosoma cruzi* infecti on to man and its control, in Human Ecology and Infectious Diseases, Croll, N.A. and Cross, J.M., Eds., Academic Press, New York, p.253.

- MARTINEZ, J. & CAZZULO, J.J. 1992. Anomalous electrophoretic behaviour of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* in relation to its apparent molecular mass. **FEMS Microbiol. Lett.** 95:225-230.
- MCKERROW, J.H.; JONES, P.; SAGE, H. & PINO-HEISS, S. 1985. Proteinases of invasive larvae of the trematode parasite *Schistosoma mansoni* degrade connective-tissue and basement-membrane macromolecules. **Biochem. J.** 231:47-51.
- MCKERROW, J.H.; SUN, E ; ROSENTHAL, P.J. & BOUVIER, J. 1993. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. **Annu. Rev. Microbiol.** 47:821-53.
- MEIRELES, M.N.L.; JULIANO, L.; CARMONA, E.; SILVA, S.G.; COSTA, E.M.; MURTA, A.C.M. & SCHARFSTEIN, J. 1992. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Mol. Biochem. Parasitol.** 2:175-184.
- MING, M.; CHUENKOVA, M.; ORTEGA-BARRIA, E. & PEREIRA, M.E.A. 1993. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. **Mol. Biochem. Parasitol** 59:243-252.

- MURTA, A.C.M.; PERSECHINI, P.M.; SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W.; GUIMARÃES, J.A & SCHARFSTEIN, J. 1990. Structural and functional identification of GP 57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43: 27-38.
- ORTEGA-BARRIA, E. & PEREIRA, M.E.A. 1991. A Novel *Trypanosoma cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell* 67:411-421.
- OUCHTERLONY, O. 1958. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy* 5:1-78.
- PIRAS, M.M.; HENRIQUEZ, D. & PIRAS, R. 1985. The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction *Trypanosoma cruzi*-fibroblasts. *Mol. Biochem. Parasitol* 14:151-163.
- RANGEL, H,A.; REPKA, D.; ARAÚJO, P.M.F. & COSTA, M. G. 1977. A neutral proteinase of the epimastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. Resumos da IV Reunião Anual sobre Pesquisa básica em doença de chagas. Caxambú, MG. Brasil, p. 58.
- RANGEL, H.A.; ARAÚJO, P.M.F.; REPKA, D. & COSTA, M. G. 1981 a. *Trypanosoma cruzi*: Isolation and characterization of a proteinase. *Exp. Parasitol* 52: 199-209.

RANGEL, H.A.; ARAÚJO, P.M.F.; CAMARGO, I.J.B.; BONFITTO, M.; REPKA, D.; SAKURADA, J.K. & ATTA, A.M. 1981 b. Detection of a proteinase common to epimastigote, trypomastigotigote and amastigote of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Tropenmed. Parasitol.* 32:87-92.

REPKA, D.; RANGEL, H.A. & COSTA, M.G. 1972. Atividade proteolítica dos extratos de *Trypanosoma cruzi*. Resumos da XXIV reunião anual da Sociedade Brasileira para progresso da Ciência. São Paulo 2-8 julho, p.296.

RODRIGUEZ DE CUNA, C.; KIERSZENBAUM, F. & WIRTH, J.J. 1991. Binding of the specific ligand to Fc receptors on *Trypanosoma cruzi* increases the infective capacity of the parasite. *Immunol.* 72:114-120.

SAKURADA, J.K.; LIMA GABRIEL, D.; CAMARGO, I.J.B.; RANGEL, H. A. & ARAÚJO, P.M.F. 1991. Digestion of immunoglobulin and others protein by *Trypanosoma cruzi* proteinase. Resumo do X Congresso Latino Americano de Parasitologia e I congresso Uruguaio de Parasitologia. Montevideo, Uruguai.

SAKURADA, J.K.; MAURY, A.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; ARAÚJO, P.M.F.; CAMARGO, I.J.B. & RANGEL, H.A. 1992. Anti-*Trypanosoma cruzi*-proteinase antibodies and immunoprotection in experimental Chagas' disease. *Res. Immunol.* 143:157-164.

- SANTOS, E.O & NAKAUTH, C.M. 1986. Método simples de preparação de soro bovino fetal para uso em laboratórios de cultura de tecidos de países em desenvolvimento. *Rev. Fund. SESP* 31:9-12.
- SCHARFSTEIN, J.; SCHECHTER, M.; SENNA, M.; PERALTA, J.M.; MENDONÇA-PREVIATO, L. & MILLES, M.A. 1986. *Trypanosoma cruzi*: Characterization and isolation of a 57/51.000 m.w. surface glucoprotein (GP 57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J. Immunol* 137:1337-1341.
- SCHENKMAN, R.P.; VANDEKERCKHOVE, F. & SCHENKMAN, S. 1993. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 61:898-902.
- SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* 20:191-207.
- SOUTO-PADRÓN, T.; CAMPETELLA, O.E.; CAZZULO, J.J. & DE SOUZA, W. 1990. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: Immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J. Cell Sci.* 96:485-490.
- TOWBIN, H.; STAEGELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-354.

WALDMANN, H. & LEFKOVITS, I. 1984. Limiting dilution analysis of cells of the immune system II: What can be learnt ? *Immunol. Today* 5:295-298.

ZINGALES, B. & COLLI, W. 1985. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with host cell. *Curr. Top. microbiol.Immunol.* 117:129-152.