AJAX MERCÊS ATTA

"AÇÃO DOS INIBIDORES PLASMÁTICOS HUMANOS SOBRE A ATIVIDADE DA PROTEINASE DO *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)".

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Imunologia.

Orientador:
Prof. Dr. HUMBERTO DE ARAÚJO RANGEL

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
CAMPINAS - SÃO PAULO
1982

À Cida, Junior e Laura,

aos meus pais,

ao meu irmão Alex

À todos que ainda são
capazes de um gesto de
solidariedade humana.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Humberto de Araújo Rangel, pelo apoio e valiosa orientação científica prestada durante a execução do presente trabalho.

À Professora e amiga Daria Repka, pela valiosa colaboração prestada durante o curso de Pós-Graduação.

Ao Professor Aquiles Eugênico Piedrabuena, responsável pelas análises estatísticas do presente trabalho.

Aos Professores Adenir Perini, Walter Colli, Jorge Almeida Guimarães e Antonio Carlos Corsini, pelas sugestões oferecidas durante a análise prévia deste trabalho.

Ao Professor Nilmar Rocha, Diretor da Faculdade de Farmácia da U.F.Ba., pelo incentivo e facilidades concedidas para a realização do curso de Pós-Graduação.

À Professora Dirce Franco de Araújo e Elza Andrade Carvalho pela oportunidade de formação científica.

À Professora Julia Keiko Sakurada, pelo apoio e sugestões apresentadas.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial à Srta. Maria Yvani Giorgi, Sra. Alzira Caluzni Castro e Sr. Manoel Bernardo da Silva.

À Sra. Anna Gagliardi, Bibliotecária - Chefe do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela eficiente colaboração prestada.

À Sra. Maria Célia Giorgi Almeida, pela confecção datilográfica deste manuscrito.

À Sra. Esmeralda Zanchetta Borghi, pela confecção dos gráficos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Imunologia.

Meus sinceros agradecimentos

Agradecemos os recursos fornecidos ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia da UNICAMP pelas seguintes Instituições:

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal do Ensino Superior (CAPES)

Organização Mundial de Saúde (Divisão de Imunologia)

Durante o desenvolvimento deste trabalho o autor esteve vinculado ao PICD-UFBa. pelo que externa seus agradecimentos.

SUMÁRIO

Pag.

Pag.

INTRODUÇÃO

As enzimas proteolíticas de microrganismos podem mediar importantes eventos da interação parasita-hospedeiro. Evidências desta participação tem sido obtidas principalmente com proteases de bactérias. Fenômenos de digestão de proteínas do hospedeiro, através de enzimas excretadas pelos microrganismos durante o processo infeccioso, tem sido atribuídos a colagenases do *Clostridium hystoliticum* e do *Clostridium perfringens*, assim como às quinases derivadas de estafilococos e estreptococos (BIDWELL & VAN HEYNINGEN, 1948; MAC LENNAN, 1962; TAGER & DRUMMOND, 1965).

O envolvimento de proteases de microrganismos no mecanismo de evasão à resposta imune do hospedeiro tem sido sugerida para algumas infecções, como por exemplo aquelas causadas por *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningi-*

tidis, em que foi demonstrado a clivagem de um anticorpo presente em mucosas, a IgA_1, por proteases neutras destas bactérias (PLAUT et alii, 1975).

Relacionado com os protozoários, EISEN & TALLAN (1977) propuseram que proteases destes microrganismos poderiam participar no mecanismo de escape à resposta imune através de um processo denominado de fabulação, observado experimentalmente com *Tetrahymena pyriformis*. Este consistiria na clivagem dos anticorpos ligados aos antígenos de superfície do parasito, que por sua vez seriam reduzidos a fragmentos tipo Fab como resultado da digestão enzimática, mas que ainda permaneceriam ligados aos protozoários, bloqueando uma ação posterior dos anticorpos circulantes ou dos linfócitos sensibilizados com o antígeno.

A infecção por microrganismos induz reações inflamatórias no hospedeiro, que envolvem a ativação de sistemas humorais como o sistema da coagulação, do complemento, fibrinolítico e o das cininas (FAUVE, 1980). Estes sistemas possuem a característica comum de serem acionados por mecanismos de reações em cadeia, com a participação de enzimas que são ativadas no decurso da reação (ANDERSON, 1980; FAUVE, 1980).

Paralelamente à ativação destes sistemas humorais, as células inflamatórias recrutadas no sítio da lesão, particularmente os polimorfonucleares e os macrófagos, podem liberar proteases nestas áreas de inflamação, como por exemplo elastases e colagenases (GOLDSTEIN, 1976; BENACERRAF

& UNANUE, 1979; FAUVE, 1980).

A regulação do papel destas várias enzimas proteolíticas endógenas pode ser feito nos mamíferos por proteínas plasmáticas, com mobilidade eletroforética na região das alfa-globulinas, coletivamente denominadas de inibidores plasmáticos de proteinases (HEIMBURGER, 1975; LAURELL & JEPPSSON, 1975; LASKOWSKI & KATO, 1980). Alguns destes inibidores plasmáticos de proteinases também estão presentes nas membranas mucosas dos tratos respiratório e gastrointestinal (HEIMBURGER, 1975).

Pertencem a este grupo de inibidores plasmáticos de proteinases, no homem, as seguintes proteínas: alfa$_2$-macroglobulina, alfa$_1$-antitripsina (também denominada de alfa$_1$-inibidor de proteinases), antitrombina III, o inativador de C$\bar{1}$ esterase, alfa$_1$-antiquimotripsina, inter-alfa inibidor de tripsina e alfa$_2$-antiplasmina (HEIMBURGER,1975; LAURELL & JEPPSSON, 1975; LASKOWSKI & KATO, 1980). Recentemente este grupo foi aumentado com a inclusão de um novo inibidor, com especificidade para tiol proteinases como ficina e papaína, porém sem atividade sobre tiol proteinases de bactérias como a clostripaína (SASAKI et alii, 1977; RYLEY, 1979).

Alguns destes inibidores plasmáticos de proteinases, além de inibirem eficientemente enzimas endógenas, são também capazes de inibir proteases exógenas, tanto de origem bacteriana e vegetal como a subtilisina e a papaína respectivamente (SASAKI et alii, 1974).

No que se refere ao bloqueio da ação de proteinases oriundas de microrganismos, são particularmente eficientes neste processo a alfa$_1$-antitripsina e a alfa$_2$-macroglobulina, como demonstrado para as enzimas proteolíticas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e várias espécies de *Clostridium* (HOCHSTRASSER et alii, 1973; WICHER & DOLOVICH, 1973; KUEPPERS & BEARN, 1966; PAPKE et alii, 1978; SMITH & LINDSLEY, 1939).

Na Doença de Chagas tem sido verificado que a enfermidade se caracteriza fundamentalmente por reações inflamatórias no hospedeiro vertebrado, provocadas pelo *Trypanosoma cruzi* (ANDRADE & ANDRADE, 1979). Tais lesões tem sido verificadas tanto na fase aguda da doença, que se caracteriza por intensa multiplicação parasitária intracelular em diferentes células, como por exemplo células cardíacas, macrófagos, células esqueléticas e lisas, como também estão presentes, apesar de que menos intensamente, na fase crônica, especialmente na forma clínica com comprometimento do miocárdio (ANDRADE & ANDRADE, 1979).

Diversos pesquisadores tem tentado esclarecer a fisiopatogenia destas lesões inflamatórias no decurso da Tripanosomíase Americana, surgindo como possíveis candidatos fatores solúveis liberados do *Trypanosoma cruzi* durante o ciclo intracelular, que são expostos ao microambiente após a rotura das células parasitadas (ANDRADE & ANDRADE, 1979), assim como tem sido sugerido que estas lesões possam ser mediadas por mecanismos imunológicos (RIBEIRO DOS

SANTOS, 1977; TEIXEIRA, 1978).

Enzimas proteolíticas em lisados de formas de cultura do *Trypanosoma cruzi* tem sido demonstradas por diferentes pesquisadores (REPKA et alii, 1972; ITOW & CAMARGO, 1977; RANGEL et alii, 1977; BONGERTZ & HUNGERER, 1978).

Recentemente RANGEL et alii (1981) isolaram uma proteinase de lisados de epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*, que é capaz de hidrolisar a hemoglobina em pH ácido, assim como a caseína e a hemoglobina em pH neutro. Verificaram também estes pesquisadores que esta proteinase está presente na superfície das formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*, conforme os resultados obtidos com a realização das técnicas de imunofluorescência e imunoperoxidase usando estas formas do protozoário como antígenos e o antissoro monoespecífico para a enzima. Além disto, as análises realizadas com microscopia eletrônica, usando cortes de coração de camundongos infectados com *T. cruzi* e a técnica de imunoperoxidase, demonstraram que, ocasionalmente, a proteinase podia ser encontrada em algumas células estruturalmente desorganizadas, próximas aos ninhos de amastigotas (RANGEL et alii, 1981).

Estudos preliminares efetuados com esta proteinase revelaram que a pré-incubação da enzima com soros normais, humanos ou de camundongos, resultava em inibição da atividade proteolítica em pH neutro. Contudo, esta atividade inibitória pareceu estar diminuida nos soros oriundos de

indivíduos e de camundongos infectados com o *T. cruzi* (BELLUCCI, 1979; RANGEL et alii, 1980).

É conhecido, há algum tempo, que pacientes portadores da Doença de Chagas apresentam alterações nos níveis séricos de alfa-globulinas, determinados através da técnica de eletroforese (PINTO & FALCÃO, 1958; CHATTAS et alii, 1958 e 1959; SALUM et alii, 1959). Estas alterações também estão presentes nos soros de camundongos infectados com o *T. cruzi*, conforme demonstrado recentemente por SALATA & RANGEL (1980) que verificaram o consumo de uma alfa-globulina sérica nestes animais durante a doença, revelado por imunoeletroforese cruzada.

A alteração dos níveis séricos das alfa-globulinas durante a Doença de Chagas e a diminuição da atividade inibitória sobre a proteinase do *T. cruzi* verificada com os soros chagásicos podem sugerir o envolvimento dos inibidores plasmáticos de proteinases durante a Tripanosomíase Americana. Tal suposição deriva do fato de que algumas destas proteínas que apresentam mobilidade eletroforética na região das alfa-globulinas são responsáveis pela atividade inibitória do soro frente as enzimas proteolíticas, correspondem a cerca de 10% da concentração das proteínas séricas totais, além de estarem envolvidas em procesos inflamatórios (HEIMBURGER, 1975; LAURELL & JEPPSSON, 1975).

As informações existentes até o momento sobre enzimas proteolíticas do *Trypanosoma cruzi* tem sido apenas de caráter descritivo, não se conhecendo ainda, exatamente, o

significado biológico destes achados. HUTT et alii (1973) propuseram que enzimas do *T. cruzi* poderiam participar ativamente na fisiopatogenia da lesão tecidual verificada na Doença de Chagas e mais recentemente KRETTLI & EISEN (1980) levantaram a possibilidade de que enzimas proteolíticas do parasito poderiam estar envolvidas no mecanismo de evasão à resposta imune do hospedeiro através do processo de fabulação.

A ocorrência da proteinase do *T. cruzi* na superfície das formas sanguícolas e teciduais de diferentes cepas do protozoário (RANGEL et alii, 1981), assim como a sua ação sobre IgG humana (GOMES et alii, 1981), constituem dados que sugerem uma possível participação desta enzima na interação parasita-hospedeiro durante a Tripanosomíase Americana. Contudo, as evidências experimentais sobre a participação da proteinase em qualquer um destes mecanismos propostos ainda são escassas, e consequentemente várias questões precisam ser respondidas para que esta hipótese possa ser definitivamente formulada.

No presente trabalho consideramos a hipótese de que a atividade da proteinase do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro vertebrado pudesse ser limitada ou bloqueada por inibidores plasmáticos de proteases endógenas. Desta forma, propusemo-nos a investigar:

1. se os inibidores plasmáticos humanos eram capazes de neutralizar a atividade da proteinase do *T. cruzi*.

2. se os soros de pacientes chagásicos eram capazes de inibir a atividade da proteinase do *T. cruzi* na mesma extensão que os soros normais.

3. se os níveis séricos dos inibidores da proteinase do *T. cruzi*, em pacientes com a Doença de Chagas crônica, estavam alterados.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Proteinase do *Trypanosoma cruzi*

Para a obtenção da proteinase do *T. cruzi* foi utilizada a metodologia preconizada por RANGEL et alii (1981). Formas de cultivo da cepa Y do protozoário (SILVA & NUSSENWEIG, 1953) em meio LIT (FERNANDES & CASTELLANI, 1966) durante 7 dias a 28°C, foram lavadas 3 vezes com solução gelada de NaCl 0.15 M. Alíquotas de 1 ml da suspensão de parasitos, contendo 5 X 10^8 formas/ml, foram lisadas pela adição de 9 ml de água destilada e liofilizadas. Porções de 0,5 g deste material foram delipidadas através de tratamentos com 50 ml de acetona (2 vezes), mistura acetona-éter (1 vez) e de éter (2 vezes). O material delipidado foi suspenso em 50 ml de solução gelada de NaCl 0.15 M e deixado em repouso em banho de gêlo durante 10 minutos para a obtenção da fração solúvel (FS), que posteriormente foi

separada de resíduos particulados através de centrifugação a 3020 x *g* a 5°C por 30 minutos.

Um litro da fração solúvel, com pH ajustado para 4.5 através da adição de HCl 0.1 N e livre de precipitado por centrifugação (15 minutos a 3020 x *g*, a 5°C), foi transferido para um banho gelado a -20°C seguindo-se a precipitação da proteinase através da adição lenta de 4 litros de acetona, sob agitação constante. A mistura foi deixada em repouso por 18 horas no banho refrigerado e centrifugada a 3020 x *g*, a -15°C, durante 15 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso em 50 ml de NaCl 0.15 M, dialisado contra 5 litros de água destilada durante 18 horas a 4°C e centrifugado para a eliminação de resíduos insolúveis. Esta fração, obtida após a precipitação com a acetona, contém em média 66% da atividade caseinolítica original.

2. Soros humanos

2.1 - Soros humanos normais

Foram obtidos de indivíduos aparentemente sadios, com sorologia negativa para doença de Chagas. Os sangues destes indivíduos foram coletados por punção venosa, deixados coagular à temperatura ambiente, e os soros obtidos centrifugados por 15 minutos a 270 x *g* a 0°C. Estes soros foram congelados e mantidos a -20°C até o momento de sua utilização.

2.2 - Soros de pacientes portadores da Doença de Chagas

Foram obtidos de pacientes seguidos clinicamente no ambulatório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas da UNICAMP e gentilmente cedidos pela Profa. Maria M. S. Vilela.

Todos os soros destes pacientes apresentaram testes sorológicos positivos para Doença de Chagas, conforme determinado através de reações de Guerreiro e Machado e de imunofluorescência indireta. Os pacientes foram classificados como portadores das formas clínicas crônicas cardíaca, digestiva e assintomática através de exames clínicos, eletrocardiográficos e/ou cicloergométricos e radiológicos.

Os soros destes pacientes foram manipulados e estocados em condições idênticas às dos soros normais.

3. Inibidores plasmáticos de proteinases

3.1 - Alfa$_1$ - antitripsina

Foi isolada de um "pool" de soros humanos normais através da metodologia utilizada por BERNINGER & MATHIS (1976) para o isolamento desta proteína do soro de macaco *Rhesus*. A primeira etapa do fracionamento do soro utilizando solução saturada de sulfato de amônio foi substi

tuída por cromatografia em coluna de Sephadex G-200.

As seguintes etapas foram seguidas neste processo de isolamento:

- Fracionamento do soro por cromatografia em coluna de Sephadex G-200 equilibrado em solução salina tamponada (PBS) pH: 7.2, 0.15 M.

- Verificação da presença de $alfa_1$ - antitripsina nas frações da gel-filtração através de imunodifusão radial dupla com antissoro monoespecífico.

- Concentração das frações contendo o inibidor por ultra-filtração em Amicon PM 10.

- Cromatografia por troca iônica, do material concentrado, em resina de DEAE-celulose equilibrada com tampão fosfato de sódio pH: 7.6, 50 mM, contendo 2-mercaptoetanol 1 mM. A eluição foi realizada utilizando-se um gradiente de 0 a 0.5 M de NaCl no referido tampão.

- Concentração das frações contendo $alfa_1$ - antitripsina e diálise contra o tampão fosfato de sódio inicial da cromatografia de troca iônica.

- Cromatografia de afinidade do material dialisado em coluna de Sepharose-Concanavalina A equilibrada com o mesmo tampão da diálise.

- Eluição do inibidor da coluna de Sepharose-ConA através de tampão fosfato de sódio pH: 7.6, 50 mM, contendo 2-mercaptoetanol 1 mM e alfa metil D-manoside 0.1 M.

- Diálise das frações eluidas contra PBS pH: 7.2,

0.15 M e congelamento a -20°C.

Todas as etapas de fracionamento e concentração foram realizadas a 4°C. O material isolado foi testado por imunodifusão e imunoeletroforese frente a antissoros poliespecíficos para proteínas séricas e monoespecíficos para inibidores plasmáticos de proteinases, tendo sido verificado apenas a presença de alfa$_1$-antitripsina. Com um volume inicial de 10 ml de soro, 640 mg de proteínas totais, foram obtidos 4,80 mg de alfa$_1$-antitripsina.

3.2 - Antitrombina III

Foi gentilmente cedida pelo Dr. Jorge Almeida Guimarães, do Departamento de Fisiologia do Centro de Ciências Médicas da U.F.F. Análises imunoquímicas realizadas com este material revelaram que o mesmo era isento de contaminação com os seguintes inibidores plasmáticos: alfa$_1$-antitripsina, alfa$_2$-macroglobulina e $C\bar{1}$ inativador.

4. Antissoros e anticorpos específicos

4.1 - Antissoros anti-inibidores plasmáticos humanos de proteinases

Os seguintes antissoros de coelho anti-inibidores plasmáticos humanos, procedentes de BEHRINGWERKE AG (MARBURG), foram utilizados:

- Antissoro anti-alfa$_1$-antitripsina (Lote 103419 A)

- Antissoro anti - alfa$_2$ macroglobulina (Lote 4604 C)
- Antissoro anti - antitrombina III (Lote 103918 B)
- Antissoro anti - inativador de $C\bar{1}$ (Lote 104204 D)

4.2 - IgG de coelho anti - alfa$_2$ macroglobulina

Fração IgG de antissoro anti - alfa$_2$ macroglobulina, produzido em coelho através de imunizações com a proteína purificada, foi obtida por cromatografia do soro imune em DEAE-celulose, segundo as recomendações de KABAT & MAYER (1968).

5. Reagentes e outros materiais

Os reagentes utilizados neste trabalho tinham a especificação de quimicamente puros.

A acetona foi redestilada a 56°C. O éter livre de peróxido por lavagens sucessivas com solução saturada de sulfato ferroso, e livre de álcoois e água pela adição de sódio metálico, foi destilado a 35°C em presença de sulfato ferroso sêco e conservado a -20°C até o momento do uso.

Resinas

DEAE-Celulose da *Sigma Chemical Co.*; Sephadex G-200 e Sepharose-Concanavalina A foram obtidas da *Pharmacia Upsala.*

Proteína

Caseína do leite foi obtida da *Sigma Chemical Co.*

6. Ensaios enzimáticos com a proteinase do *T. cruzi*

As determinações da atividade proteolítica foram realizadas segundo as recomendações de RANGEL et alii (1981), utilizando caseína como substrato, na concentração de 6 mg/ml em tampão fosfato de sódio pH:7.2, 50 mM, contendo EDTA 20 mM e 2-mercaptoetanol 15 mM. Nestes procedimentos a proteinase foi misturada à 1 ml de substrato e incubada por 2 horas a 37°C. Após este intervalo de tempo foi adicionado à mistura 1 ml de ácido tricloroacético a 5%, seguindo-se uma nova incubação durante 15 minutos a 45°C. A mistura foi centrifugada durante 30 minutos a 1085 x *g* e a absorbância a 280 nm foi determinada no sobrenadante, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico e espectrofotometro ZEISS PMQ II. A diferença de absorbância a 280 nm entre os sobrenadantes dos tubos de reação e controle representou a medida da atividade proteolítica.

Os tubos controles consistiram na incubação em paralelo, de enzima ou substrato, por 2 horas a 37°C, isoladamente. Seguiu-se a adição de ácido tricloroacético a 5% e dos constituintes restantes da mistura de reação, substrato e enzima respectivamente. O "branco" da reação foi rea

lizado misturando-se os seguintes reagentes, e na seguinte ordem: 1 ml de TCA 5%, 6 unidades de enzima e 1 ml de substrato.

Em todos os tubos o volume final da reação foi de 2,3 ml, sendo ajustado quando necessário pela adição de tampão fostato de sódio pH: 7.2, 50 mM.

7. Testes de inibição da atividade proteolítica

7.1 - Testes de inibição com soros humanos

Volumes de 2,5, 5, 10 e 20 microlitros de soros normais e de pacientes portadores da Doença de Chagas foram misturados com 6 unidades de proteinase e incubados durante 30 minutos a 37°C. Após esta operação a reação enzimática prosseguiu como descrito na seção 6, com a adição de substrato e posterior incubação por 2 horas a 37°C. "Brancos"para esta reação de inibição consistiram de tubos individuais com cada volume específico do soro em análise, aos quais foi adicionado 1 ml de TCA 5% após a incubação com a enzima por 30 minutos a 37°C. Estes tubos foram posteriormente incubados em paralelo com os testes por 2 horas a 37°C, sendo então adicionado 1 ml de substrato.

A atividade inibitória foi avaliada comparando-se a absorbância a 280 nm no sobrenadante em que a enzima foi pré-incubada com soro com aquela apresentada pelo tubo em que o volume de soro foi substituído por igual

quantidade de tampão fosfato de sódio. Os resultados dos testes de inibição foram expressos com percentagem de atividade inibitória.

7.2 - Teste de inibição com o soro fracionado por eletroforese

A mobilidade eletroforética em gel de agarose dos inibidores séricos da proteinase do *T. cruzi* foi determinada através de uma modificação do método de BAUMSTARK (1967), para a detecção de inibidores para elastase em amostras de soros fracionados por eletroforese.

Cinco microlitros de um "pool" de soros normais foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão barbital-glicina/Tris, pH: 8.6, força iônica 0.02, sobre lâminas de microscópio. A eletroforese foi realizada utilizando-se uma diferença de potencial de 10 volts/cm durante 45 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram imersas numa solução da proteinase em tampão fosfato de sódio, pH: 7.2, 50 mM, com uma concentração de 6 unidades/ml e incubadas durante 30 minutos a 37°C. O excesso da solução de enzima foi eliminado através da lavagem rápida das lâminas com o tampão fosfato de sódio, seguindo-se a cobertura destas com um segundo gel de agarose, a 1% no referido tampão, contendo 0,1% de caseína, EDTA 20 mM e 2-mercaptoetanol 15 mM. As lâminas foram incubadas durante 20 horas a 37°C, fixadas com ácido-alcool e coradas por Coomassie Brilliant Blue pela maneira usual.

O controle da digestão enzimática foi realizado tratando-se lâminas contendo gel de agarose para eletroforese com tampão fosfato de sódio, cobrindo-as com o gel contendo o substrato e incubando-as durante 20 horas a 37°C. As lâminas foram fixadas e coradas como descrito anteriormente. A mobilidade eletroforética dos inibidores foi determinada comparando-se a posição da área de inibição, obtida após desenvolvimento da reação enzimática no gel contendo o soro fracionado, com uma eletroforese da mesma amostra de soro realizada simultaneamente.

7.3 - Testes de inibição com as frações da cromatografia do soro em Sephadex G-200

Quatro mililitros de um "pool" de soros normais (320 mg de proteínas totais) foram fracionados por gel-filtração em coluna de Sephadex G-200 (120 X 2 cm) equilibrado a 4°C com PBS, pH: 7.2, 0.15 M. Foi utilizada uma eluição com o fluxo de 20 ml/hora e volumes de 5 mililitros foram coletados por tubo. A cromatografia foi acompanhada medindo-se a absorbância das frações a 280 nm, com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico em espectrofotometro ZEISS PMQ II.

Os testes de inibição da atividade proteolítica foram realizados misturando-se 0.2 ml de cada fração eluida com 6 unidades de enzima, seguida da incubação durante 30 minutos a 37°C. A partir deste momento os testes se desenvolveram como descrito na seção 7.1 para inibição

com soros.

7.4 - Testes de inibição com inibidores plasmáticos de proteinases purificados

Alfa$_1$ - antitripsina e antitrombina III foram testados quanto à capacidade inibitória frente à proteinase do *T. cruzi*. Para alfa$_1$ - antitripsina os testes consistiram na incubação prévia de 12.5, 25, 50 e 100 microgramas do inibidor com 6 unidades de proteinase, durante 30 minutos a 37°C e subsequente desenvolvimento da reação enzimática frente à caseína (6 mg/ml) como substrato.

Com antitrombina III foram utilizadas 6.25, 12.5 e 25 microgramas da proteína, em PBS (0,15 M pH: 7.2), frente a 6 unidades da enzima. Também foi testada a atividade inibitória da antitrombina III com 9 unidades da proteinase, usando-se nestes testes 12.5, 25 e 50 microgramas deste inibidor. Em ambos os ensaios foram mantidas as mesmas condições descritas anteriormente de pré-incubação durante 30 minutos a 37°C, do inibidor com a enzima, assim como foram desenvolvidas as reações enzimáticas pelo caminho usual.

8. Caracterização imunoquímica dos inibidores nas frações do soro cromatografado em Sephadex G-200

A ocorrência de inibidores plasmáticos nas fra-

ções eluidas por gel-filtração do soro em coluna de Sephadex G-200 foi investigada através da utilização de antissoros monoespecíficos pelo método da imunodifusão radial dupla de OUCHTERLONY (1958). Neste procedimento 10 ou 20 microlitros de cada fração e de antissoro foram aplicados a poços adjacentes em um gel de agarose a 1% em PBS; pH: 7.2, 0.15 M, contendo azida sódica 0.01%. As amostras difundiram durante 48 horas e em seguida as placas contendo o gel foram lavadas com solução de NaCl 0.15 M sob agitação constante por 24 horas, então reveladas, após desidratação do gel, com Coomassie Brilliant Blue.

9. Verificação da atividade inibitória da alfa$_2$-macroglobulina frente à proteinase do *T. cruzi*

Dois testes foram utilizados para a verificação da atividade inibitória da alfa$_2$-macroglobulina em relação à proteinase. O primeiro, consistiu na medida da correlação entre os níveis de inibição apresentados pelas frações correspondentes ao volume de exclusão da cromatografia do soro em coluna de Sephadex G-200 e suas respectivas concentrações em alfa$_2$-macroglobulina, determinadas por eletroimunodifusão (LAURELL, 1966). Neste procedimento de eletroimunodifusão foram utilizados 10 microlitros das frações 29 a 34 e antissoro de coelho anti-alfa$_2$-macroglobulina diluído a 1/18 em agarose a 1% em tampão barbital-glicina/Tris, pH: 8.6, força iônica 0.02. As amostras foram submetidas a eletroforese no gel contendo anticorpo durante 15 horas, sob uma diferença de potencial de 1 volt/cm. Os picos

obtidos para cada amostra foram comparados com os de um plasma padrão, com concentração de alfa$_2$-macroglobulina conhecida, determinando-se desta forma os níveis da proteína em cada fração, individualmente.

O outro teste realizado consistiu na avaliação da capacidade inibitória das frações do volume de exclusão destituidas de alfa$_2$-macroglobulina por precipitação deste inibidor com a fração IgG de antissoro de coelho com especificidade para esta proteína (seção 4.2). Volumes de 0,5 ml das frações foram tratados com diferentes quantidades de IgG liofilizadas e incubados a 4°C por cerca de 15 horas. Os precipitados foram removidos por centrifugação, 3000 x *g* durante 30 minutos a 4°C, e a atividade inibitória foi determinada no sobrenadante, usando-se 6 unidades de proteinase. Os controles foram realizados testando-se a atividade inibitória presente em 0,5 ml das frações, sem tratamento com IgG alti-alfa$_2$-macroglobulina, incubados sob iguais condições.

10. Determinação dos níveis séricos dos inibidores da proteinase de *T. cruzi* em indivíduos normais e em pacientes portadores da Doença de Chagas.

Na determinação dos níveis dos inibidores nos diferentes soros foi utilizada a técnica de imunodifusão radial (MANCINI et alii, 1965). A alfa$_1$-antitripsina foi quantificada utilizando-se placas de imunodifusão "M-Partigen" procedentes da BEHRINGWERKE AG (MARBURG/LAHN), lote

050564. Antitrombina III e alfa$_2$-macroglobulina foram dosadas usando-se placas de imunodifusão produzidas em nosso laboratório através da incorporação de quantidades apropriadas de antissoros, monoespecíficos para estas proteínas, em gel de agarose a 1% em PBS, pH: 7.2, 0.15 M, contendo azida sódica 0,01%. Para a confecção das curvas padrões foi utilizado um plasma controle obtido da BEHRINGWERKE AG (MARBURG/LAHN), lote 04 7005, contendo concentrações conhecidas destes inibidores séricos de proteinases.

11. Dosagem de proteínas

Os métodos de WEICHSELBAUM (1946) e de LOWRY et alii (1951) foram utilizados nas determinações das concentrações de proteínas, escolhendo-se um ou outro método na dependência das condições experimentais. Os procedimentos técnicos usados nestas dosagens foram os indicados por KABAT & MAYER (1966).

12. Análises estatísticas

O título da atividade inibitória dos soros dos pacientes portadores da Doença de Chagas em relação ao dos soros normais, tomado como padrão, foi determinado pelo método de dosagem por retas paralelas (FINNEY, 1964), usando-se 8 pontos.

As concentrações dos inibidores séricos da enzima nos pacientes com a Doença de Chagas foram comparadas

com as dos indivíduos normais utilizando-se o teste não-paramétrico de KRUSKAL & WALLIS (In CAMPOS, 1973), usando-se o critério de contrastes bilaterais com soros normais como testemunha quando apresentou um valor de H significativo.

RESULTADOS

1. Caracterização parcial dos inibidores plasmáticos da proteinase do *T. cruzi*

1.1 - Mobilidade eletroforética

Os testes de inibição realizados com amostras de soros fracionadas por eletroforese em gel de agarose indicaram que proteínas séricas com mobilidade eletroforética nas regiões das alfa-globulinas inibem a atividade da proteinase do *T. cruzi* (Figura 1). Nas condições utilizadas nestes testes, incubação do soro fracionado com a proteinase durante 20 horas a 37°C, a inibição não se modifica.

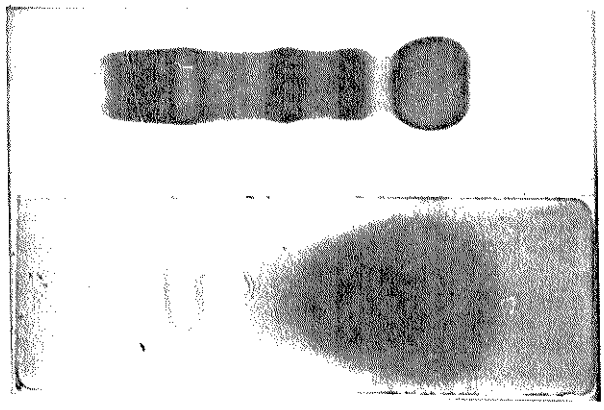

FIGURA 1 - Inibição da atividade da proteinase do *T. cruzi* por soro fracionado por eletroforese.

(a) eletroforese do soro

(b) inibição da atividade caseinolítica após a eletroforese

1.2 - Comportamento cromatográfico após gel-filtração do soro em coluna de Sephadex G-200

Testando-se a atividade inibitória das frações obtidas por cromatografia do soro em coluna de Sephadex G-200, frente a proteinase do *T. cruzi*, foram verificadas três diferentes zonas de inibição. A primeira zona correspondeu às frações eluidas no volume de exclusão da gel-filtração, indicando a participação de proteína(s) com alto peso molecular na atividade inibitória do soro normal. A segunda zona compreendeu as frações eluidas na região ascendente do pico de eluição das proteínas 7S, enquanto que a terceira zona de inibição, a mais proeminente, se localizou nas frações eluidas entre os picos de eluição das proteínas 7S e 4.5 S (Figura 2).

Foi investigada a presença dos seguintes inibidores plasmáticos de proteinases nas três zonas de inibição: alfa$_2$-macroglobulina, inativador de C$\bar{1}$, antitrombina III e alfa$_1$-antitripsina. Através dos testes de imunodifusão com antissoros monoespecíficos para estas proteínas foi verificada a presença de alfa$_2$-macroglobulina nas frações da primeira zona de inibição, do inativador de C$\bar{1}$ na segunda zona, enquanto que a antitrombina III e a alfa$_1$-antitripsina foram eluidas juntas na terceira zona de inibição (Tabela 1).

2. Atividade inibitória da alfa$_2$- macroglobulina frente a proteinase do *T. cruzi*.

A atividade inibitória da alfa$_2$ - macroglobulina

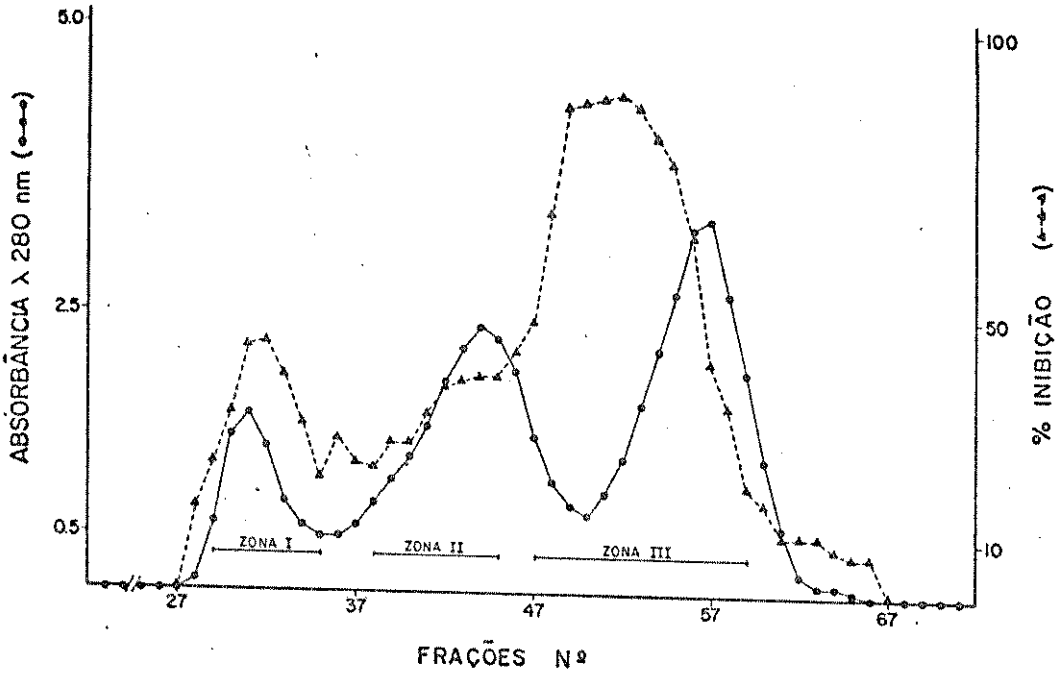

FIGURA 2 - Distribuição da atividade inibitória e proteínas após a cromatografia do soro em coluna de Sephadex G-200.

TABELA 1 - Inibidores plasmáticos de proteinases nas frações correspondentes às zonas de inibição obtidas por gel-filtração do soro em Sephadex G-200.

Frações	α_2M	$C\bar{1}$ INA	AT III	α_1AT
29 a 35	+	-	-	-
38 a 45	-	+	-	-
48 a 59	-	-	+	+

α_2M = alfa$_2$-macroglobulina; AT III = antitrombina III;

$C\bar{1}$ INA = inativador de $C\bar{1}$; α_1AT = alfa$_1$-antitripsina.

sobre a proteinase do *T. cruzi* foi demonstrada através do tratamento das frações da primeira zona de inibição, provenientes da gel-filtração do soro em Sephadex G-200, com a fração IgG de soro imune de coelho com especificidade para este inibidor. A remoção da alfa$_2$-macroglobulina destas frações, através da precipitação imune com o anticorpo específico, aboliu a atividade inibitória, indicando que a reação é mediada por esta proteína. A Tabela 2 apresenta o resultado do teste de inibição efetuado com a fração 32 após a remoção da alfa$_2$-macroglobulina.

A projeção gráfica das concentrações de alfa$_2$-macroglobulina, presentes em 0,2 ml de cada fração da primeira zona de inibição, *versus* as atividades inibitórias correspondentes indicou uma relação linear entre estas duas variáveis, com um coeficiente de correlação de 0,98 (Tabela 3, Figura 3). Este resultado evidenciou um efeito dose-resposta, quando se relaciona a concentração da proteína com a sua atividade inibitória frente a proteinase do *T. cruzi*.

3. Atividade inibitória da alfa$_1$-antitripsina frente a proteinase do *T. cruzi*

Testes de inibição da atividade da proteinase do *T. cruzi* foram realizados incubando-se diferentes concentrações da preparação purificada de alfa$_1$-antitripsina com 6 unidades da enzima, durante 30 minutos a 37°C. As atividades proteolíticas residuais obtidas nestes testes

TABELA 2 - Efeito da remoção da alfa$_2$-macroglobulina sobre a atividade inibitória da fração correspondente ao pico da primeira zona de inibição (fração 32)

Material misturado com a proteinase	Absorbância a 280 nm	% de inibição
fração 32	0.42	33,33
fração 32 tratada com anticorpo	0.63	0
anticorpo (30 mg/ml em PBS)	0.63	0
PBS*	0.63	-

* 100% de atividade

TABELA 3 - Concentração de alfa$_2$-macroglobulina e atividade inibitória em 0,2 ml das frações correspondentes à primeira zona de inibição, obtida após gel-filtração do soro em Sephadex G-200.

Frações	Concentração de alfa$_2$-macroglobulina (microgramas)	% de inibição
29	9,8	23,40
30	33,0	31,50
31	56,0	44,40
32	62,6	45,20
33	39,6	38,70
34	23,0	29,80

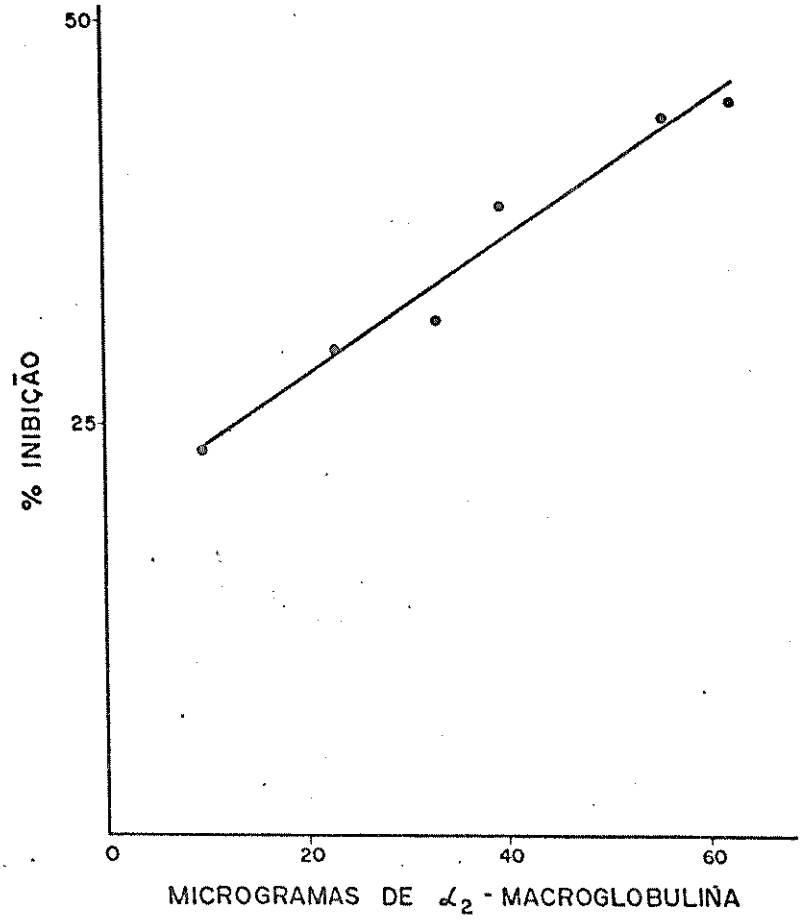

FIGURA 3 - Relação entre a concentração de alfa$_2$- macroglobulina e atividade inibitória em amostras de 0,2 ml das frações da primeira zona de inibição. Os valores representados graficamente são mostrados na Tabela 3.

$Y = 19,41 + 0,43\ X$; $r = 0,98$; para o coeficiente angular, $p < 0.001$

demonstraram que a alfa$_1$-antitripsina é um dos inibidores plasmáticos da proteinase, tendo sido verificado que a inibição mediada por esta proteína é proporcional à quantidade do inibidor utilizada (Tabela 4).

Esta relação entre a concentração de alfa$_1$-antitripsina e a atividade inibitória sobre a proteinase está representada graficamente na Figura 4, onde foi projetado na abcissa, em escala logarítmica, as quantidades do inibidor utilizadas, e na ordenada os probitos das percentagens de inibição obtidas.

4. Atividade inibitória da antitrombina III frente a proteinase do *T. cruzi*.

A atividade inibitória da antitrombina III sobre a proteinase foi avaliada através da medida da atividade proteolítica residual das misturas da enzima com esta proteína. Foi verificado que a pré-incubação da proteinase com diferentes quantidades de antitrombina III, durante 30 minutos a 37°C, resultou em inibição da atividade enzimática, usando-se 6 ou 9 unidades da enzima (Tabela 5).

Na Figura 5 estão representados graficamente os valores da atividade inibitória mediada pela antitrombina III diante de 9 unidades da proteinase. Aparentemente, a inibição efetuada por esta proteína, nas condições utilizadas no presente trabalho, se caracteriza por exibir pequenas variações na sua evolução, considerando-se a progres-

TABELA 4 - Inibição da atividade da proteinase do *T. cruzi* por diferentes concentrações de alfa$_1$-antitripsina.

Microgramas de alfa$_1$-antitripsina utilizadas	absorbância λ 280 nm	% de inibição
-	0.60	-*
12,5	0,50	16,70
25,0	0.43	28,30
50,0	0.29	51,70
100,0	0.13	78,30

* 100% de atividade proteolítica

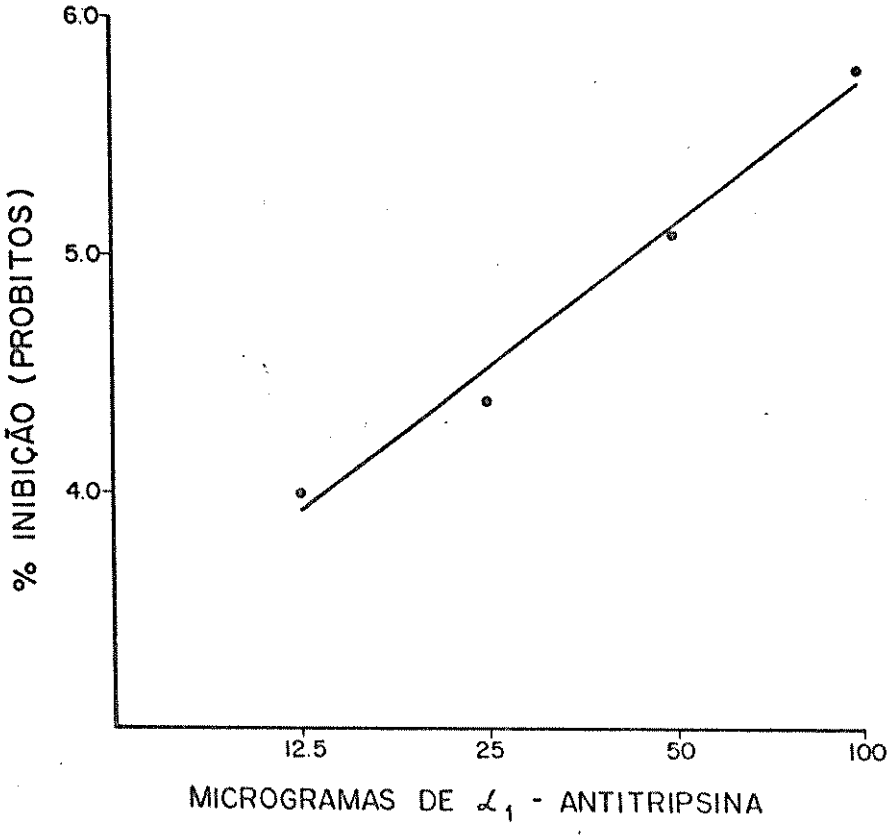

FIGURA 4 - Atividade inibitória da alfa$_1$-antitripsina sobre a proteinase do *T. cruzi*.

As concentrações de alfa$_1$-antitripsina estão representadas em escala logarítimica.

$Y = 1,68 + 2,03\ X$; $r = 0,99$; para o coeficiente angular $p < 0.01$.

TABELA 5 - Efeito inibitório de diferentes quantidades de antitrombina III sobre a atividade da proteinase do *T. cruzi*.

Microgramas de antitrombina III	Proteinase (6U)		Proteinase (9U)	
	$A_{280\ nm}$	% inibição	$A_{280\ nm}$	% inibição
-	0.64	-*	0.92	-*
6,25	0.42	34,40	nd	nd
12,5	0.30	53,10	0.61	33,70
25,0	0.27	57,80	0.50	45,70
50,0	nd	nd	0.35	62,00

* 100% de atividade proteolítica

nd = não determinado

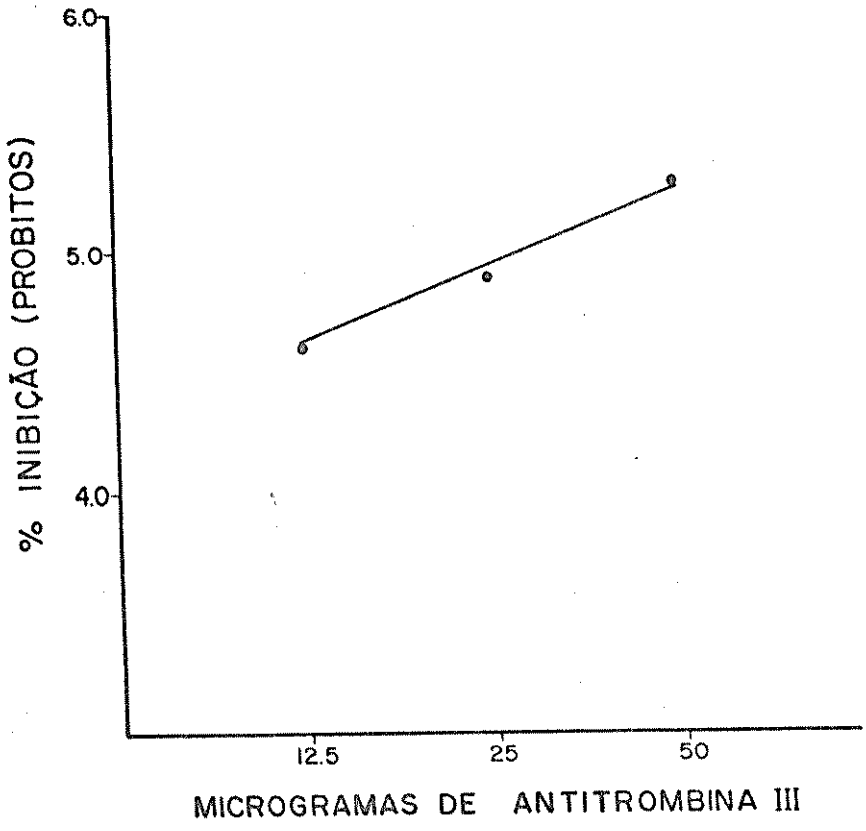

FIGURA 5 - Atividade inibitória da antitrombina III sobre a proteinase do *T. cruzi*.

Os valores representados correspondem à inibição de 9 U da proteinase (Tabela 5). As concentrações de antitrombina III estão representadas em escala logarítimica.

$Y = 3,31 + 1,16\ X$; $r = 1$; para o coeficiente angular $p < 0.05$.

são das quantidades do inibidor usada (Figura 5).

5. Avaliação da atividade inibitória dos soros de pacientes portadores da Doença de Chagas.

Soros de indivíduos normais e de pacientes portadores de diferentes formas clínicas crônicas da Doença de Chagas foram testados quanto a atividade inibitória frente a proteinase do *T. cruzi*. Nestes testes foram utilizados 5 soros normais, procedentes de diferentes indivíduos, e 15 soros de diferentes pacientes portadores da doença, representando cada grupo de 5 as formas crônicas assintomática, cardíaca e digestiva.

Os resultados da atividade inibitória com diferentes alíquotas destes soros são apresentados na Tabela 6.

Verifica-se, inspecionando-se a Tabela 6, que a atividade inibitória evolui como uma curva sigmóide quando se projeta graficamente a percentagem de inibição em ordenada *versus* o logaritimo dos volumes dos soros utilizados, na abcissa. A transformação desta curva sigmóide numa reta é possível substituindo-se as percentagens de inibição por seus respectivos probitos. Esta transformação é exemplificada na Figura 6, onde foi projetada a atividade inibitória do soro assintomático número 5 (Tabela 6).

Realizada esta transformação, para cada soro investigado, procedeu-se a determinação do título da ativi-

TABELA 6 - Atividade inibitória dos soros humanos normais e de pacientes portadores da Doença de Chagas crônica, sobre a proteinase do *T. cruzi*.*

Soros	volume de soro (microlitros)			
	2,5	5,0	10,0	20,0
Normais				
1	57,50	75,00	90,00	95,00
2	56,70	63,30	89,00	91,30
3	47,50	68,30	89,80	96,70
4	48,30	53,30	89,70	95,00
5	55,00	62,50	84,30	92,30
Assintomáticos				
1	41,70	66,70	89,30	93,30
2	39,20	68,30	92,30	95,00
3	35,80	59,20	85,30	93,30
4	45,00	65,80	83,30	90,70
5	23,30	38,30	58,30	78,30
Cardiopatas				
1	49,20	67,50	87,70	93,30
2	37,50	70,80	90,00	94,30
3	35,80	45,80	69,20	88,00
4	35,80	71,70	93,70	96,30
5	34,20	48,30	86,00	90,70
Forma digestiva				
1	51,70	64,20	93,30	99,90
2	48,30	90,30	92,30	98,00
3	55,80	61,70	90,70	96,70
4	56,70	82,50	96,70	96,70
5	40,80	51,70	61,70	87,70

*Resultados expressos em percentagem de inibição.

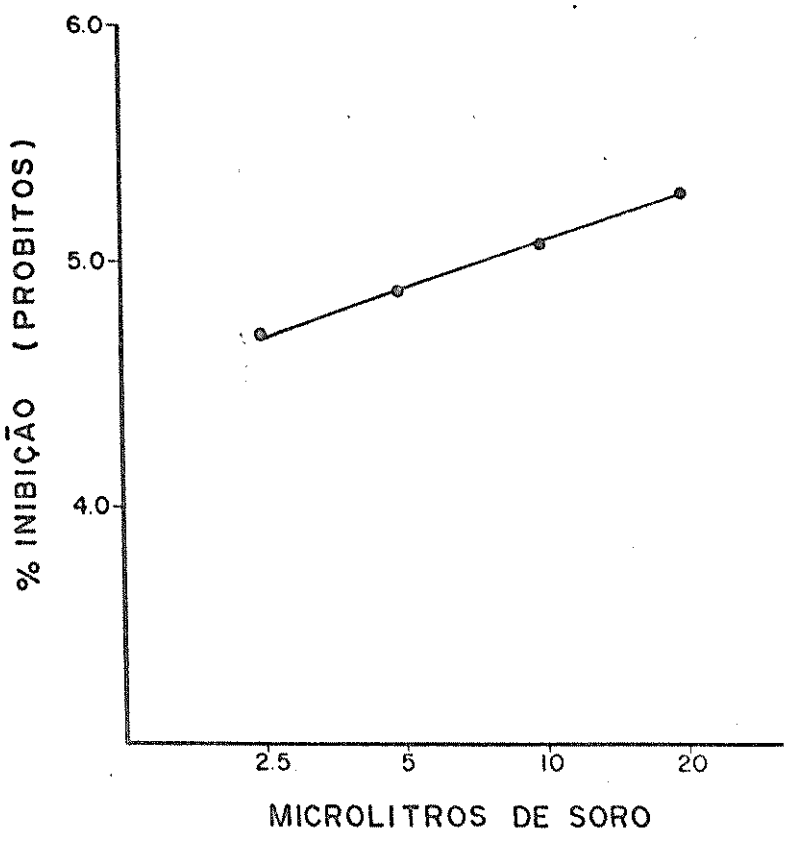

FIGURA 6 - Inibição da atividade proteolítica da proteinase do *T. cruzi* por soro.
Os volumes de soro utilizados estão representados em escala logarítimica.

dade inibitória nos grupos de soros representativos das diferentes formas clínicas da doença, através do método de dosagem por retas paralelas, usando-se os soros normais como padrão. Este método foi escolhido em virtude da verificação do paralelismo entre as retas das atividades inibitórias dos soros testados, normais e de pacientes. Obtendo-se um coeficiente angular comum para as diversas retas, o título R dos soros dos pacientes, em comparação ao dos soros normais, corresponde ao antilogaritimo da relação M entre as atividades inibitórias dos soros dos pacientes e dos soros normais. A relação M é obtida através da seguinte equação:

$$M = \frac{\bar{Y}c - \bar{Y}n}{b} + \bar{X}n - \bar{X}c,$$

onde os índices n e c correspondem a normais e chagásicos respectivamente e b é o coeficiente angular comum.

Os resultados destas titulações são apresentados na Tabela 7 enquanto que na Tabela 8 são mostrados os valores correspondentes à análise de variância.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 7, verificou-se que há uma diminuição da atividade inibitória nos soros dos pacientes portadores das formas clínicas assintomática e cardíaca enquanto que nos soros dos pacientes com a forma digestiva esta atividade apresentou-se aumentada.

TABELA 7 - Títulos das atividades inibitórias dos soros de pacientes chagásicos frente a proteinase do *T. cruzi*.

Forma clínica	Título*	Intervalo de confiança **
Assintomática	72,80	73,43 - 74,20
Cardíaca	81,60	80,60 - 82,70
Digestiva	120,97	117,31 -124,76

* O título representa a percentagem de atividade inibitória em relação à dos soros normais tomada como padrão (100% de atividade).

** Intervalo de confiança para $p < 0,05$.

TABELA 8 - Análise de variância relativa às titulações das atividades inibitórias por soros de pacientes portadores da Doença de Chagas.

Causas de variação	GL	Valores de F		
		Controle X Chagásicos$_1$	Controle X Chagásicos$_2$	Controle X Chagásicos$_3$
Controle X Chagásicos	1	8,431*	4,916 N.S	1,783 N.S
Regressão 1º grau	1	200,976***	286,401***	118,166***
Paralelismo	1	0,259 N.S	1,167 N.S	1,405 N.S
Regressão 2º grau	1	0,160 N.S	0,307 N.S	0,246 N.S
Paralelismo	1	0,653 N.S	1,059 N.S	0,042 N.S
Regressão 3º grau	1	3,589 N.S	6,777*	1,040 N.S
Paralelismo	1	0,508 N.S	0,176 N.S	0,686 N.S
Entre dose	7	30,653***	42,972***	17,624***
Resíduos	32	-	-	-
Total	39			
Coeficiente de variação		4,88%	4,19%	6,65%

Chagásicos$_1$: assintomáticos

Chagásicos$_2$: cardiopatas

Chagásicos$_3$: com síndrome digestiva

N.S : não significativo

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

6. Níveis séricos dos inibidores da proteinase do *T. cruzi* durante a fase crônica da doença

Foram investigados os níveis de alfa$_2$-macroglobulina, antitrombina III e de alfa$_1$-antitripsina nos soros dos pacientes cuja atividade inibitória foi determinada na seção anterior. Nesta investigação foi utilizada a técnica de imunodifusão radial e,as concentrações destes inibidores nos soros dos pacientes foram comparadas com as apresentadas pelos soros normais, determinadas simultaneamente, através do método não-paramétrico de Kruskal - Wallis. Os resultados destas dosagens são apresentados na Tabela 9.

Através da análise estatística destes resultados verificou-se que não haviam diferenças nos níveis de antitrombina III e de alfa$_1$-antitripsina, quando comparadas as concentrações destes inibidores nos soros dos pacientes chagásicos com aquelas apresentadas pelos soros do grupo controle. Os valores de *H* para os testes de comparação foram 1,33 e 0,38, quando analisados os níveis de antitrombina III e de alfa$_1$-antitripsina respectivamente. Foi verificada a diminuição dos níveis de alfa$_2$- macroglobulina nos soros dos pacientes portadores da forma clínica digestiva, enquanto que não foram observadas alterações na concentração desta proteína nos soros dos pacientes com as formas clínicas assintomáticas e cardíaca da doença. Da análise estatística dos níveis séricos de alfa$_2$-macroglobulina foi excluido o soro controle número 4, que apresentou uma concentração desta proteína igual a 0,680 mg/ml, situando-se

TABELA 9 - Níveis séricos de alfa$_2$-macroglobulina, antitrombina III e de alfa$_1$-antitripsina em indivíduos normais e em pacientes com a Doença de Chagas crônica.

Soros	miligramas / ml de soro		
	alfa$_2$-macroglobulina	antitrombina III	alfa$_1$-antitripsina
Normais			
1	1,480	0,200	1,100
2	2,060	0,232	0,900
3	2,200	0,180	0,700
4	0,680	0,128	1,350
5	3,240	0,200	2,650
Assintomáticos			
1	2,900	0,220	0,650
2	2,060	0,240	1,925
3	1,680	0,188	0,700
4	3,060	0,156	1,800
5	1,680	0,120	0,400
Cardiopatas			
1	1,120	0,220	2,150
2	1,960	0,140	0,700
3	1,260	0,120	0,260
4	1,820	0,180	1,700
5	1,440	0,156	1,250
Forma digestiva			
1	0,920	0,156	0,250
2	0,980	0,232	2,150
3	1,540	0,180	2,250
4	1,580	0,220	1,350
5	1,400	0,136	0,250

muito abaixo da menor média que seria obtida com os valores apresentados na Tabela 9, referentes aos níveis deste inibidor nos diferentes soros testados. Com a exclusão deste dato espúrio foi obtido um coeficiente de variação igual a 28,90% e um valor de H igual a 9,66 para o teste de KRUSKAL & WALLIS, sendo significativo este resultado pois $H > 7,81$. Comparando-se os níveis séricos de alfa$_2$-macroglobulina dos pacientes com a forma clínica digestiva com aqueles apresentados pelos soros controles obteve-se um valor de Δ igual a 9,1, o que demonstra uma diferença significativa ao nível de $p < 0.05$.

DISCUSSÃO

Os inibidores plasmáticos de proteinases constituem um grupo de proteínas especializadas no controle e limitação das atividades proteolíticas das enzimas endógenas dos mamíferos, responsáveis pela ativação dos sistemas humorais de defesa e reparação. Alguns desses inibidores também podem bloquear a ação de várias proteinases, de diferentes origens e classes (SASAKI et alii, 1974; HEIMBURGER, 1975; LAURELL & JEPPSSON, 1975; LASKOWSKI & KATO, 1980).

A presença dos inibidores plasmáticos de proteinases em mucosas dos tratos respiratório e gastrointestinal, assim como a sua ação bloqueadora sobre proteases de microrganismos (KUEPPERS & BEARN, 1966; HOCHSTRASSER et alii, 1973; WICHER & DOLOVICH, 1973; PAPKE et alii, 1978), indicam que, nos mamíferos, essas proteínas integram o sistema geral de defesa inespecífica às infecções por microrganismos

(HEIMBURGER, 1975).

Apesar de existirem vários relatos da ação dos inibidores plasmáticos sobre proteinases de microrganismos, nada se conhece sobre a interação destas proteínas com as enzimas proteolíticas do *Trypanosoma cruzi*. Tal fato reveste-se de importância em virtude das sugestões de alguns pesquisadores de que proteases deste parasito podem estar envolvidas na patogênese da Tripanosomíase Americana, seja como um dos agentes causadores da lesão tecidual (HUTT et alii, 1973), seja através da atribuição de um papel ativo no mecanismo de evasão do tripamastigota à resposta imune do hospedeiro pelo processo de fabulação (KRETTLI & EISEN, 1980). Contudo, para que se possa aventar essas hipóteses é necessário o conhecimento das características funcionais das proteases envolvidas, como também precisa ser considerada a possibilidade de que os inibidores plasmáticos de proteinases, existentes nos hospedeiros vertebrados do *Trypanosoma cruzi*, possam limitar ou mesmo bloquear a ação dessas enzimas.

A investigação conduzida no presente trabalho sobre os inibidores plasmáticos da proteinase isolada de lisados de epimastigotas do *T. cruzi* (ARAÚJO, 1979) decorreu das observações da presença desta enzima na superfície das três formas evolutivas do parasito (RANGEL, et alii, 1981), da verificação da sua atividade proteolítica sobre proteínas séricas humanas como a albumina (ARAÚJO, 1979) e a IgG (GOMES et alii, 1981) e finalmente, da observação da atividade inibitória dos soros normais sobre a ação da proteinase, com

diminuição desta atividade do soro na Doença de Chagas (BELLUCCI, 1979; RANGEL et alii, 1980).

Dois tipos de abordagens foram realizadas. A primeira tratou da identificação das proteínas do soro humano capazes de inibir a ação da proteinase do *T. cruzi* enquanto que a segunda consistiu na verificação, em caráter preliminar, do comportamento destes inibidores durante a fase crônica da Doença de Chagas. Em ambos os casos usamos a proteinase semi-purificada através da precipitação com a acetona pois, como verificado por ARAÚJO (1979), a atividade caseinolítica dessas preparações se deve quase que exclusivamente à presença da proteinase.

Na caracterização parcial das proteínas séricas com atividade inibitória para a proteinase utilizamos, à semelhança com outros trabalhos na área dos inibidores plasmáticos (SHTACHER et alii, 1973; SASAKI et alii, 1974; WESTROM, 1979), testes de inibição com frações obtidas por gel-filtração do soro em Sephadex G-200 e com amostras de soro fracionadas por eletroforese, o que possibilitou as informações sobre as propriedades físico-químicas dos inibidores.

Através dos testes de inibição com soro fracionado por eletroforese foi verificado que as proteínas séricas capazes de inibir a enzima migravam nas regiões das alfa-globulinas, surgindo desta forma a primeira evidência de que o bloqueio da atividade da proteinase poderia ser mediado por inibidores plasmáticos conhecidos. Testando as frações provenientes da cromatografia do soro em Sephadex G-200 verifi-

camos que a atividade inibitória do soro era partilhada por proteínas de diferentes pesos moleculares. Estas frações mostraram-se adequadas para a realização das análises imunoquímicas pois corresponderam a preparações semi- purificadas dos inibidores da proteinase, facilitando desta forma o processo de identificação.

As análises imunoquímicas realizadas com as frações do volume de exclusão da gel-filtração do soro possibilitaram a caracterização da alfa$_2$-macroglobulina com um inibidor da atividade da proteinase do *T. cruzi*. Tal resultado já era esperado desde que esta proteína tem a capacidade de ligar e inibir várias proteinases, independente da classe funcional ou da origem (BARRETT & STARKEY, 1973). Segundo estes autores, o processo de inibição se iniciaria com a clivagem de uma ligação peptídica da alfa$_2$- macroglobulina, que por sua vez conduziria a uma troca conformacional na molécula da proteína, resultando no engolfamento irreversível da enzima. Com algumas proteases, como por exemplo a tripsina, esta interação com a alfa$_2$-macroglobulina não bloqueia completamente a ação enzimática sobre alguns substratos proteícos desnaturados, caseína e fibrina desnaturadas, ou o fibrinogênio na sua forma nativa (RINDERKNECHT & GEOKAS, 1973). Também tem sido verificado que enzimas complexadas com esta proteína são ainda capazes de agirem sobre substratos sintéticos de baixo peso molecular, assim como podem ser inibidas por inibidores proteícos pequenos (LASKOWSKI & KATO, 1980).

Verificamos um efeito dose-resposta quando confron-

tamos as concentrações de alfa$_2$-macroglobulina, nas alíquotas das frações do volume de exclusão da gel-filtração do soro, com as atividades inibitórias mediadas pelas mesmas. O coeficiente angular nesta relação, quando analisado estatisticamente, mostrou-se altamente significativo.

Através da utilização de preparações purificadas da alfa$_1$-antitripsina e de antitrombina III foi demonstrado que a terceira zona de inibição, observada nos testes de atividade inibitória das frações da cromatografia do soro em Sephadex G-200, correspondia ao efeito inibitório conjunto destas duas proteínas sobre a atividade proteinásica. As atividades inibitórias mediadas por estas duas proteínas apresentam padrões distintos de evolução, evidenciados pelas inclinações das suas retas representativas. Apesar de ter sido verificado que o bloqueio da atividade proteinásica por ambas as proteínas se relaciona linearmente com a concentração utilizada do inibidor, esta relação é mais pronunciada para a alfa$_1$-antitripsina. É possível que esta diferença, em analogia às interações destes inibidores com outras proteinases como por exemplo entre alfa$_1$-antritripsina e tripsina e antitrombina III com trombina, reflita as velocidades com que se processam as atividades inibitórias mediadas por alfa$_1$-antitripsina e antitrombina III diante da proteinase do *T. cruzi*, o que poderia caracteriza-las como imediata e tempo-dependente, respectivamente.

A alfa$_1$-antitripsina é capaz de inibir as atividades proteolítica e esterolítica de várias proteases como por exemplo tripsina, quimotripsina, elastases e colagena-

ses, através da formação imediata de um complexo estável de relação molar 1:1 (JEPPSSON & LAURELL, 1975). Também tem sido verificado que proteases oriundas de microrganismos como a subtilopeptidase A (WICHER & DOLOWICH, 1973) e aquelas derivadas do *Aspergillus oryzae* (BERGKVIST, 1963) são passíveis de inibição por esta proteína. Não se conhece exatamente o mecanismo desta inibição de proteinases através da alfa -antritripsina, existindo a sugestão de que poderia ser análogo ao verificado com inibidores moleculares pequenos, ocorrendo o ataque proteolítico do inibidor pela enzima, hidrólise de uma ligação peptídica sensível do centro reativo, à qual se seguiria a acilação do sítio ativo da enzima (HEIMBURGER, 1975). Existem evidências de que resíduos de lisina e arginina da alfa$_1$-antitripsina estejam envolvidos nesta interação desde que o tratamento da proteína, com anidrido maleíco ou hidrato de fenil-glioxal, que modificam estes resíduos, determina uma perda na capacidade inibitória (HEIMBURGER et alii, 1971; COHEN, 1973). Aparentemente a alfa$_1$-antitripsina inibe a tripsina e a quimotripsina através de diferentes centros reativos na sua molécula pois a modificação dos resíduos arginina por hidrato de fenil-glioxal só bloqueia a atividade inibitória diante da tripsina, permanecendo íntegra esta atividade frente à quimotripsina (COHEN, 1973).

Não dispomos no momento de dados que permitam elucidar a inibição da proteinase do *T. cruzi* por alfa$_1$-antitripsina ao nível molecular. Os resultados obtidos durante a caracterização funcional desta protease (ARAÚJO, 1979) tem

sugerido que se trata de uma enzima SH-dependente, passível de potenciação por agentes redutores como o 2-mercaptoetanol assim como de inibição por reagentes bloqueadores deste grupamento sulfidrila. Também não foi verificado por este autor atividade esterásica com a proteinase, testando-a frente a substratos sintéticos, além de não ter sido inibida por bloqueadores desta atividade como o di-isopropilfluorofosfato, excluindo-a como uma serino-proteinase. Desta forma, achamos prematuro qualquer tentativa de explicação do mecanismo da atividade inibitória da alfa$_1$-antitripsina sobre a proteinase com base nos dados atuais, pois as propriedades catalíticas da enzima diferem daquelas observadas tanto com a tripsina como com a quimotripsina.

A inibição da proteinase do *T. cruzi* por antitrombina III é um achado aparentemente surpreendente em virtude da ausência de relatos sobre a interação deste inibidor com enzimas de microrganismos. Tem sido verificado que esta proteína pode inibir, além da trombina, quase todas proteases envolvidas na coagulação sanguínea, com exceção do fator VIIa (JACKSON, 1980), assim como pode bloquear a ação de enzimas não envolvidas neste sistema, como por exemplo a tripsina, a acrosina, a quimotripsina e a plasmina (HEIMBURGER, 1975; HIGHSMITH & ROSENBERG, 1974). A inibição da trombina, como também da plasmina, por antitrombina III se dá de forma progressiva, é dependente da temperatura e do tempo de incubação, sendo acelerada pela presença de heparina (ROSENBERG & DAMUS, 1973; HIGHSMITH & ROSENBERG, 1974). Complexos do inibidor com estas duas enzimas são formados

durante a interação, apresentando em ambos os casos uma relação molar de 1:1, além de não serem modificados ou dissociados pela heparina (ROSENBERG & DAMUS, 1973; HIGHSMITH & ROSENBERG, 1974). Aparentemente, a inibição da trombina por antitrombina III se efetua via uma interação entre o aminoácido serina do sítio ativo da enzima com resíduo(s) arginina do centro reativo do inibidor, a qual seria facilitada pela heparina, que induziria uma alteração conformacional no inibidor, em virtude da sua ligação com resíduos de lisina da antitrombina III (ROSENBERG & DAMUS, 1973).

No presente trabalho não testamos o efeito da heparina sobre a inibição da atividade enzimática da proteinase do *T. cruzi* por antitrombina III, o que não impediu contudo a observação do efeito inibitório desta proteína sobre a proteinase deste parasito. Estudos sobre a influência deste mucopolissacarídeo sulfatado nesta atividade inibitória estão atualmente sendo planejados, o que possibilitará informações mais detalhadas sobre o mecanismo da interação.

Relacionado com a segunda zona de inibição, obtida após gel-filtração do soro em Sephadex G-200, existe a possibilidade de que o inativador de $C\bar{1}$ possa também se comportar como um inibidor da proteinase do *T. cruzi*, sugerida pela verificação da sua presença nas frações eluidas nesta zona, através da análise imunoquímica realizada. Este inibidor plasmático é o responsável pelo controle da primeira etapa de ativação de todos os quatro sistemas proteolíticos do sangue, correspondendo aos sistemas de coagulação, fibrinólise, calicreína e do complemento (HEIMBURGER, 1975).

Estas informações derivaram das observações realizadas por FORBES et alii (1970), sobre a atividade inibitória desta proteína sobre o antecedente tromboplastínico do plasma (PTA) e sobre o fator Hageman ativados, assim como daquelas verificadas por LEVY & LEPOW (1959) do bloqueio da atividade esterásica do C1 ativado por este inibidor. Estudos mais recentes, realizados por SIM et alii (1980), demonstraram que o inativador de $C\bar{1}$ interage com ambas as proteases envolvidas na ativação da via clássica do sistema complemento, $C\bar{1}r$ e $C\bar{1}s$, através da formação de complexos de relação molar 1:1, que não são degradados por excesso das proteases, além de não serem dissociados por agentes desnaturantes fortes. Estes autores também observaram que a heparina acelerava a velocidade da reação destas proteases com o inibidor, com mais intensidade para com $C\bar{1}s$, guardando certa semelhança com o efeito deste mucopolissacarídeo sulfatado sobre a interação da antitrombina III com trombina.

Maiores informações são necessárias para podermos caracterizar o inativador do $C\bar{1}$ como um dos inibidores plasmáticos da proteinase do *T. cruzi*, mas esta possibilidade deve ser considerada.

Verificamos, testando a atividade inibitória dos soros de indivíduos normais e de pacientes portadores de diferentes formas clínicas crônicas desta enfermidade, diferenças nos títulos desta atividade frente a proteinase do *T. cruzi*. Com as amostras de soros utilizadas, observamos que havia uma diminuição da atividade inibitória nos soros dos pacientes com as formas cardíaca e assintomática enquan-

to que nos soros dos pacientes com a forma clínica digestiva esta atividade se apresentou aumentada. Estes resultados não estão associados com os níveis séricos dos inibidores da proteinase do *T. cruzi* aqui identificados, uma vez que, com exceção da diminuição dos níveis de alfa$_2$-macroglobulina nos soros dos pacientes com a forma digestiva, as concentrações séricas destas proteínas nos indivíduos chagásicos foram equivalentes às apresentadas pelos indivíduos controles. Esta discrepância entre a atividade inibitória do soro total e os níveis séricos dos inibidores nos pacientes com a Doença de Chagas sugere que parte destas proteínas sejam inativadas durante a enfermidade na sua fase crônica, assim como a presença de anticorpos anti-proteinase, possivelmente capazes de inibirem a enzima, que estariam em maior concentração nos soros dos pacientes com manifestações clínicas digestivas. Esta última possibilidade já está sendo investigada no nosso laboratório, tendo os resultados iniciais obtidos sugerido que em alguns soros de pacientes ou de camundongos na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* ocorrem anticorpos com especificidade para a proteinase.

A possibilidade de que durante a Doença de Chagas ocorra a inativação de inibidores plasmáticos de proteinases, com ocasional consumo, é bastante viável em virtude do caráter inflamatório desta enfermidade. Estes eventos poderiam resultar da interação de alguns inibidores, como por exemplo alfa$_1$-antitripsina e alfa$_2$-macroglobulina, com proteases liberadas das células fagocitárias, presentes nas lesões teciduais, ou talvez, também, com proteases do *T. cruzi*.

Diversos fatores podem provocar a liberação de enzimas proteolíticas de leucócitos polimorfonucleares e de macrófagos, incluindo-se entre estes a lesão da membrana destas células por produtos de excreção de microrganismos, a fagocitose de imunecomplexos insolúveis ou de substâncias particuladas, assim como a aderência à superfícies sólidas, como o colágeno, que tenham adsorvido imunecomplexos ou imunoglobulinas agregadas (GOLDSTEIN, 1976; BENACERRAF & UNANUE, 1979).

Analisando-se a patologia da Doença de Chagas, recentemente revista por ANDRADE & ANDRADE (1979), verificamos que alguns destes fatores podem estar envolvidos neste processo. Além disso, alterações funcionais de alguns inibidores plasmáticos de proteinases já tem sido descritas ocorrerem em algumas enfermidades,como na artrite reumatóide, onde foi demonstrado a presença de alfa$_2$-macroglobulina inativada no líquido sinovial de alguns pacientes (SHTACHER et alii, 1973), assim como na doença inflamatória induzida em ratos por adjuvante, na qual existe uma diminuição no nível plasmático da alfa$_1$-antitripsina ativa (SCHNEBLI, 1979). Observações do consumo de inibidores em doenças tipo septicemia e choque séptico foram recentemente descritas por FRITZ (1980), assim como tem sido relatado a demonstração de complexos de alfa$_1$-antitripsina e protease, tipo elastase de granulócitos, nos plasmas de pacientes com estas doenças e nos portadores de leucemia mielóide aguda (EGBRING, 1977).

O conjunto de dados aqui apresentados podem estimular pesquisas futuras sobre a participação dos inibidores

plasmáticos de proteinase durante a Tripanosomíase Americana. Acreditamos que informações definitivas sobre os níveis e a capacidade funcional destes inibidores na Doença de Chagas surgirão da utilização de uma amostragem maior de soros de pacientes, tanto na fase aguda como na crônica da enfermidade. Por outro lado, se faz necessário o conhecimento da patologia chagásica em indivíduos geneticamente deficientes nestas proteínas, o que também poderá ser verificado experimentalmente em animais, através de medidas que induzam reduções nos níveis plasmáticos dos inibidores.

A demonstração de que a proteinase do *Trypanosoma cruzi* pode ter a sua atividade enzimática inibida por alfa$_2$-macroglobulina, alfa$_1$-antitripsina e também por antitrombina III, aparentemente restringe a participação desta enzima durante a Doença de Chagas à sítios anatômicos aos quais os inibidores não tivessem acesso. Contudo, devemos considerar o fato de que no presente trabalho investigamos apenas a interação da proteinase com os inibidores plasmáticos em pH 7.2, e desta forma não dispomos de dados sobre esta interação quando a atividade proteolítica se desenvolver em meio ácido, no qual a proteinase pode também agir (RANGEL, et alii, 1981). Também são necessárias demonstrações da presença da proteinase, de forma conclusiva, nas lesões teciduais, que não sejam relacionadas à sua presença na superfície do *Trypanosoma cruzi*, inclusive aquelas em que seja possível a verificação de complexos proteinase-inibidores plasmáticos.

Assim sendo, os resultados aqui apresentados limi-

tam uma possível ação da proteinase à uma situação local, provavelmente ao nível intracelular, não excluindo contudo a possibilidade de que, ao se romperem as células parasitadas nos sítios das reações, esta enzima possa atuar sobre células adjacentes em consequência de uma condição desfavorável para a atuação dos inibidores plasmáticos de proteinase, ou então de um desequilíbrio entre as concentrações destas proteínas e a da proteinase exposta regionalmente.

RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho procuramos obter informações sobre as proteínas responsáveis pela atividade inibitória dos soros humanos normais sobre a atividade proteolítica da proteinase do *Trypanosoma cruzi*.

Na investigação destas proteínas foram realizados testes de inibição da atividade proteinásica com amostras de soros fracionados por eletroforese em gel de agarose e por cromatografia em coluna de Sephadex G-200. Através destes testes foi demonstrado que a atividade inibitória dos soros era mediada por proteínas como mobilidade eletroforética nas regiões das alfa-globulinas,que por sua vez foram eluidas em diferentes volumes da gel-filtração do soro, indicando que possuiam diferentes pesos moleculares.

Realizando-se testes imunoquímicos com as

frações correspondentes às zonas de inibição obtidas com esta gel-filtração, através do emprêgo de antissoros monoespecíficos para inibidores plasmáticos de proteinases, foi sugerido que a alfa$_2$-macroglobulina, o inativador de $C\bar{1}$, a antitrombina III e a alfa$_1$-antitripsina poderiam participar do bloqueio da ação enzimática da proteinase do parasito. A remoção da alfa$_2$-macroglobulina das frações correspondentes à primeira zona de inibição, situada no volume de exclusão da gel-filtração do soro, através da precipitação imune desta proteína com a fração IgG de antissoro de coelho específico para este inibidor, aboliu completamente a atividade inibitória.

Utilizando-se preparações purificadas de antitrombina III e de alfa$_1$-antitripsina foi demonstrada a atividade inibitória destas proteínas sobre a ação proteinásica da enzima do *Trypanosoma cruzi*.

A avaliação da atividade inibitória dos soros procedentes de pacientes com a Doença de Chagas crônica, sobre a proteinase do *T. cruzi*, indicou uma diminuição desta atividade nas formas clínicas assintomática e cardíaca da doença, enquanto que a mesma se apresentou aumentada nos soros dos pacientes chagásicos com manifestações clínicas digestivas.

Foram dosados os níveis de alfa$_2$-macroglobulina, de antitrombina III e de alfa$_1$-antitripsina nos soros destes pacientes com a Doença de Chagas crônica, tendo sido verificado que, com exceção da diminuição dos níveis séri-

cos de alfa$_2$-macroglobulina nos indivíduos chagásicos com a forma clínica digestiva, estas proteínas apresentaram-se quantitativamente inalteradas durante esta fase da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, independentemente da forma clínica testada.

Estes resultados sobre a atividade inibitória e níveis de inibidores nos soros dos pacientes chagásicos na fase crônica sugerem uma inativação de parte destas proteínas durante esta fase da doença, assim como a presença de anticorpos com especificidade para a proteinase do *Trypanosoma cruzi*, produzidos durante a infecção, que poderiam ser capazes de bloquear a atividade proteolítica desta enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J.R. (1980). Inflammation. In: *Muir's Textbook of Pathology*. Edited by J.R. Anderson. 11th Edition. Edward Arnold Ltd., London, p. 43.

ANDRADE, Z.A. & ANDRADE, S.G. (1979). Patologia. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Ed. por Z. Brener e Z. Andrade. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p. 199.

ARAÚJO, P.M.F. (1979). Isolamento e caracterização de uma proteinase dos lisados de *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Tese de Doutoramento apresentada no Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo.

BARRETT, A.J. & STARKEY, P.M. (1973). The interaction of $alpha_2$-macroglobulin with proteinases. *J. Biochem.* 133, 709.

BAUMSTARK, J.S. (1967). Studies on the elastase-serum protein interaction. I. Molecular identity of the inhibitors in human serum and direct demonstration of inhibitor-elastase complexes by zone and immunoelectrophoresis. *Archiv. Biochem. Biophys.* *118*, 619.

BELLUCCI, S.B.B. (1979). Investigação sobre a atividade biológica de uma fração solúvel de lisados de *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Tese de Mestrado apresentada no Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo.

BENACERRAF, B. & UNANUE, E.R. (1979). The cellular basis of immunity. In: *Textbook of Immunology*. Eds. B. Benacerraf and E. R. Unanue. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, p. 76.

BERGKVIST, R. (1963). The proteolytic enzymes of *Aspergillus oryzae*. IV. On the inhibition of the enzymes by serum. *Acta Chem. Scand.* *17*, 2239.

BERNINGER, R.W. & MATHIS, R.K. (1976). Isolation and characterization of alpha$_1$-antitrypsin from *Rhesus* monkey serum. *Biochem. J.* *159*, 95.

BIDWELL, E. & VAN HEYNINGEN, W.E. (1948). The biochemistry of gas gangrene toxins. The K toxin of *Clostridium welchii*. *Biochem. J.* *42*, 140.

BONGERTZ, V. & HUNGERER, K.D. (1978). *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of a protease. *Exp. Parasit.* *45*, 8.

CAMPOS, H. (1973). Estatística experimental não-paramétrica. 2a. Ed. ESALQ - USP, Piracicaba.

CHATTAS, A.; ZAMAR, R. & MACHADO, H.H. (1958). Estudio electroforetico de las proteinas del suero en niños afectados de enfermedad de Chagas. *Rev. Med. Cordoba*, *46*, 293.

COHEN, A.B. (1973). Mechanism of action of alpha$_1$-antitrypsin. *J. Biol. Chem.* *248*, 7055.

EGBRING, R.; SCHMIDT, W.; FUCHS, G. & HAVEMANN, K. (1977). Demonstration of granulocytic proteases in plasma of patients with acute leukemia and septicemia with coagulation defects. *Blood* *49*, 219.

EISEN, H. & TALLAN, I. (1977). *Tetrahymena pyriformis* recovers from antibody *immobilisation* by producing univalent antibody fragments. *Nature* *270*, 514.

FAUVE, R.M. (1980). Inflammation and natural immunity. In: Progress in Immunology IV. Eds. Fougereau and Dausset. Academic Press, London, p. 737.

FERNANDES, J.F. & CASTELLANI, O. (1966). Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasit.* *18*, 195.

FINNEY, D.J. (1964). Statistical Method in Biological Assay. 2nd. Edited by Charles Griffin & Co Ltd.

FORBES, C.D.; PENSKY, J. & RATNOFF, O.D. (1970). Inhibition of activated Hageman factor and activated plasma

thromboplastin antecedent by purified serum $C\bar{1}$ inactivator. *J. Lab. Clin. Med. November*, 809.

FRITZ, H. (1980). Proteinase inhibitors in severe inflammatory processes (septic shock and experimental endotoxaemia): biochemical, pathophysiological and therapeutic aspects. In:"*Protein degradation in health and disease*". Ciba Foundation Symposium 75. *Excerpta Medica*, p. 351.

GOLDSTEIN, M.I. (1976). Polymorphonuclear leukocytes lysosomes and immune tissue injury. *Prog. Allergy 20*, 301.

GOMES, L.; ARAÚJO, P.M.F.; SAKURADA, J.K. & RANGEL, H.A. (1981). Degradação enzimática da IgG sérica humana pela proteinase isolada das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. In: Resumos da VIII^{a} Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambú, Minas Gerais, 9 - 11 de Novembro.

HEIMBURGER, N.; HAUPT, H. & SCHWICK, H.G. (1971). Proteinase inhibitors of human plasma. In: Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors. Eds. H. Fritz and H. Tscheche. Walter de Gruyter, New York, p. 1.

HEIMBURGER, N. (1975). Proteinase inhibitors of human plasma - Their properties and control functions. In: Proteases and Biological control. Eds. E. Reich, D.B. Rifkin and E. Shaw. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 367.

HIGSMITH, R.F. & ROSENBERG, R.D. (1974). The inhibition of human plasmin by human anthrombin - heparin cofactor. *J. Biol. Chem. 249*, 4335.

HOCHSTRASSER, K.; THEOPOLD, M. & BRANDL, O. (1973). Zur Hemmbarkeit der Proteinasen aus *Pseudomonas aeruginosa* durch α_2-Macroglobulin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 1013.

HOWARD, J.E.; MARTNER, J. & RUBIO, M. (1962). Estudio de las proteinas sanguineas en 10 niños con enfermedad de Chagas en diferentes periodos de evolucion. Comunicación preliminar. *Bol. Chile. Parasit.* 17, 36.

HUTT, M.S.R.; KÖBERLE, F. & SALFELDER, K. (1973). Leishmaniosis and Trypanosomiasis. In: Tropical Pathology. Ed. H. Spencer. Spring-Verlag Berlin, p. 380.

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

JACKSON, C.M. (1980). Blood Coagulation. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 765.

JEPPSSON, J.-O. & LAURELL, C.-B. (1975). Function and chemical composition of alpha$_1$-antitrypsin. In: Proteases and Biological Control. Eds. E. Reich, D.B. Rifkin and E. Shaw. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 405.

KABAT, E.A. & MAYER, M.M. (1968). Immunoquímica experimental. Eds. E.A. Kabat e M.M. Mayer. La Prensa Medica Mexicana, México.

KRETTLI, A.U. & EISEN, H. (1980). Fabulation in *T. cruzi*: a mechanism of escape from the host immune system. In: Resumos da VII^{a} Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença

de Chagas. Caxambú, Minas Gerais, 3 - 5 de Novembro.

KUEPPERS, F. & BEARN, A.G. (1966). A possible experimental approach to the association of hereditary α_1-antitrypsin deficiency and pulmonary emphysema. *Proc. Soc. Exp. Biol.* *121*, 1207.

LASKOWSKI, M. Jr. & KATO, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* *49*, 593.

LAURELL, G.-B. (1966). Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* *15*, 45.

LAURELL, C.-B. & JEPPSSON, J.-O. (1975). Protease Inhibitors in Plasma. In: The Plasma Proteins. Ed. W.F. Putnam. Vol. 1. Academic Press, New York, p. 229.

LEWY, L.R. & LEPOW, I.H. (1959). Assay and properties of serum inhibitor of C1 esterase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *101*, 608.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDAL, R.J. (1951). Protein measurement with the pholin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265.

MAC LENNAM, J.D. (1962). The histotoxic clostridial infection of man. *Bacteriol. Rev.* *26*, 177.

MANCINI, G.; CARBONARA, A.O. & HEREMANS, J.F. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* *2*, 235.

OUCHTERLONY, O. (1958). Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progress in Allergy* 5, 1.

PAPKE, G.; HASCHE, K.D.; BRÜCKLER, J. & BLOBEL, H. (1978). Effects of serums and plasmas of various species on a protease of *Staphylococcus aureus*. Alpha$_2$-macroglobulin as an inhibitor. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 242*, 1.

PINTO, C. & FALCÃO, P. (1958). Electroforese na doença de Chagas. *Rev. Brasil. Med. 15*, 536.

PLAUT, A.G.; GILBERT, J.V.; ARTENSTEIN, M.S. & CAPRA, J.D. (1975). *Neisseria gonorrhaeae* and *Neisseria meningitidis*: extracellular enzyme cleaves human immunoglobulin A. *Science 190*, 1103.

RANGEL, H.A.; REPKA, D.; ARAÚJO, P.M.F. & COSTA, M.G. (1977). A neutral proteinase of the epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. In: Resumos da IVª Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambú, Minas Gerais, 5 - 7 de Novembro.

RANGEL, H.A.; CAMARGO, I.B.; REPKA, D.; ARAÚJO, P.M.F.; BONFITTO, M. & ATTA, A.M. (1980). Parasite proteinase in *Trypanosoma cruzi* acute infection. In: Abstracts of the Fourth International Congres of Immunology. Paris, July 21 - 26.

RANGEL, H.A.; ARAÚJO, P.M.F.; CAMARGO, I.J.B.; BONFITTO, M. REPKA, D.; SAKURADA, J.K. & ATTA, A.M. (1981). Detection of a proteinase common to epimastigote, trypomastigote and amastigote of different strains of *Trypanosoma cruzi*.

Tropenmed. Parasit. 32, 87.

REPKA, D.; RANGEL, H.A. & COSTA, M.G. (1972). Atividade proteolítica de *Trypanosoma cruzi*. *Ciência e Cultura* 24, 296.

RIBEIRO DOS SANTOS, R. (1977). Imunopatologia da destruição neuronal na doença de Chagas experimental. Tese apresentada na Faculdade de Medicina da USP. Ribeirão Preto, São Paulo.

RINDERKNECHT, H. & GEOKAS, M.C. (1973). On the physiological role of alpha$_2$-macroglobulin. *Biochem. Biophys. Acta* 295, 233.

ROSENBERG, R.D. & DAMUS, P.S. (1973). The purification and mechanism of action of human antithrombin - heparin cofactor. *J. Biol. Chem.* 248, 6490.

RYLEY, H.C. (1979). Isolation and partial characterization of a thiol proteinase inhibitor from human plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89, 871.

SALATA, E. & RANGEL, H.A. (1980). Alterações quantitativas das proteínas séricas em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*. I. Amostras Y e Nicarágua. *Revta. Inst. Med. Trop.* 22, 231.

SASAKI, M.; YAMAMOTO, H. & IIDA, S. (1974). Interaction of human serum proteinase inhibitors with proteolytic enzymes of animal, plant, and bacterial origin. *J. Biochem.* 75, 171.

SASAKI, M.; MINAKATA, K.; YAMAMOTO, H.; NIWA, M.; KATO, T. & ITO, N. (1977). A new serum component which specifically inhibits thiol proteinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *76*, 917.

SALUM, J.; LACAZ, P.S.; BORGES, C.; RASSI, A. & REZENDE, J.M. (1959). Eletroforese das proteínas séricas na fase aguda do doença de Chagas. Comportamento evolutivo observado em 15 casos. *Rev. Goiana Med.* 5, 13.

SCHNEBLI, H.P. (1979). Adjuvant - induced inflammatory disease in the rat: plasma levels of peptide hydrolases and protease inhibitors reflect disease activity. *Agents actions* 9, 497.

SHATACHER, G.; MAAYAN, R. & FEINSTEIN, G. (1973). Proteinase inhibitors in human synovial fluid. *Biochem. Biophys. Acta.* *303*, 138.

SILVA, L.H.P. & NUSSENSWEIG, V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* *20*, 191.

SMITH, L.D. & LINDSLEY, C. (1939). Inhibition of proteinase of certain clostridia by serum. *J. Bact.* *38*, 221.

SIM, R.B.; ARLAUD, G.J. & COLOMB, M.G. (1980). Kinetics of reaction of human $C\bar{1}$-inhibitor with the human complement system proteases $C\bar{1}r$ and $C\bar{1}s$. *Biochem. Biophys. Acta* *612*, 433.

TAGER, M. & DRUMMOND, M.C. (1965). Staphylocoagulase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *128*, 92.

TEIXEIRA, A.R.L. (1979). Chagas'disease: trends in immunological research and prospects for immunoprophylaxis. *Bull. World Org.* 57, 697.

WESTROM, B.R. (1979). Identification and characterization of trypsin, chymotrypsin and elastase inhibitors in porcine serum. *Hoppe - Seylar's Z. Physiol. Chem. Bd. 360*, 1869.

WICHER, V. & DOLOVICH, J. (1973). Effects of human serum inhibitors on immunologic properties of B-subtilis alkaline proteinase. *Immunochemistry 10*, 239.