

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
UMA PROTEINASE DOS LISADOS DE
Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909)

P.M.F. de ARAÚJO

PAULO MARIA FERREIRA DE ARAÚJO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
UMA PROTEINASE DOS LISADOS DE
Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909)

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas - UNICAMP como um dos
requisitos para obtenção do grau
de Doutor em Ciências.

Orientador:

Prof. Dr. HUMBERTO DE ARAÚJO RANGEL

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Campinas - São Paulo

1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À ALBETIZA,

CECÍLIA MARIA E LIA

Aos meus pais

JOÃO ARAÚJO (em memória) e LIA

Aos meus irmãos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. HUMBERTO DE ARAÚJO RANGEL, com a minha admiração como mestre e amigo.

Aos Professores: Dra. DÁRIA REPKA, Dr. ANTONIO FERNANDO PESTANA DE CASTRO e Dr. JORGE ALMEIDA GUIMARÃES (Depto. de Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biologia - UNICAMP); Dr. MARCELLO BARCINSKI (Laboratório de Imunologia - Instituto de Biofísica - UFRJ); Dra. ADENIR PERINI e Dra. MARIA HELENA DA SILVA (Centro de Imunologia da OMS/OPS - Instituto Butantan, São Paulo); Dra. FAJGA RUCHLA MANDELBAUM (Serviço de Bioquímica - Instituto Butantan, São Paulo); Dr. ANIBAL EUGÊNIO VERCESI (Depto. de Bioquímica - Instituto de Biologia - UNICAMP), pelas críticas e sugestões ao presente trabalho, formuladas por ocasião de sua análise prévia.

Aos colegas integrantes do Depto. de Microbiologia e Imunologia, e a todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

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

- UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS;
- FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO;
- CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA;
- COORDENAÇÃO DO APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DE ENSINO SUPERIOR;
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (DIVISÃO DE IMUNOLOGIA);
- BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA;

Í N D I C E

	Pags.
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	5
RESULTADOS.....	13
1 - Determinação das Condições de Dosagem.....	13
2 - Purificação da Proteinase.....	20
2.1 - Precipitação da FS com Acetona.....	20
2.2 - Cromatografia de Exclusão em Sephadex G-200...	22
2.3 - Cromatografia de Afinidade em Sepharose-Mercu- rial.....	23
3 - Caracterização da Proteinase Purificada.....	25
3.1 - Eletroforese em Coluna de Ge ^l de Poliacrilami- da.....	25
3.2 - Imunoeletroforese Cruzada.....	25
3.3 - Determinação do Peso Molecular.....	28
DISCUSSÃO.....	33
RESUMO E CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

ABREVIATURAS

AE - Atividade específica
AFNE - Acetil-DL-fenilalanina-2-naftil ester
BAEE - Benzoil-L-arginina etil ester
BANA - Benzoil-L-arginina naftil amida
BAPNA - Benzoil-DL-arginina-p-nitro anilida
BSA - Albumina s̄rica bovina
CTN - Carbobenzoxi-L-tirosina-p-nitrofenil ester
Dext. - Azul de dextran
DFP - Diisopropil fluor-fosfato
DMSO - Dimetil sulf̄oxido
DTNB - ̄cido ditiobis-nitrobenz̄ico
DTT - Ditiotreitol
EDTA - ̄cido etilenodiamino tetrac̄tico
ESA - Albumina s̄rica equina
FS - Fraç̄o sol̄vel
HGG - Gama globulina humana
HSA - Albumina s̄rica humana
H - Cadeia pesada de IgG.Co
IgG.Co - IgG de coelho
L - Cadeia leve de IgG.Co
ME - 2-Mercaptoetanol
N-EMI - N-Etilmaleimida
p-AFMA - Para-Aminofenil mercuriacetato
p-AFMC - Para-Aminofenil mercuricloreto
SDS - Dodecil sulfato de s̄dio
TAME - Tosil-L-arginina metil ester
TCA - ̄cido tricloroac̄tico
TLCK - Tosil-L-lisina clorometil cetona
TPCK - Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
TRIS - Tris (hidroximetil) aminometano

INTRODUÇÃO

As enzimas proteolíticas desempenham importante papel em numerosos fenômenos fundamentais à vida da célula. Em estudos realizados com microorganismos, de onde derivam grande parte das informações (Holzer et al., 1975), observou-se que o "turnover" proteico está aumentado em diferentes circunstâncias tais como: na fase estacionária do crescimento, como ocorre, por exemplo, com várias espécies de Bacillus (Monro, 1961; Mandelstam & Waits, 1968; Spudick & Kornberg, 1968), na esporulação de Saccharomyces cerevisiae (Klar & Halvorsen, 1975), na diferenciação multicelular em Dictyostelium discoideum (Wright & Anderson, 1960), etc. Essas e outras observações têm comprovado que, uma das principais funções dessas enzimas proteolíticas, consiste na regulação do "turnover" proteico.

Além dessa, outras funções podem ser-lhes atribuídas. Certos mutantes de E. coli sintetizam fragmentos "nonsense" de B-galactosidase, ou produzem repressores dessa enzima estruturalmente alterados. Tanto esses fragmentos, quanto os repressores, são rapidamente degradados pelas proteases intracelulares (Goldschmidt, 1970; Platt et al., 1970). Proteínas aberrantes, sintetizadas por bactérias que sofreram ação da luz ultravioleta, são igualmente, rapidamente eliminadas (Pine, 1967). Esses e outros exemplos ressaltam o papel das enzimas proteolíticas no controle dos erros da síntese proteica.

Exemplos obtidos nos estudos com organismos superiores, indicam que a ativação ou inativação de numerosos sistemas biológicos é iniciada através da proteólise limitada. Pode-se citar entre outros: a ativação triptica do quimotripsinogênio; a conversão autocatalítica de tripsinogênio a tripsina; a conversão da proelastase a elastase; de plasminogênio a plasmina; de protrombina a trombina; de fibrinogênio a fibrina; de proinsulina a insulina; o sistema da renina-angiotensina; o sistema de conversão das cininas; o sistema complemento, etc. (Mihalyi, 1972; Reich et al., 1975).

A análise desses sistemas demonstra que essas enzimas têm um papel regulador do funcionamento de diferentes mecanismos biológicos.

Esse papel regulatório das enzimas proteolíticas sobre diferentes sistemas, reflete-se sobre eventos morfogenéticos. Em certos fungos, por exemplo, a formação da parede celular depende da ativação de uma quitina sintetase (Cabib & Farkas, 1971; Cabib & Ulane, 1973) que é ativada por ação de uma protease. Algumas vezes esta regulação se faz a nível do próprio genoma, como ocorre em células vegetativas de B. subtilis onde uma RNA-polimerase é degradada por proteases, não ocorrendo o mesmo em células esporuladas (Leighton et al., 1971; Losick et al., 1971).

Algumas das proteases que influem sobre a diferenciação celular, podem ser excretadas para o meio exterior. A esporulação do B. subtilis é dependente de uma serina-protease que é excretada (Millet, 1969). Igualmente nos casos de eucariotos dos gêneros Aspergillus (Bergkvist, 1963a, 1963b), Penicilium (Schaeffer, 1969), e Saccharomyces (Klar & Halvorson, 1975), a esporulação é dependente da elaboração de exoproteases.

A presença de exoprotease no meio ambiente onde se encontra o microorganismo, pode facilitar a sua implantação e multiplicação. Este, parece ser o caso de certas enzimas proteolíticas relacionadas com a patogenia de alguns agentes infecciosos ou parasitários. As collagenases produzidas por Clostridium histolyticum e Clostridium perfringens que lisam o colágeno de músculos, facilitam a difusão das formas de gangrena gasosa (Bidwell & Van Heyniger, 1948; Mac Lennan, 1962); as quinases produzidas por estafilococos e estreptococos, agem sobre o plasminogênio formando a plasmina, favorecendo assim o alastramento da infecção (Tager & Drummond, 1965); em vermes como no Schistosoma mansoni, uma atividade proteolítica poderia estar associada à capacidade da cercária penetrar na pele do hospedeiro definitivo (Dresden & Asch, 1972).

O conjunto de informações a respeito do papel biológico dessas enzimas, mostra que o seu estudo é fundamental para a compreensão da biologia dos microorganismos, e das suas interre-

lações com o meio ambiente. Contudo, a despeito do alerta dos peritos da Organização Mundial de Saúde (1965) para a necessidade de obtenção de informações sobre os antígenos parasitários, o que se conhece a respeito dos tripanosomatídeos, principalmente com relação a essas enzimas, é extremamente limitado. Foi isolada, a partir de lisossomos de T. brucei rhodiense, uma proteinase do tipo catepsina D, que hidrolisa a hemoglobina no pH 3.0 (Venkatesan et al., 1977). O fato dessa proteinase ter uma atividade semelhante a da catepsina D, adquire uma relevância quando sabemos que este grupo de catepsinas isolado de outras espécies animais, tem um alto potencial catalítico (Mycek, 1970), sugerindo um importante papel no metabolismo.

Atividade proteolítica em homogenatos das formas de cultivo de T. cruzi, foi primeiro descrita por Gonçalves et al., (1958). Repka et al. (1972), estudando os constituintes antigênicos das formas epimastigotas de T. cruzi, verificaram uma atividade de proteolítica nos extratos daquelas formas, capaz de hidrolisar a hemoglobina na faixa de pH entre 5.0 e 8.5. Itow & Cargano (1975), empregando principalmente substratos sintéticos, identificaram pelo menos quatro atividades proteolíticas nos extratos das formas de cultura. Posteriormente, Rangel et al. (1976, 1977), mostraram uma independência entre a atividade de proteinásica a pH 7.0 e a atividade sobre os substratos sintéticos. Recentemente, Bongertz & Hungerer (1978), descreveram o isolamento e caracterização de uma protease das formas epimastigotas, que hidrolisa o substrato BAPNA a pH 8.5, mas tem uma fraca ação sobre a caseína; e, com evidências para uma enzima SH-dependente.

Em nenhum dos trabalhos citados acima, existem referências sobre a função biológica dessas enzimas, restringindo-se as pesquisas a fase de isolamento e caracterização dessas moléculas. Justifica-se no momento, a intensificação desses estudos, visto que, o T. cruzi apresentando um ciclo vital complexo, exige constituintes proteicos para o seu crescimento e diferenciação (O'Dally, 1975, 1976). A complexidade desse ciclo vital, sugere a existência de processos adaptativos dependentes de

enzimas proteolíticas, seja na reciclagem nutricional, ou mesmo nas mudanças morfológicas e fisiológicas do parasito. Tendo em vista que, o T. cruzi penetra ativamente nas células do hospedeiro e aí se multiplica (Meyer et al., 1958; Dvorak & Hyde, 1973), é muito provável que as enzimas proteolíticas do parasito favoreçam tanto a penetração quanto a migração dentro dos tecidos. É possível também, que essas enzimas participem do processo patogênico da doença de Chagas, uma vez que, tem sido aventada a hipótese da existência de uma toxina (Köberle & Nador, 1955) ou enzima (Hutt, Köberle & Salfelder, 1973; Tafuri, 1974), que seria responsável pelo aparecimento de algumas lesões teciduais.

A proteinase das formas epimastigotas de T. cruzi, cuja existência foi assinalada anteriormente (Rangel et al., 1976, 1977), ainda não foi isolada. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de isolar e caracterizar essa enzima. Este procedimento constituirá o passo inicial às nossas perspectivas de estudo, pois, uma vez isolada e caracterizada, deverá ser investigada a correlação desta enzima com a biologia do parasito; com algum papel na relação hospedeiro-parasita; ou a sua participação na patogenia da própria doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Fração solúvel de Trypanosoma cruzi (FS) - Parasitos da linhagem Y de T. cruzi (Silva & Nussensweig, 1953) cultivados em meio de LIT (Fernandes & Castellani, 1966) durante 7 dias a 28°C, eram lavados 3 vezes com solução gelada de NaCl 0.15 M. Os parasitos lavados (90-95 % de formas epimastigotas), eram lisados em água destilada (5.6×10^7 parasitos/ml) e liofilizados. Porções de 0.5 g do material liofilizado, após delipidação com alíquotas de 50 ml de acetona (2 vezes), mistura acetona-eter (1 vez) e de eter (2 vezes), eram suspensas em 50 ml de solução gelada de NaCl 0.15 M. Essa suspensão, após ficar em repouso a 0°C durante 10 minutos, era centrifugada a 3020 g por 30 minutos, a 5°C. O sobrenadante obtido era rotulado como FS (fração solúvel) e congelado a -20°C até o uso.

Reagentes

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

Enzimas - Tripsina e α -Quimotripsina da Worthington Biochemical Co.;

Substratos sintéticos - BANA, AFNE e CTN da Sigma Chemical Co.; TAME e BAEE da Nutritional Biochemicals Co.;

Inibidores - DFP, TLCK e TPCK da Cyclo Chemical Co.; Pepstatina, Quimostatina, Antipaina, Leupeptina e Elastatinal, cedidos respectivamente pelo Dr. H. Umezawa (Tôquio-Japão) através o Dr. J. Guimarães deste laboratório;

Proteínas - Caseína do Leite (technical), Ribonuclease Bovina, e Ovalbumina (cristalizada e liofilizada) da Sigma Chemical Co.; BSA cristalizada da Pentex Biochemicals ;

Resinas - Sephadex G-200 e Sepharose 4B da Pharmacia Upsala ;

Outros reagentes - "Fast Garnet Salt", 2-Mercaptoetanol, Cisteína, Ditiotreitól, EDTA, DTNB, N-EMI, p-Aminofenil Mercuricloreto, Cloreto de Mercúrio da Sigma Chemical Co.; Iodoacetamida e Ácido Iodoacético da Merck ;

2 - Foram preparados em nosso laboratório os seguintes reagentes:

Hemoglobinas Humana e Bovina - Foram preparadas a partir de eritrócitos lavados 3 vezes com solução de NaCl 0.15 M. A papa de eritrócitos (100 ml) era dialisada contra 10 litros de água destilada, com 2 mudanças durante 12 horas. O hemolisado era então centrifugado a 12100 g por 1 hora, a 5°C, e o sobrenadante liofilizado;

Proteínas Plasmáticas: ESA - 5 vezes cristalizada, foi preparada de acordo com o método de Adair & Robinson (1930); HSA - Obtida a partir da mistura de vários soros humanos normais. A fração precipitada entre 55-65 % de saturação com sulfato de amônio, foi submetida à cromatografia em colunas de CM-celulose (0.7 meq/g) equilibradas com tampão acetato 0.05 M pH 5.0 (Pinho, 1976); IgG Humana e de Coelho - Foram isoladas de soros normais, de acordo com as instruções de Kabat & Mayer (1961). As proteínas plasmáticas preparadas em nosso laboratório, apresentavam um único sistema precipitante quando analisadas em experimentos de imunoeletroforese cruzada. Nesses testes foram usados imunossoros multiespecíficos, preparados em carneiros ou coelhos por imunização com soro total.

Outros reagentes - Tetracionato de sódio, foi preparado segundo a técnica descrita por Gilman et al. (1946); para-Aminofenil mercuriacetato (p-AFMA, P.F. 166-1679C), foi sintetizado em nosso laboratório segundo as condições descritas por Dimroth (1902); os solventes orgânicos utilizados tinham a especificação de quimicamente puros; a acetona foi redestilada a 56°C, e 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 seco, e conservado a -20°C até o uso.

Dosagem de Proteínas e Açúcares - A concentração proteica das diferentes preparações foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), ou pela medida da absorção ultravioleta a $\lambda=280$ nm em espectrofotômetro Zeiss PMQ-II, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico. A concentração de açúcares,

foi determinada pelo método do fenol-sulfúrico, segundo as indicações de Dubois (1956).

Ensaio Enzimáticos:

Atividade Proteinásica - Os ensaios de atividade proteinásica da FS e suas frações, foram realizados segundo o método de Anson (1938), com as modificações indicadas a seguir: alíquotas de 0.2 ml de enzima, diluídas em tampão fosfato 0.05 M, em pH apropriado, eram misturadas a 0.1 ml de tampão e 1.0 ml de substrato (na concentração apropriada) dissolvido no mesmo tampão. Contrôles, contendo apenas enzima ou substrato, eram feitos em paralelo. Após a incubação das misturas a 37°C por 2 horas, 1 ml de TCA a 5 % era adicionado a todos os tubos. Substrato ou enzima eram então adicionados aos tubos controle, e o branco da reação era preparado misturando-se os reagentes na seguinte ordem: 1.0 ml de TCA, 0.2 ml de enzima, 0.1 ml de tampão e 1.0 ml de substrato. As misturas eram incubadas por 15 minutos a 45°C, e centrifugadas a 1085 g por 30 minutos. A leitura espectrofotométrica dos sobrenadantes, era feita em $\lambda = 280$ nm, usando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Visto que, em nenhum caso, a leitura do controle do substrato apresentou diferença significativa do tubo branco da reação, a atividade proteolítica foi considerada como a diferença de absorvância ($\Delta A_{280\text{nm}}$) entre os tubos controle da enzima e aqueles da mistura da reação.

Os valores de Km para o sistema em estudo, foram determinados de acordo com Lineweaver & Burk (1934), empregando-se o método dos quadrados mínimos na determinação da função linear dessa constante.

Atividade sobre Substratos Sintéticos - Os testes de atividade enzimática sobre vários substratos sintéticos (TAME, BAEE, CTN, BANA e AFNE), foram realizados de forma semiquantitativa: A atividade esterásica usando-se o substrato TAME, foi testada pelo método espectrofotométrico descrito por Hummel (1959) em pH 7.0 e 8.1 com tampão fosfato ou TRIS-HCl. Concentrações padrão de tripsina foram empregadas como controle.

O ensaio enzimático usando-se o substrato BAEE, foi realizado

nas condições também descritas por Hummel (1959).

A atividade sobre o CTN foi determinada pela medida do para-nitrofenol liberado, seguindo-se as indicações de Walsh & Wilcox (1970). Concentrações padrão de α -quimotripsina foram empregadas como controle.

Os substratos cromogênicos BANA e AFNE foram empregados nos ensaios de atividade enzimática, seguindo-se as indicações fornecidas por Uriel (1971) para a detecção de hidrólise desses substratos em meio líquido ou gelificado. Como controle de positividade, utilizou-se concentrações padrão de tripsina e α -quimotripsina respectivamente. Os resultados, quando positivos, foram expressos por número de cruces, tendo-se por base uma maior ou menor intensidade da coloração resultante da reação entre os grupamentos naftil e o corante "fast garnet GBC salt".

Purificação da Proteinase - A seguinte metodologia foi empregada para a purificação da proteinase da fração solúvel (FS) de T. cruzi:

1 - Precipitação com Acetona - A FS previamente ajustada ao pH 4.5, foi fracionada pela precipitação com a mistura água-acetona, empregando-se a concentração de 80 % de acetona: 1 litro da FS mantido a 4°C era ajustado ao pH 4.5 pela adição de quantidade apropriada de solução 0.1 N de HCl. O precipitado formado era separado por centrifugação a 3020 g por 15 minutos, nesta mesma temperatura, e o sobrenadante transferido para um banho gelado a -20°C. 4 litros de acetona nesta temperatura, eram adicionados lentamente sob agitação constante. A mistura ficava em repouso a -20°C durante 18 horas, quando então era centrifugada a -15°C com 3020 g durante 15 minutos. O precipitado obtido, era suspenso em 50 ml de solução de NaCl 0.15 M e dialisado contra 5 litros de água destilada a 4°C por 18 horas, centrifugando-se em seguida para a separação do resíduo insolúvel. Esta fração, que concentrava em média 66 % da atividade proteínásica original, era liofilizada e mantida a -20°C até o momento do uso.

2 - Cromatografia de Exclusão - A FS precipitada a 80 % de acetona, foi analisada por cromatografia de exclusão em gel (Flodin, 1962), empregando-se colunas (95 X 2 cm) de Sephadex G-200, equilibradas a 4°C com tampão acetato 0.05 M, pH 5.0. Aliquotas de 5 ml, contendo 100 mg de proteínas, eram dialisadas contra 2 litros deste tampão a 4°C por 5 horas, e aplicadas na coluna. O material era eluído com este tampão, a uma velocidade de 10 ml/hora, coletando-se amostras de 2 ml. A absorvância dessas amostras, era medida a $\lambda=280$ nm de um espectrofotômetro, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. A atividade enzimática, era pesquisada individualmente em cada amostra, utilizando-se os diferentes substratos (caseína, BANA, AFNE, CTN), sobre os quais a fração inicial era ativa. Os padrões de referência azul de dextran, IgG de coelho, BSA e OVA, foram analisados em idênticas condições, empregando-se a mesma coluna antes e após o fracionamento do material enzimático. Este experimento tinha por finalidade, a determinação dos valores de exclusão para efeito de estimativa do peso molecular (Andrews, 1964; Laurent & Killander, 1964).

3 - Cromatografia de Afinidade - Sepharose 4B foi ativada pelo tratamento com CNBr (Cuatrecasas & Anfinsen, 1971), e ligada covalentemente ao composto mercurial orgânico p-AFMA (para aminofenil mercuriacetato), seguindo-se as instruções fornecidas por Sluyterman & Wijdenes (1970). A sepharose-mercurial resultante, foi empacotada em coluna e lavada com tampão fosfato 0.05 M pH 8.0, e a seguir com uma solução 2.5 mM de DTNB neste mesmo tampão, até que o eluato tivesse a mesma cor amarela da solução inicial. A resina foi outra vez lavada com tampão fosfato até obtenção de um eluato incolor, e a seguir, equilibrada com tampão acetato 0.05 M pH 5.0. Uma solução 2.5 mM de HgCl_2 no mesmo tampão, foi passada na resina fracamente amarelada, até que se tornasse descorada. Para estimar a capacidade da coluna, uma aliquota do efluente foi misturada com uma solução 0.1 M de cisteína a pH 8.5, e a absorvância foi lida a $\lambda=412$ nm. Tomando-se como referência, o coeficiente de extinção molar ($E_{M,412}^{1 \text{ cm}}$) de 13600 para o DTNB, a resina foi capaz

de adsorver 1.1 mMoles de DTNB em cada ml da matriz.

A fração que continha a proteinase em estudo, obtida da filtração em sephadex G-200, foi então, submetida ao sepharose-mercurial: aliquotas de 50 ml desta fração (0.3 mg proteína/ml), eram dialisadas durante 12 horas a 4°C, contra 2 litros de tampão 0.05 M pH 5.0, 10 mM sulfito de sódio, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA e 10 % DMSO. Após a diálise, era aplicada em uma coluna (5 X 1 cm) da sepharose-mercurial previamente equilibrada com este tampão. A eluição do material proteico não adsorvido, era acompanhada com este tampão, a um fluxo de 20 ml/hora, coletando-se amostras de 1 ml, até que a leitura do eluente feita a $\lambda=280$ nm caía a zero. A resina era então lavada com o tampão acetato sem EDTA e sulfito de sódio, fazendo-se a seguir, a eluição do material adsorvido, com o mesmo tampão contendo 15 mM de 2-mercaptoetanol. O material eluído, era dialisado contra água destilada a 4°C, e simultaneamente concentrado sob pressão (Guimarães, 1972), usando-se tubo Visking (Scientific Inst. Centre, limited, London). A preparação assim obtida, era em seguida mantida a -20°C, até o momento do uso.

Caracterização da Proteinase - Os experimentos indicados a seguir, foram empregados na caracterização da proteinase da fração solúvel (FS) de T. cruzi:

1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - Colunas de gel de poliacrilamida (7.5 %), eram preparadas com tampão TRIS- HCL 0.05 M pH 7.5, e processadas de acordo com as instruções de Fairbanks et al. (1971). Amostras eram aplicadas às colunas, e submetidas à eletroforese (3 mA/coluna durante 2 horas) em tampão TRIS-Glicina 0.005 M pH 7.5, até que a marcação de pironina atingisse 1 cm da base catódica. Cada amostra foi analisada em duplicata. - Após a separação eletroforética, os geis eram retirados das colunas, e submetidos ao seguinte tratamento: um gel era corado para proteínas com azul brilhante de "coomassie" seguindo-se as instruções do autor referido; o outro gel era mergulhado numa solução de substrato (0.15 % de caseína em tampão fosfato 0.05 M pH 7.0, 5 mM EDTA e 15 mM de 2-mercaptoetanol) durante 2 horas a 37°C. Após esse tempo, o

gel era suspenso por uma agulha, e mantido pendurado em câmara úmida a 37°C durante 4 horas, quando era finalmente fixado e corado para proteínas. Este experimento tinha por finalidade, a localização da atividade proteínásica no gel.

2 - Imunoeletroforese Cruzada - Placas (12 X 9 X 0.15 cm) de gel de agarose a 1 % em tampão veronal 0.05 M pH 8.6, contendo a(s) amostra(s) para análise(s), eram submetidas à diferença de potencial de 6 volts/cm durante 1 hora na primeira dimensão, e 2 volts/cm durante 18 horas na segunda dimensão, à temperatura de 4°C. Antes da eletroforese na segunda dimensão, uma faixa central da placa de gel, era retirada, e este espaço preenchido com a mistura de agarose e o imunessoro, na proporção de 10 %. A detecção da atividade caseinolítica nessas placas, após a imunoeletroforese cruzada, era realizada segundo as indicações descritas por Uriel (1960), nas mesmas condições citadas acima para a análise em gel de poliacrilamida. Antes do ensaio enzimático, as placas eram prensadas, e lavadas 3 vezes (15 minutos cada) com solução 0.15 M de NaCl. As placas destinadas apenas à coloração proteica dos sistemas precipitantes, após a lavagem com a solução 0.15 M de NaCl, eram secas a 37°C e coradas como usualmente.

Imunessoros - Os imunessoros empregados nesses testes, contendo anticorpos precipitantes anti-FS ou suas frações isoladas, foram obtidos de 2 grupos de coelhos imunizados com uma dose (0.2 mg proteína) dos antígenos, misturados em partes iguais de adjuvante completo de Freund (1965). O volume de 1 ml da referida dose, foi inoculado por via intramuscular em cada coelho do 1º grupo; a mesma dose foi inoculada em cada coelho do 2º grupo por via intradérmica, em vários pontos de aplicação no dorso.

3 - Determinação do Peso Molecular - Estimativa do peso molecular da proteinase, foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (5.6 %), contendo SDS (1 %), segundo as instruções de Fairbanks et al. (1971). ESA (69.000 daltons); IgG monomérica de coelho (150.000 daltons) e suas cadeias, H (55.000

daltons) e L (25.000 daltons); e Ribonuclease bovina (13.700 daltons), foram empregados como padrões de referência. Experimentos em paralelo, para a localização da atividade caseinólíca no gel, foram realizados com a fração contendo a proteína-se que, foi submetida, ou não, a uma redução prévia pelo reagente ditiotreitol.

RESULTADOS

1 - Determinação das Condições de Dosagem

A investigação da atividade proteínásica da FS em diferentes pH, indicou a existência de um pico de atividade numa zona neutra (pH 6.8 ± 0.5), concordando com observações anteriores (Costa, 1977).

Diferentes proteínas foram então submetidas à ação da FS, utilizando-se tampão fosfato 0.05 M pH 7.0, a 37°C durante 2 horas. Nessas condições de experimentação, como demonstrado na tabela 1, o maior grau de hidrólise, expresso pela quantidade de produtos TCA-solúveis absorvida a $\lambda=280$ nm, foi obtido usando-se a caseína do leite ou hemoglobina bovina como substrato.

Tabela 1 - Atividade proteolítica ($\Delta A_{280 \text{ nm}}$) da FS sobre diferentes substratos proteicos.

Substrato	Concentração (mg/ml)	FS (mg proteína/ml)			
		0.80	0.40	0.20	0.10
Caseína do Leite	20	1.07	0.49	0.16	0.07
Hemoglobina Bovina	40	0.81	0.48	0.34	0.22
Albumina Bovina	30	0.15	0.08	0.03	0.02
Albumina Humana	30	0.12	0.07	0.04	0.02
Albumina Equina	30	0.08	0.02	0.00	0.00

Diferentes concentrações de caseína, foram então, ensaiadas com a FS. Nos resultados desse experimento (tabela 2), pode ser observado, que, concentrações de caseína superiores a 10

mg/ml inibiam a atividade enzimática da FS, enquanto, concentrações de 5 mg/ml forneciam resultados aparentemente próximos da velocidade máxima da reação.

Tabela 2 - Influência da concentração de caseína sobre a atividade proteolítica da FS (0.5 mg proteína/ml).

Caseína (mg proteína/ml)	ΔA 280 nm
1.0	0.40
5.0	1.05
10.0	1.01
20.0	0.65
40.0	0.42

Os dados relativos à cinética da reação, empregando-se tanto a caseína (figura 1) quanto a hemoglobina, indicaram que, a quantidade máxima de produtos TCA-solúveis, era praticamente alcançada, após 90 minutos à temperatura entre 37°C e 45°C.

Uma estimativa do Km foi feita, empregando-se a equação de Lineweaver & Burk (1934) na média dos resultados devidamente transformados, da atividade proteolítica de FS sobre diferentes concentrações de caseína. Foi estimado desse modo o valor do Km em 2.5 mg de caseína (figura 2). Para a hemoglobina, esse valor foi da ordem de 12.2 mg.

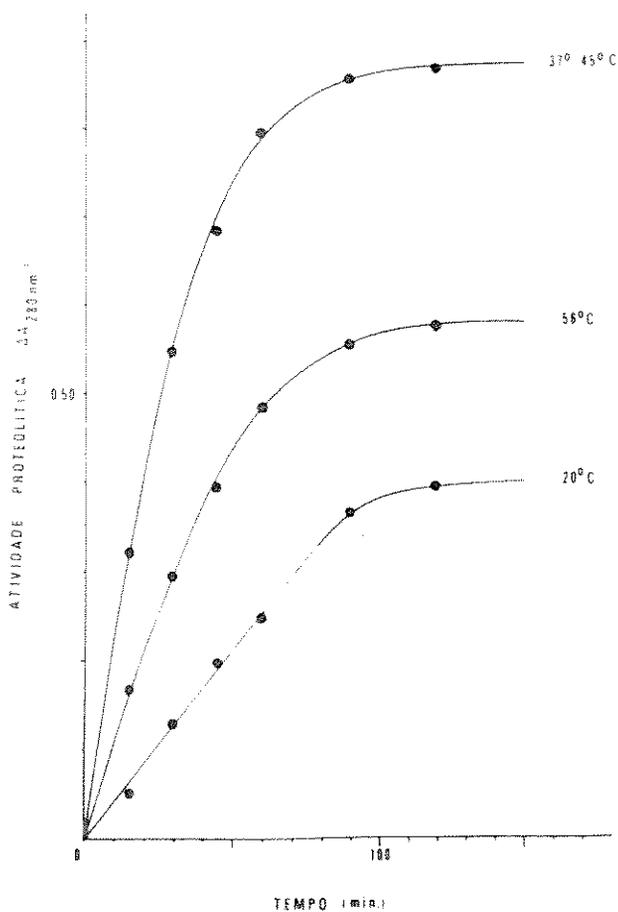


Figura 1 - Influência do tempo e da temperatura sôbre a atividade proteolítica da FS(0.5 mg proteína/ml). Substrato: caseína (6 mg/ml).

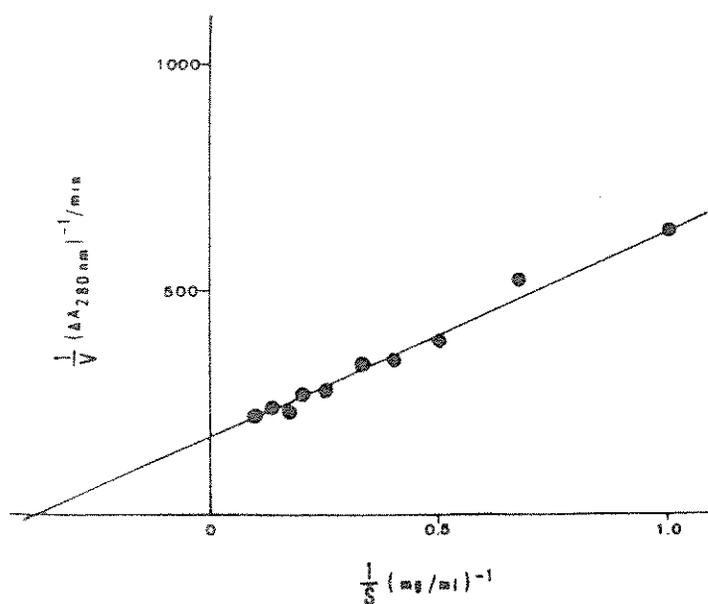


Figura 2 - Traçado Lineweaver & Burk da velocidade da reação ($\Delta A_{280 \text{ nm}}$) com diferentes concentrações de caseína ($\frac{1}{S}$). Ensaio realizado em tampão fosfato 0.05 M pH 7.0, 2 horas a 37°C.

A influência do pH na estabilidade da atividade proteínásica da FS, foi analisada, incubando-se previamente a FS (0.5 mg proteína/ml) em diferentes pH, a temperatura de 37°C durante 2 horas. Ao final deste período, as diferentes preparações foram ajustadas ao pH 7.0, e a atividade proteínásica foi determinada sobre a caseína (6 mg/ml). Foi observado o máximo de estabilidade, quando a FS era submetida à incubação no pH 5.0. Nos outros pH testados (3.0, 7.0 e 8.5), havia uma perda da atividade enzimática, superior a 30 % em relação àquela inicial.

Efetores da Atividade Proteínásica da FS

A influência de ativadores e inibidores sobre a atividade proteínásica da FS foi investigada, preincubando-se a FS (100 ug proteína/ml, tampão fosfato 0.05 M pH7.0) com cada um dos compostos, nas concentrações finais indicadas (tabela 3), durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida a atividade proteolítica das misturas foi testada.

Os resultados apresentados na tabela 3, indicam que houve um aumento pronunciado da atividade proteínásica da FS na presença de EDTA, ou de compostos sulfidrílicos (2-mercaptoetanol, cisteína); e que houve inibição total, na presença de compostos afins para grupamentos tiois (Hg^{2+} , p-AFMA, p-AFMC, N-EMI, tetratoato de sódio, iodoacetamida, ácido iodoacético). Pode-se verificar ademais, que os íons metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} e Pb^{2+}); os inibidores de atividade esterásica e a pepstatina, não tiveram ação aparente.

A reversibilidade da ação inibitória dos reagentes de grupamentos tiois foi investigada, incubando-se a FS com os diferentes inibidores nas concentrações de ação, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as diferentes preparações foram submetidas à ação proteínásica sobre caseína ou hemoglobina na presença de 2-mercaptoetanol (15 mM).

Como demonstrado na tabela 4, a ação inibitória dos diferentes efetores, com exceção do ácido iodoacético, foi revertida em presença do composto sulfidrílico 2-mercaptoetanol. Idêntica reversibilidade era observada, com o uso da cisteína.

A atividade relativa, expressa nas tabelas 3 e 4, acha-se representada pela relação entre o valor de $\Delta A_{280 \text{ nm}}$ resultante da ação de uma determinada quantidade de enzima, dosada na presença do efetor, e o valor de $\Delta A_{280 \text{ nm}}$ resultante da ação dessa mesma quantidade de enzima, dosada na ausência do efetor.

Tabela 3 - Efeito de ativadores e inibidores sobre a atividade proteínica da FS.

Efetor	Conc. final (mM)	Atividade Relativa
Nenhum	-	1.0
Ca ²⁺	1	1.0
Mg ²⁺	1	1.0
Pb ²⁺	1	1.0
EDTA	0.2	1.6
	1	2.4
	5	3.0
2-Mercaptoetanol	1	2.3
	5	3.0
	10	3.0
	20	3.0
	50	3.0
Cisteína	15	3.0
Hg ²⁺	1	0.0
p-Aminofenil-HgCl	1	0.0
p-Aminofenil-CH ₃ COO-Hg	1	0.0
N-Etilmaleimida	1	0.0
Tetracionato de Sódio	1	0.8
	10	0.2
Iodoacetamida	1	0.2
Ácido Iodoacético	1	0.0
DFP	1	1.0
TPCK	1	1.0
TLCK	1	1.0
Pepstatina	0.2	1.0
	1	1.0
	5	1.0

Tabela 4 - Efeito do 2-Mercaptoetanol (ME) sobre a inibição enzimática da FS, conferida pelos inibidores de grupamentos sulfidrílicos.

Efetor	Conc. final (mM)	Atividade Relativa	
		Normal	+ ME, 15mM
Nenhum	-	1.0	3.0
Hg ²⁺	1	0.0	1.5
p-Aminofenil-Hg-Cl	1	0.0	3.0
p-Aminofenil-CH ₃ COO-Hg	1	0.0	3.0
N-Etilmaleimida	1	0.0	3.0
Tetracionato de Sódio	10	0.2	3.0
Iodoacetamida	1	0.2	2.5
Ácido iodoacético	1	0.0	0.0

Uma relação linear foi observada entre a atividade proteolítica ($\Delta A_{280 \text{ nm}}$) e variadas concentrações da FS (figura 3), quando foram utilizadas as seguintes condições: caseína (6 mg/ml) dissolvida em tampão fosfato 0.05 M pH 7.0, 5 mM de EDTA e 15 mM de ME, incubação a 37°C durante 2 horas. A unidade proteolítica foi então definida, como a absorvância dos produtos TCA-solúveis, equivalente a 0.001 $A_{280 \text{ nm}}$ unidades / minuto a 37°C, pH 7.0.

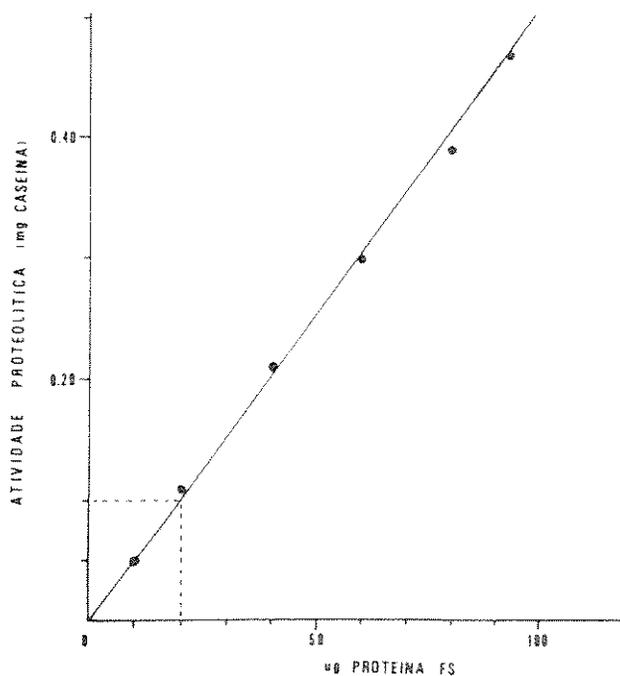


Figura 3 - Relação entre diferentes concentrações da FS, e a atividade hidrolítica sobre a caseína.

Ação da FS sobre Substratos Sintéticos

Vários substratos sintéticos foram submetidos à ação da FS. Entre estes, alguns substratos cromogênicos (BANA, CTN, AFNE), e outros não cromogênicos (TAME, BAEE).

Os principais resultados obtidos desses experimentos, indicaram que a FS era capaz de hidrolisar BANA, AFNE e CTN, mas não hidrolisava TAME ou BAEE.

A influência de diferentes inibidores (concentração final de 1 mM) sobre a capacidade da FS hidrolisar BANA, AFNE e CTN, foi investigada.

Como demonstrado na tabela 5, a atividade da FS sobre esses substratos sintéticos, foi inibida pelos reagentes DFP, TPCK, ou TLCK; nenhuma inibição, entretanto, foi verificada com o reagente iodoacetamida. Estes resultados, sugerem a existência de pelo menos duas atividades enzimáticas distintas.

Tabela 5 - Atividade da FS sobre diferentes substratos, em presença de vários inibidores.

Inibidor	Ação sobre:				
	BANA	AFNE	CTN	Caseína	Hemoglobina
Iodoacetamida	+	+	+	-	-
DFP	-	-	-	+	+
TPCK	-	-	-	+	+
TLCK	-	-	-	+	+

2 - Purificação da Proteinase

2.1 - Precipitação da FS com Acetona

Ajuste ao pH 4.5 - Foi observada a formação de um precipitado, quando a FS era ajustada ao pH 4.5. Este precipitado foi separado do sobrenadante, redissolvido parcialmente em solução de NaCl 0.15 M (descartando-se o resíduo insolúvel) e ajustado ao pH 7.0. A atividade proteínásica sôbre a caseína, tanto do precipitado, quanto do sobrenadante (prêviamente ajustado ao pH 7.0), foi determinada nas condições padronizadas.

Os resultados obtidos, indicaram que, 84 % da atividade proteínásica inicial da FS permanecia no sobrenadante (40 U/mg de proteína), enquanto apenas 10 % estava contida no precipitado (30 U/mg de proteína).

O teor de açúcares dosado no precipitado (parte solúvel), representou cerca de 10 % do total da FS. Outros contaminantes foram afastados da FS com o presente tratamento, visto que a maior parte desse precipitado, permaneceu insolúvel.

O abaixamento a pH 4.5 foi então, considerado como um passo importante para a purificação da enzima.

Precipitação com Acetona a -20°C - Utilizando-se o sobrenadante da FS a pH 4.5, diferentes concentrações de acetona (20, 33, 50, 66 e 80 %) a -20°C, foram adicionadas, e os precipitados resultantes, foram separados e analisados.

Os dados obtidos das diferentes frações, indicaram que a concentração de 80 % era a mais adequada, visto que, a proteinase era purificada 5 vezes (200 U/mg de proteína), com um grau de recuperação de 65 %. Nas outras concentrações de acetona havia um fracionamento da proteinase, com resultados bem inferiores.

Diferentes partidas da FS, foram então purificadas pela precipitação com 80 % de acetona a -20°C, seguindo-se os passos indicados abaixo. A fração resultante deste processo, foi denominada de FS-p.

Purificação da FS com 80 % de Acetona a -20°C:

- FS
↓
- 1) Ajuste a pH 4.5; centrifugação a 3020 g, a 4°C, 30 minutos.
↓
 - 2) Adição de 4 volumes de acetona a -20°C ao sobrenadante; repouso por 18 horas a -20°C; centrifugação a -15°C e 3020 g 30 minutos.
↓
 - 3) O precipitado obtido é suspenso em 0.05 volumes de solução de NaCl 0.15 M a 4°C; diálise contra 2 litros de água distilada a 4°C durante 1 noite; centrifugação a 4°C e 3020 g durante 30 minutos; o sobrenadante obtido é a FS-p.

A FS purificada por este método (FS-p), apresentou as mesmas propriedades enzimáticas do material inicial: FS-p testada a pH 7.0 em tampão fosfato 0.05 M, foi capaz de hidrolisar caseína, hemoglobinas humana ou bovina, BANA, AFNE, e CTN.

Os mesmos efetores foram capazes de ativarem ou inibirem a atividade proteínica.

A ação hidrolítica sobre os substratos sintéticos, foi inibida pelos reagentes DFP, TPCK e TLCK, nas concentrações de 1 mM, não sendo alterada entretanto, pela ação dos inibidores de grupos amino, que bloqueavam normalmente a atividade proteínica.

2.2 - Cromatografia de Exclusão em Sephadex G-200

A cromatografia da FS-p em colunas de Sephadex G-200 prèviamente calibradas com diferentes padrões moleculares (OVA, ESA, HGG e Dextran blue), permitiu o isolamento de 5 frações distintas, obtidas como indicado na figura 4.

A fração F1, correspondente ao volume de eluição do Dextran blue, não apresentou atividade enzimática.

A fração F2, com um volume de eluição pròximo ao da HGG, apresentou forte atividade sôbre BANA e baixa atividade proteínasica.

A fração F3, com um volume de eluição pròximo ao da ESA, contém a maior parte da atividade proteínasica. Esta fração não hidrolisou BANA, mas foi ativa sôbre AFNE.

As frações F4 e F5, foram desprovidas de ação hidrolítica sôbre BANA, AFNE ou caseína.

Pode-se ainda verificar naquela figura, que o pico de atividade de proteínasica, e os picos de atividade sôbre BANA e AFNE são distintos entre si. O pico de BANA está mais pròximo da HGG, o da caseína pròximo da ESA, e o de AFNE pròximo da OVA.

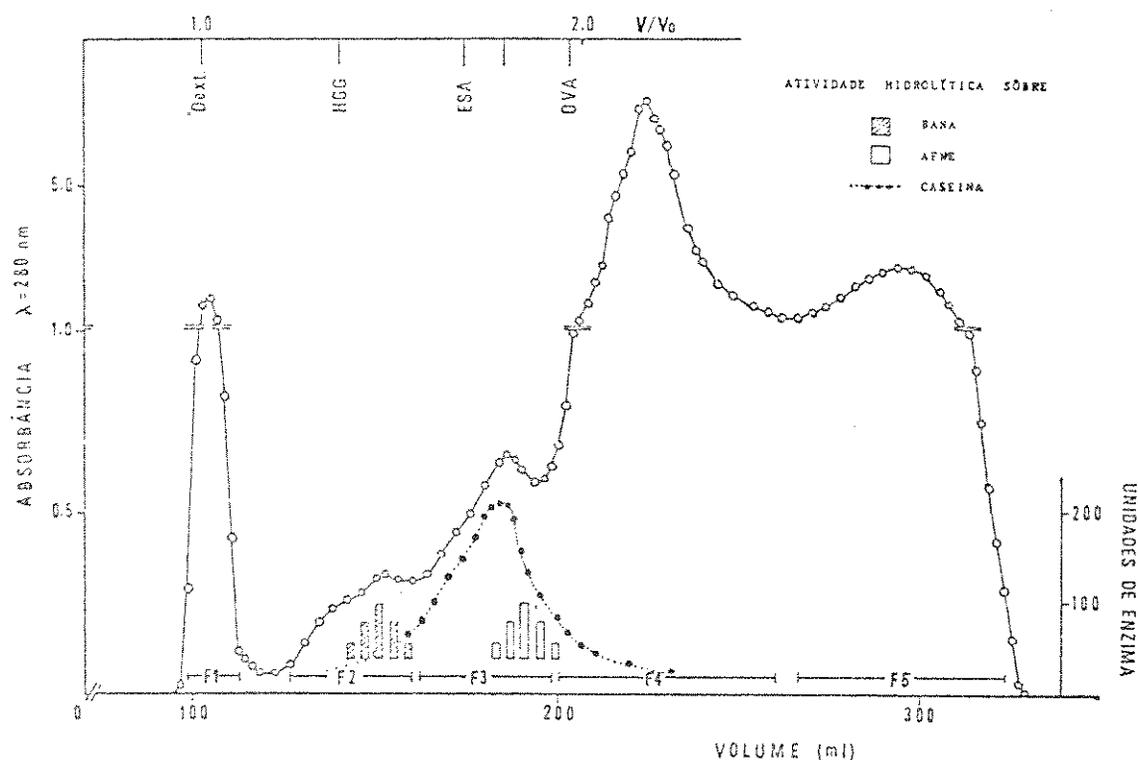


Figura 4 - Cromatografia em Sephadex G-200 da FS-p.

2.3 - Cromatografia de Afinidade em Sepharose-Mercurial

A fração F3 obtida da filtração em Sephadex G-200, que continha a maior parte da atividade proteínásica, foi submetida à cromatografia de afinidade, empregando-se Sepharose 4B ligada covalentemente com p-AFMA. 2 frações foram obtidas nessas condições, tal como indicado na figura 5.

A fração F3-1, que contém a maior parte das proteínas iniciais, apresenta uma baixa atividade proteínásica sobre a caseína, e tem ação hidrolítica sobre o AFNE.

A fração F3-2, com um baixo teor proteico, tem uma alta atividade sobre a caseína, e nenhuma ação sobre o AFNE ou BANA.

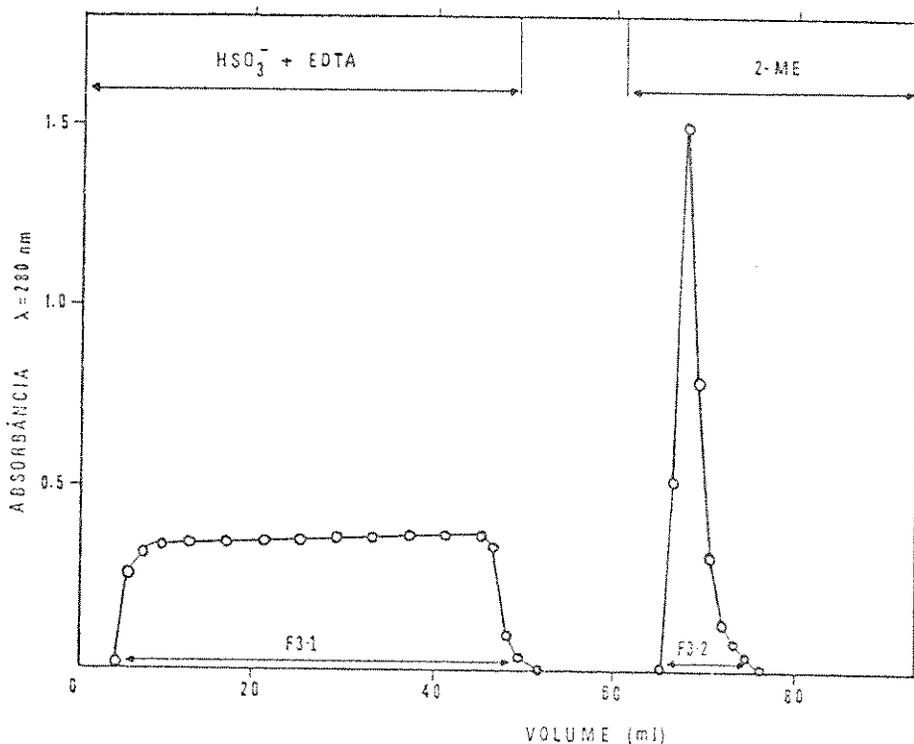


Figura 5 - Cromatografia de afinidade em Sepharose-Mercurial. Alíquota de 50 ml de F3 (0.3 mg/ml), analisada em uma coluna de resina 5 X 1 cm, à temperatura ambiente. O limite das setas, indica a eluição resultante da influência dos compostos referidos no tampão padrão.

Em vista dos resultados anteriormente obtidos, diferentes partidas de 1000 ml da FS, fôram submetidas às etapas de purificação indicadas na tabela 6, onde estão sumariados alguns dos valores médios resultantes. Pode-se observar, que a proteinase foi purificada cerca de 60 vezes, com um grau de recuperação de 16 % .

Tabela 6 - Purificação da Proteinase

Os resultados indicados, representam a média dos valores obtidos a partir de 8.0 gramas de parasitos delipidados e liofilizados. A atividade específica foi determinada com a caseína (6.0 mg/ml em tampão fosfato 0.05 M pH 7.0, 5 mM EDTA e 15 mM de ME), a 37°C durante 2 horas. 1 unidade = 0.100 $A_{280 \text{ nm}}$.

Fração	Proteína (mg/ml)	Volume (ml)	U.Totais	AE (U/mg)	Recuperação (%)	Purificação (vêzes)
FS inicial	0.75	1000	30.000	40	100	1
FS, pH 4.5 (sobrenad.)	0.63	1050	25.200	38	84	0.95
FS-p	2.00	50	20.000	200	66	5
F3	0.30	50	12.000	800	40	20
F3-2	0.10	20	4.800	2.400	16	60

3 - Caracterização da Proteinase Purificada

3-1 - Eletroforese em Coluna de Gel de Poliacrilamida -

Como demonstrado na figura 6, uma única banda foi detectada quando a F3-2 foi analisada por eletroforese em coluna de gel de poliacrilamida. Este componente revelado, possui uma atividade proteinásica quando testada "in situ" com a caseína. A FS inicial analisada nessas mesmas condições, não apresentou grande diferença em relação à F3-2, sugerindo a concentração do material proteico, em volta à uma única banda.

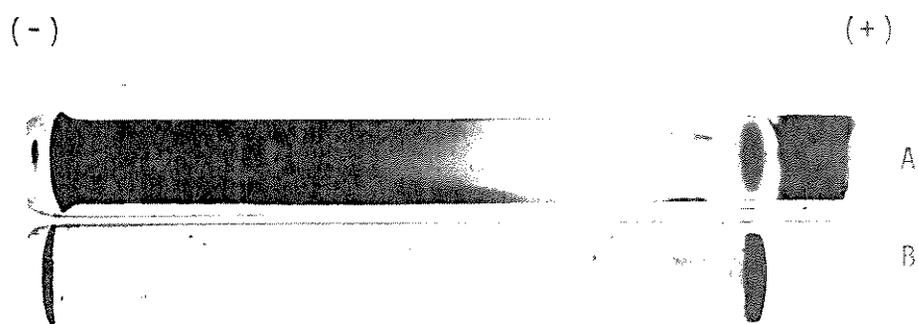


Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da F3-2 (100 μ l=50 μ g de proteína=120 unidades).

- A) Localização da atividade caseinolítica da F3-2
- B) F3-2 submetida à coloração de proteínas

3.2 - Imunoeletroforese Cruzada

A análise das frações obtidas nas diferentes etapas de purificação, por imunoeletroforese cruzada empregando-se o imunossoro anti-FS, mostrou (figura 7), que na fração F3-2, 3 sistemas precipitantes são detectados, sendo o maior deles, o correspondente à proteinase. As frações das outras etapas continham vários sistemas precipitantes, embora todas elas detectassem apenas uma atividade proteinásica.

Da imunização de coelhos com a F3-2, obteve-se um imunossoro, que testado frente à FS e F3-2, detectou pelo menos 4 sistemas precipitantes, sendo um deles, o mais intenso, representado pela proteinase (figura 8).

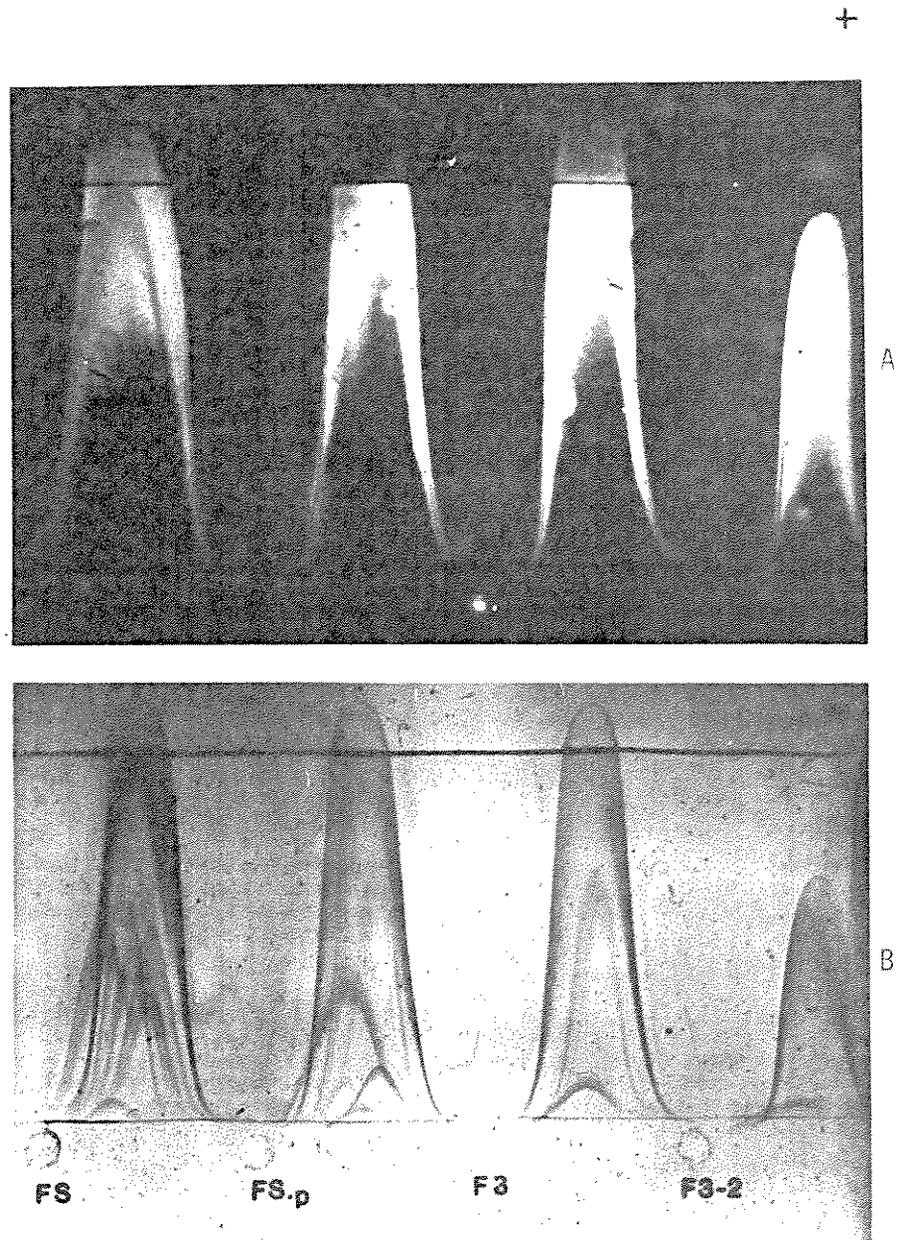


Figura 7 - Imunoeletroforese de frações da FS em diferentes etapas de purificação (FS=0.6 mg/ml; FS-p=0.6 mg/ml; F3=0.3 mg/ml; F3-2=0.1 mg/ml), frente ao imunossoro anti-FS (concentração de 10 %).
A) Localização da atividade caseinolítica.
B) Coloração para proteínas

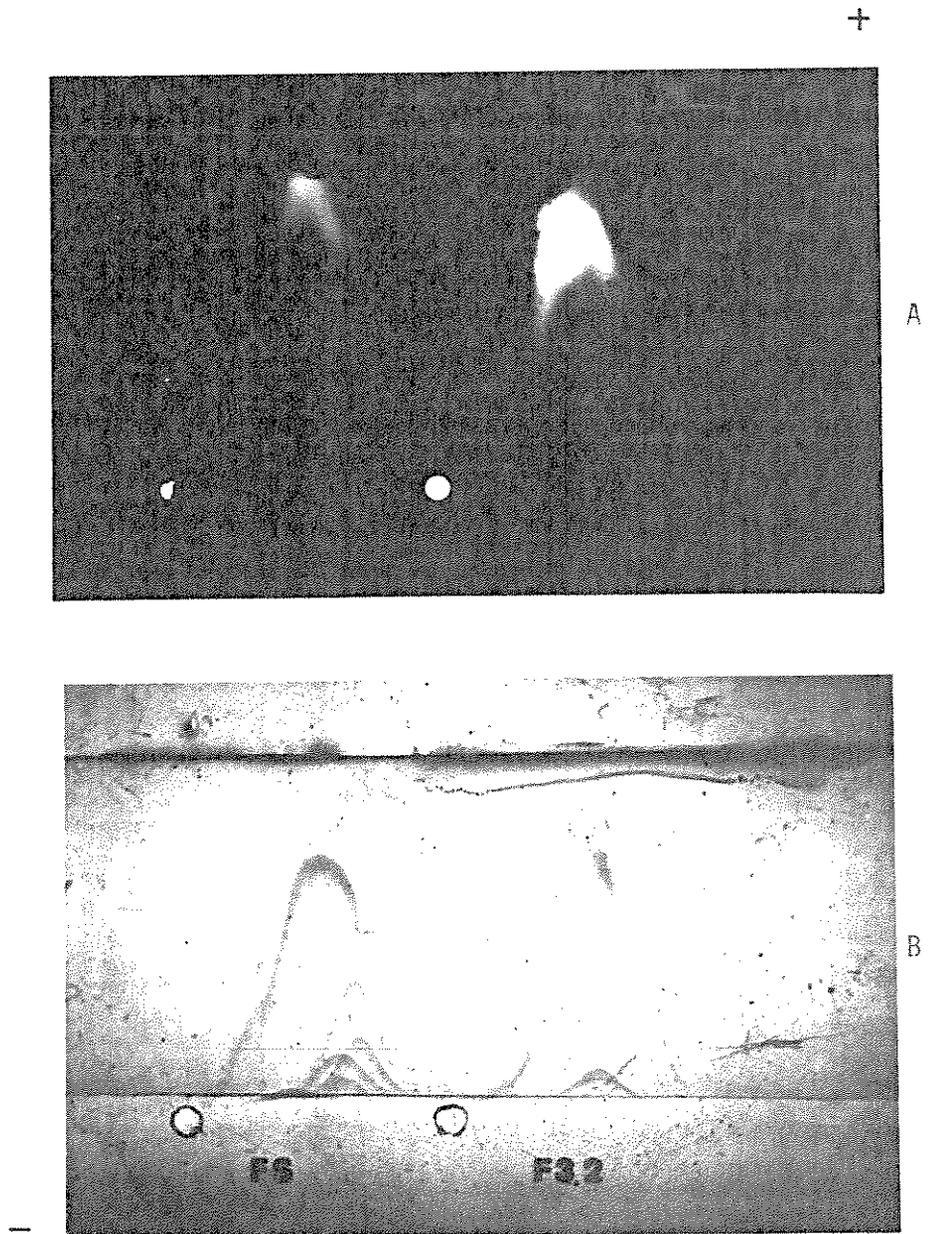


Figura 8 - Imunoeletroforese cruzada comparativa entre FS (0.6 mg/ml) e F3-2 (0.3 mg/ml) frente ao imunessoro anti-F3-2 (concentração de 10 %).

A) Localização da atividade caseinolítica

B) Coloração para proteínas

3.3 - Determinação do Peso Molecular

Estimativas do peso molecular da proteinase (F3-2), foram feitas com base nos seguintes dados:

- 1º) O volume de exclusão em Sephadex G-200, permitiu uma estimativa de 60.000 daltons para a proteinase, como demonstrado no gráfico da figura 9;
- 2º) Na eletroforese em colunas de gel de poliacrilamida contendo SDS 1 %, foram detectadas 2 bandas: uma delas com migração correspondente a 55.000 daltons, coincidente com aquela da cadeia H de IgG-Co, tomada como marcador; e a outra, com migração correspondente de 6.000 daltons, figura 10.

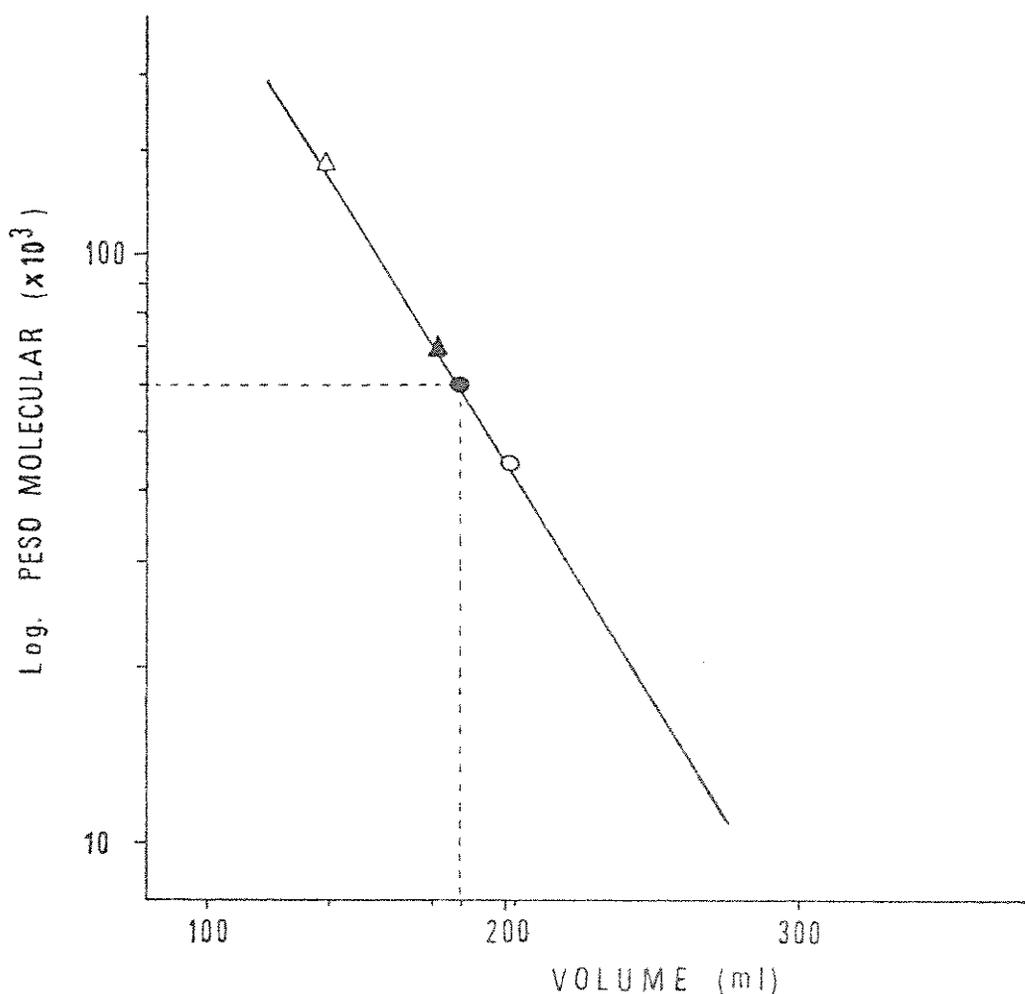


Figura 9 - Estimativa do peso molecular da proteinase (F3-2) , em coluna de Sephadex G-200. (○) OVA; (▲) ESA; (Δ) IgG-Co; (●) Proteinase.

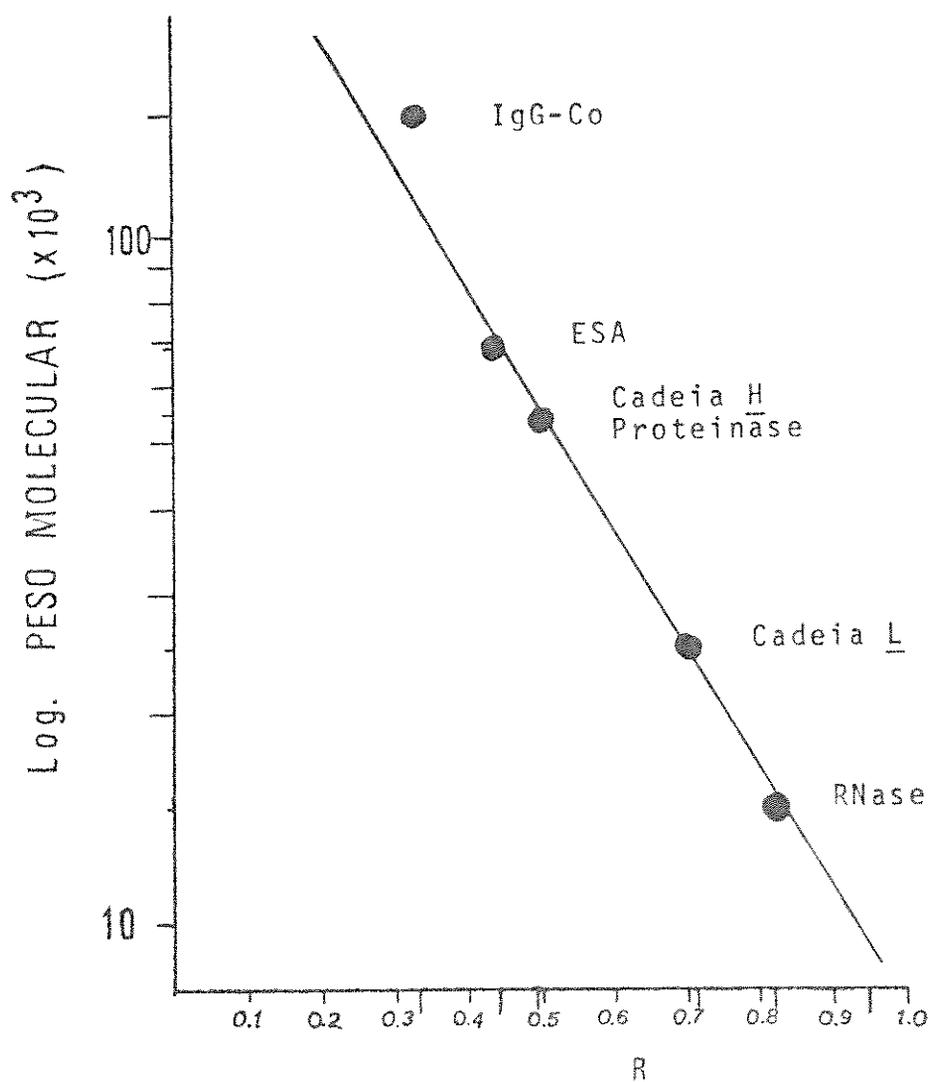


Figura 10 - Determinação do peso molecular da proteinase (F3-2) por eletroforese em coluna de gel de poliácridamida contendo SDS 1 %. Representação gráfica da relação entre a mobilidade relativa e o logaritmo do peso molecular das diferentes moléculas analisadas. (Concentrações proteicas=0.5 mg/ml)

Com a finalidade de verificar, se o aparecimento do componente de ≈ 6.000 daltons era dependente da ação redutora do reagente DTT (ditiotreitól), foram realizados experimentos, em que este redutor foi omitido ou incluído à proteinase, antes do procedimento da eletroforese em coluna de gel de poliacrilamida contendo SDS 1 %.

Os resultados obtidos (figura 11), indicaram que, na ausência de DTT, quase não se observa a presença desse componente de 6.000 daltons; e, que sob ação prolongada do DTT, praticamente desaparece o componente de 55.000 daltons.

Em complementação a esses dados, os testes de detecção enzimática, mostraram que, apenas o componente de 55.000 daltons, apresenta atividade proteínásica; e que, sob ação prolongada do DTT, essa atividade acha-se diminuída.

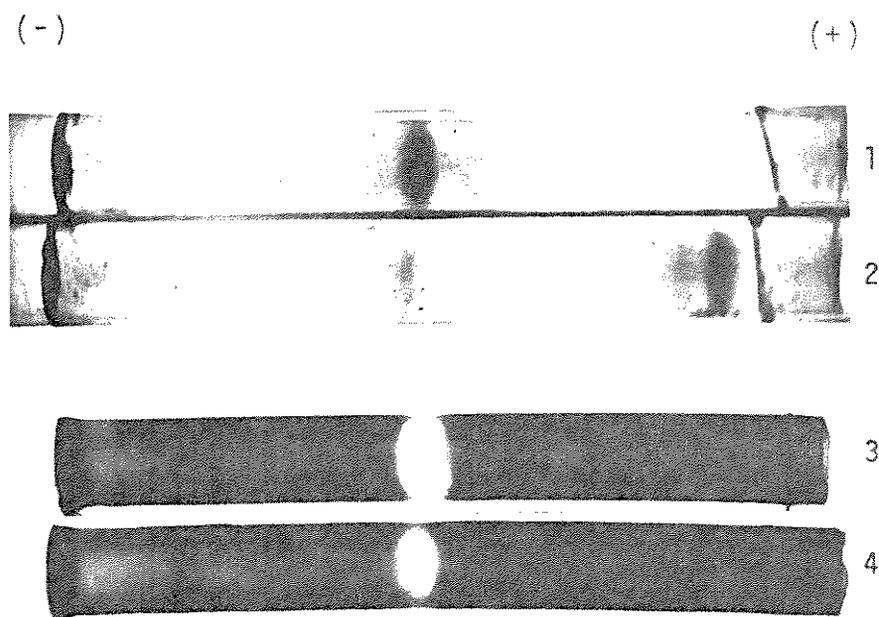


Figura 11 - Influência do DTT no aparecimento do componente de baixo peso molecular da proteinase. (Concentração proteica da F3-2=0.5 mg/ml; AE=2400 U/mg).

- 1) F3-2 antes da ação do DTT
- 2) F3-2 após incubação com 0.1 M de DTT, por 30 minutos a 37°C.
- 3 e 4) Localização da atividade caseinolítica, antes e após a ação do DTT.

Os seguintes experimentos foram realizados, com a finalidade de se verificar o paralelismo da atividade proteínásica entre a FS, e a fração F3-2:

Influência do pH - A FS e F3-2 foram submetidas à dosagem enzimática em diferentes pH, nas condições padronizadas, empregando-se a caseína (6 mg/ml) ou hemoglobina bovina (40 mg/ml) como substratos.

Nos resultados obtidos com a F3-2 (proteínase purificada), como demonstrado na figura 12, o ótimo de pH para a atividade proteínásica estava compreendido na faixa de 6.6 ± 0.5 , quando a caseína foi utilizada como substrato.

No entanto, quando a hemoglobina foi utilizada como substrato, o ótimo de atividade proteínásica estava situado ao redor do pH 3.0.

Os dados obtidos com a FS, foram concordantes com os resultados anteriores (Costa, 1977).

Influência de Ativadores e Inibidores - Resultados similares para aqueles apresentados nas tabelas 3 e 4, foram obtidos quando o efeito de ativadores e inibidores foi investigado sobre a enzima purificada, indicando um paralelismo com aquela atividade SH-dependente, detectada na FS inicial, e nas frações dos diversos estágios de purificação.

Nos testes com inibidores específicos (Pepstatina, Leupeptina, Quimostatina, Elastatinal e Antipaina), observou-se inibição parcial apenas quando foram utilizadas concentrações relativamente altas de Quimostatina, Leupeptina e Antipaina, respectivamente.

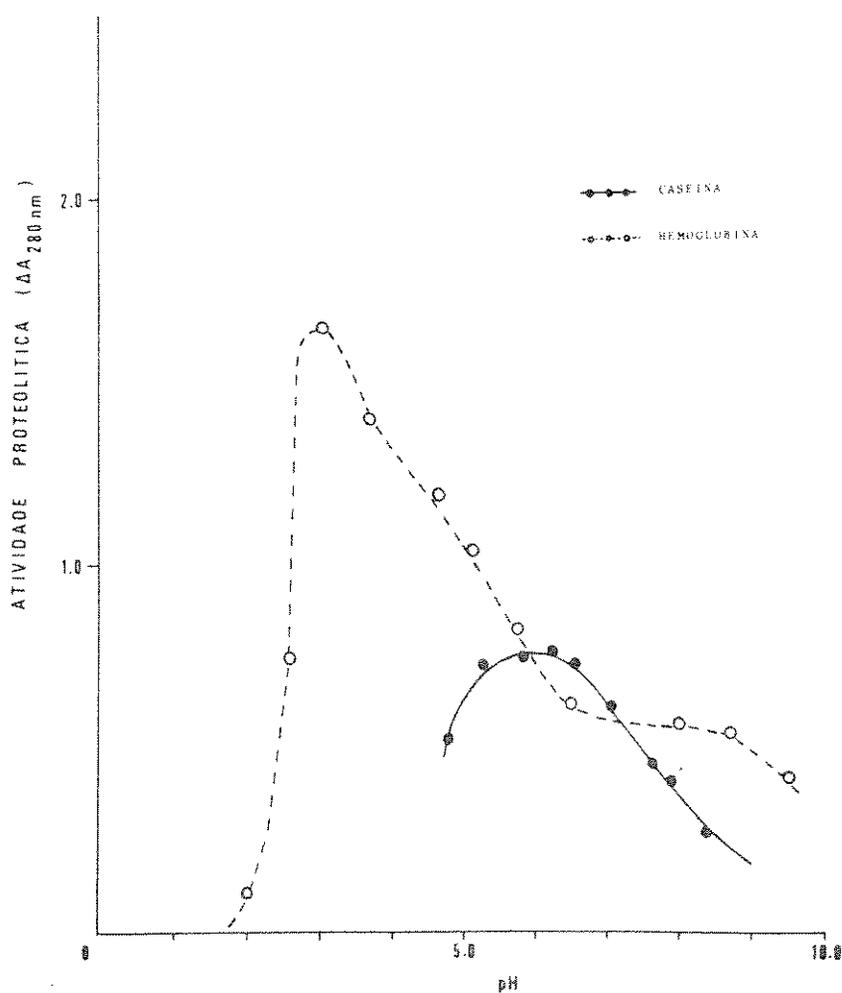


Figura 12 - Atividade proteolítica da enzima purificada (0.2 mg proteína/ml, 0.2 ml=96 U) testada em vários pH, com caseína (6.0 mg/ml) em tampão fosfato 0.05 M , ou hemoglobina bovina (40 mg/ml) em tampão citrato-fosfato 0.05 M. As soluções de substratos continham 5 mM EDTA e 15 mM ME; e, antes da adição da enzima, quando necessário, foram ajustadas ao pH requerido, pela adição de quantidades apropriadas de HCl 0.1 N ou NaOH 0.1 N.

DISCUSSÃO

Empregando-se o método de Anson (1938) para a dosagem de enzimas proteolíticas, diferentes proteínas foram submetidas à ação da FS na faixa neutra de pH (6.8 ± 0.5), obtendo-se assim um maior grau de hidrólise com a caseína ou com as hemoglobinas humana e bovina. A baixa atividade detectada sobre as albuminas humana, bovina e equina, não exclui a possibilidade de que várias ligações peptídicas tenham sido quebradas sem no entanto ter havido liberação de peptídios solúveis ao TCA, devido ao grande número de pontes dissulfeto presentes naquelas moléculas.

Os nossos experimentos foram então realizados, usando-se principalmente a caseína como substrato.

Os dados cinéticos dessa atividade no extrato bruto, mostraram que se obtinha maior quantidade de produtos TCA-solúveis, após 90 minutos de incubação a temperaturas entre 37°C e 45°C, sendo que após este período, não havia alteração apreciável na quantidade desses produtos.

Uma estimativa do K_m , foi feita nessas condições, encontrando-se um valor de $K_m=2.5$ mg para a caseína.

A concentração de 6 mg/ml de caseína, foi empregada nas diferentes determinações da atividade proteínica. Concentrações de caseína superiores a 10 mg/ml, inibiam essa atividade enzimática; provavelmente, impurezas da preparação de caseína, estariam concentradas a partir desse teor proteico.

Os resultados dos testes de ativadores e inibidores enzimáticos, sobre a atividade caseinolítica da FS, indicaram um envolvimento de grupamentos sulfidrílicos na atividade caseinolítica da FS, visto que, essa atividade era aumentada em presença de compostos sulfidrílicos (ME, cisteína), ou era inibida por reagentes de grupamentos tiois (Hg^{2+} , p-AFMA, p-AFMC, N-EMI, iodoacetamida, ácido iodoacético, tetracionado de sódio, etc.). Ademais, quando as preparações contendo os inibidores de grupamentos tiois, foram ensaiados em presença de ME, observou-se uma reversibilidade da ação enzimática em praticamente todos os bloqueios dados por aqueles inibidores de SH.

Exceção foi feita, ao bloqueio resultante do tratamento com ácido iodoacético, onde ocorreu muito provavelmente, uma ligação covalente, típica de uma reação de carboximetilação com o grupamento SH (Means & Feeney, 1971). Com a iodoacetamida, idêntica reação deveria ter ocorrido, porém, é possível que a concentração empregada, e as condições de ensaio, não tenham favorecido o bloqueio irreversível pela carboximetilação; é considerável também, que o composto iodoacetamida é menos específico, podendo reagir com radicais de outra natureza química.

- Esses dados sugerem que a proteinase em estudo, seja uma enzima SH-dependente. O fato de ter sido isolada a partir de colunas de Sepharose-Mercurial, que reage preferencialmente com grupos SH do sítio ativo da enzima (Sluyterman & Wijdenes, 1970), vem reforçar esta hipótese.

Os íons metálicos (Pb^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}) não tiveram ação aparente sobre a atividade proteínásica da FS. No entanto, a adição de concentrações crescentes de EDTA, aumentou essa atividade, sendo provável que algum outro íon ou radical interferente, esteja presente como contaminante do substrato.

A enzima em estudo não é uma esterase, já que os inibidores de esterase (DFP, TPCK, TLCK) não foram ativos, o que difere da protease isolada por Bongertz & Hungerer (1978) que hidroliza o substrato BAPNA a pH 8.5, e essa ação é inibida por aqueles reagentes de esterase. O fato de não ser inibida pela pepstatina, sugere que não seja uma enzima dos tipos pepsina ou catepsina D.

Os resultados dos testes com substratos sintéticos, confirmaram as informações preliminares de Rangel et al (1976, 1977), sobre a independência entre as atividades enzimáticas frente a alguns substratos sintéticos, e aquela atividade proteínásica sobre caseína, hemoglobina bovina, etc. Por outro lado, as atividades enzimáticas descritas por Itow & Camargo (1975), reforçam esses dados com substratos sintéticos, não encontrando entretanto, dados comparativos sobre uma atividade, que foi dosada com azo-caseína numa faixa ácida de pH, sem no entanto, ser demonstrado o ótimo de pH.

Em conjunto, os dados obtidos no presente trabalho, com a FS

não purificada, e os dados da literatura, sugerem a existência de pelo menos 3 proteases ativas a pH neutro: uma proteinase, provavelmente SH-dependente; uma protease do tipo tripsina e uma outra do tipo quimotripsina. Os dados relativos à purificação, são compatíveis com essa hipótese.

- A precipitação de proteínas com solventes apolares (Cohn, 1959), embora constitua um método trabalhoso, vem sendo utilizado com certa frequência, uma vez que apresenta entre outras vantagens, a concentração do material proteico, e um certo grau de purificação. No caso presente, este método permitiu a eliminação de alguns constituintes da FS, que não tinham ação proteínásica (açúcares, ácidos nucleicos, nucleases, glicoproteínas, etc.). Esses componentes glico-proteicos dificultavam os testes cromatográficos e eletroforéticos, realizados com o extrato bruto, em vista da tendência de se agregarem, (Repka, dados não publicados).

A gel filtração do material previamente purificado, mostrou que as atividades sobre BANA, AFNE e Caseína, tinham diferentes volumes de eluição, indicando deste modo 3 proteases distintas com pesos moleculares estimados em: 140.000 daltons (atividade BANA); 60.000 daltons (atividade caseína); e 55.000 daltons (atividade AFNE), respectivamente.

A separação das atividades sobre a caseína e sobre o AFNE, pôde ser realizada, através da cromatografia de afinidade, com o Sepharose-Mercurial que reagiu especificamente com radicais SH da proteinase. Nessas condições, a enzima que hidrolisava o AFNE, passou livremente; e a proteinase que ficou adsorvida, pôde ser eluída pela competição de compostos sulfidrílicos adicionados ao tampão.

- A proteinase isolada, foi considerada como uma preparação homogênea, por vários critérios: Apenas uma única banda de proteína foi detectada, quando a enzima purificada (5 mg proteína/ml) foi analisada por eletroforese em coluna de gel de poliacrilamida (Fairbanks et al, 1971). Considerando-se que, nessas condições de análise, podem ser detectadas concentrações proteicas inferiores a 50 µg/ml,

na concentração empregada, deve existir menos que 10 % de algum contaminante com mobilidade eletroforética diferente.

A análise por imunoelektroforese cruzada, frente a um soro anti-FS, demonstrou a presença de 1 sistema precipitante principal forte, que tinha atividade proteínásica sobre a caseína, e mais dois sistemas precipitantes que não apresentavam atividade proteínásica, sugerindo assim, que as preparações purificadas ainda contêm alguns contaminantes antigênicos. Como a imunoelektroforese cruzada é um método extremamente sensível, podendo detectar contaminantes antigênicos em concentrações baixíssimas (1 ug/ml), a depender da potência dos anticorpos contra esses contaminantes (Axelsen et al., 1973), a detecção dessas impurezas na proteinase, contrapõe os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida, onde não apareceu contaminantes.

Confirmando o fato de que a preparação não está imunoquimicamente purificada, a imunização de coelhos com este material, induziu a produção de anticorpos contra 4 constituintes antigênicos, sendo que apenas um deles, apresentava atividade caseinolítica.

As estimativas de peso molecular, quer por filtração em Sephadex G-200, ou por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, indicaram um peso molecular aparente de 55.000 - 60.000 daltons para a proteinase (F3-2).

Nos experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, um componente de baixo peso molecular foi observado, representando muito provavelmente, a fragmentação da molécula da proteinase por auto-digestão em presença de redutor, uma vez que, este componente só era detectado, após a ação prolongada do DTT.

O fato da proteinase isolada ter apresentado ótimos de atividade em pH diferentes quando os substratos utilizados eram a caseína ou hemoglobina, pode sugerir a hipótese da existência nas preparações purificadas, de 2 enzimas proteolíticas distintas. Entretanto, essa hipótese não encontrou apoio

nas experiências de eletroforese em gel de poliacrilamida, cromatografia em Sephadex, eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e imunoeletroforese cruzada, quando apenas uma única proteinase pôde ser detectada. Ademais, os testes com os diferentes efetores, mostraram que, a ação de ativadores e inibidores sobre a preparação indicada, afetam igualmente a proteólise da caseína e da hemoglobina. O paralelismo dessa atividade foi evidenciado nos diferentes testes comparativos entre FS e a proteinase isolada.

Tendo em vista estes fatos, é mais plausível admitir, que a diversidade do ótimo de pH para a caseína e para a hemoglobina se deva à influência desses substratos no favorecimento da interação enzima-substrato.

Deve-se notar que a caseína se desnatura em pH abaixo de 5.0, tornando-se insolúvel; e esta insolubilidade, constitui um fator limitante para a ação enzimática. Por outro lado, a protonação da hemoglobina, poderia favorecer o aparecimento de novas cargas na molécula, aumentando a susceptibilidade à catálise, ou favorecendo a combinação enzima-substrato.

Como ocorre por exemplo com a pepsina, parece que as enzimas digestivas preferem substratos proteicos desnaturados (Christensen, 1965), não ocorrendo provavelmente o mesmo, com outras proteases mais específicas, onde a conformação molecular é um requerimento fundamental para a catálise (Haberman, 1970).

Exemplos semelhantes de diversidade no ótimo de pH, tem sido observado com a pepsina agindo sobre diferentes substratos: como a ovalbumina (Tahin et al., 1969); ou no caso de cininogênios isolados (Guimarães, 1978), etc.

A comparação entre a proteinase descrita no presente trabalho, e outras enzimas dos extratos de T. cruzi referidas na literatura, indicam que a proteinase isolada não apresenta qualquer relação com aquelas anteriormente descritas. Difere da protease isolada por Bongertz & Hungerer (1978) em peso molecular e na atividade sobre substratos sintéticos: e difere daquelas assinaladas por Itow & Camargo (1975), uma vez que, nenhuma das descritas, apresentava atividade proteinási-

ca. É descrita uma atividade sôbre a azocaseína, onde não foi definido o ótimo de pH, nem mencionada a influência de ativadores e inibidores.

Entre os tripanosomatídeos, foi assinalada uma enzima de T. brucei rhodiense, que é ativa em pH 3.0 sôbre a hemoglobina, e foi considerada do tipo catepsina D (Venkatesan et al, 1977). Embora, não existam dados de inibição com a penstatina, não apresentam elementos que possam ser comparados com a presente.

Em vista da complexidade do ciclo vital do T. cruzi, não podemos excluir a possibilidade de, que a atividade enzimática de proteinases como esta, seja alterada, acompanhando suas modificações morfológicas e funcionais. No momento ainda não dispomos de qualquer informação concreta, a respeito do seu papel biológico. A sua detecção nas formas tripomastigotas, e o seu efeito sôbre a pele e músculo liso de cobaias, já vem sendo investigados.

Uma vez isolada a proteinase, a nossa perspectiva de trabalho se vincula à investigação desse papel biológico, seja correlacionando com a biologia do parasito; com a relação parasito-hospedeiro; ou com a patogenia da doença de Chagas.

RESUMO E CONCLUSÕES

A fração solúvel (FS) de lisados das formas epimastigotas de T. cruzi, contendo diferentes atividades proteolíticas em pH neutro, foi analisada por diferentes métodos, visando-se o isolamento e caracterização de uma proteinase.

Empregando-se o método de Anson (1938), as condições de dosagem da atividade proteinásica da FS foram determinadas, usando-se a caseína como substrato, em tampão fosfato 0.05 M pH 7.0. A maior quantidade de produtos TCA-solúveis era obtida, quando a mistura enzima-substrato era incubada a temperaturas entre 37°C e 45°C, por 90 minutos; não se observando alterações apreciáveis na quantidade de produtos após esse período. Uma estimativa do Km foi feita nessas condições, encontrando-se um valor de 2.5 mg da caseína.

Essa atividade proteinásica da FS, era maior em presença de EDTA e dos compostos sulfidrílicos ME e cisteína. Inibição total dessa atividade era obtida, em presença de concentrações 1 mM dos reagentes de grupamentos tiois (Hg^{2+} , iodoacetamida, ácido iodoacético, N-EMI, p-AFMA, p-AFMC), havendo reversibilidade desse efeito inibitório, com a adição de 15 mM de ME, exceção feita àquele, resultante do ácido iodoacético. Esses dados sugeriam que a proteinase era do tipo SH-dependente.

- A proteinase foi purificada 60 vezes, empregando-se a seguinte metodologia: 1) Precipitação a pH 4.5 com 80 % de acetona a -20°C; 2) Cromatografia de exclusão em Sephadex G-200; 3) Cromatografia de afinidade em Sepharose 4B, ligado covalentemente ao composto p-AFMA.

A fração obtida da precipitação com 80 % de acetona a -20°C (FS-p), concentrou 2/3 da atividade proteinásica da FS inicial, purificando-a cerca de 5 vezes. Ainda estavam presentes, 2 outras atividades proteolíticas, responsáveis pela hidrólise dos substratos BANA e AFNE.

A filtração da FS-p em Sephadex G-200, permitiu a identificação de pelo menos 3 atividades distintas, tendo como base os respectivos volumes de exclusão: F2=atividade sobre o BANA,

p.m. \approx 140.000 daltons; F3=atividade sôbre AFME, p.m. \approx 55.000 daltons, e, atividade proteinásica, p.m. \approx 60.000 daltons. A cromatografia de F3 em Sepharose-Mercurial, resultou na separação da atividade proteinásica daquela sôbre o AFME: F3-1=atividade sôbre AFME, e F3-2=atividade proteinásica.

- A proteinase purificada, apresentou apenas uma banda de proteína, quando analisada por eletroforese em coluna de gel de poliacrilamida, sendo detectada em posição idêntica, a sua ação caseinolítica. A análise por imunoeletroforese cruzada frente ao imunossoro anti-F3, resultou no aparecimento de pelo menos 3 sistemas precipitantes, sendo um principal mais forte, relacionado com a atividade proteinásica. Imunoeletroforese cruzada, frente ao imunossoro anti-F3.2, confirmou os dados anteriores referentes à impureza imunológica da proteinase isolada, aparecendo 4 sistemas precipitantes, sendo apenas um deles, o principal, relacionado com a ação enzimática em estudo.

Eletroforese em coluna de gel de poliacrilamida contendo SDS permitiu a detecção de 2 componentes: um deles de \approx 55.000 daltons, associado à atividade caseinolítica; e o outro, \approx 6.000 daltons, sem esta propriedade, que aparecia em decorrência da ação prolongada do DTT.

- A enzima purificada, mostra atividade a pH 6.0, quando testada com a caseína. Quando testada com a hemoglobina bovina, embora tenha-se observado uma apreciável digestão à pH 6.6, o ótimo de atividade se situava em torno do pH 3.0. As proteólises, tanto da caseína, quanto da hemoglobina bovina a pH 6.0; ou da hemoglobina bovina em pH 3.0, foram igualmente inibidas ou ativadas pelos mesmos efetores, sugerindo uma única enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adair, G.S and Robinson, M.E. - The specific refraction increments of serum albumin and serum globulin. Biochem. J. 24:993, 1930.
- Andrews, P. - Estimation of molecular weights of proteins by sephadex gel filtration. Biochem. J., 91: 222, 1964.
- Anson, M.L. - The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol., 22: 79, 1938.
- Axelsen, N.H.; Kröll, J. and Weeke, B. - A manual of quantitative immunoelectrophoresis. Methods and Applications. Eddited by Universitesforlaget, Oslo, Bergin-Tromso, 1973.
- Bergkvist, R. - The proteolytic enzymes of Aspergillus oryzae. I- Methods for the estimation and isolation of the proteolytic enzymes. Acta. Chem. Scand., 17: 1521-1540, .1963.
- _____ - The proteolytic enzymes of Aspergillus oryzae. II- Properties of the proteolytic enzymes. Acta. Chem. Scand., 17: 1541-1551, .1963.
- Bidwell, E. and Van Heyningen, W.E. - The biochemistry of gas gangrene toxins. The K toxin of Clostridium welchii. Biochem. J., 42: 140-151, 1948.
- Bongertz, V. and Hungerer, K.D. - Trypanosoma cruzi: Isolation and characterization of a protease. Exp. Parasitol., 45:8, 1978.
- Cabib, E. and Farkas, V. - The control of morphogenesis : an enzymatic mechanism for the iniciation of septum formation in yeast. Proc. Nat. Acad. Sci., 68: 2052-2056, .1971.
- _____ Ulane, R. - Chitin synthetase activating factor from yeast, a protease. Biochem. Biophys., Res. Commun., 50: 186- 191, .1972.
- Christensen, L.K. - Concerning the pH optimum of peptic hydrolysis. Arch. Biochem. Biophys., 57: 163, 1965.
- Cohn, S. - A simple method for the concentration of fluids containing proteins. Nature, 183: 1055, 1959.

- Costa, M.G. - Atividade proteín̄sica dos lisados de T. cruzi (Chagas, 1909). Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo 1977.
- Cuatrecasas, P. and Anfinsen, C.B. - Affinity chromatography. In: Methods in Enzymology (Perlmann, G.E. and Lorand, L. eds.), 22: 345-378, 1971.
- Dimroth, O. - Weber die mercurirung aromatischer verbindungen. Ber., 35: 2032- 2045, 1902.
- Dresden, M.H. and Asch, H.L. - Proteolytic enzymes in extracts of Schistosoma mansoni cercariae. Biochim. Biophys. Acta, 289: 378- 384, 1972.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. and Smith, F. - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28: 350-356, 1956.
- Dvorak, J.A. and Hyde, T.P. - Trypanosoma cruzi: interation with vertebrate cells in vitro. I- Individual interations at the cellular and subcellular levels. Exp. Parasitology, 34: 268-283, 1973.
- Fairbanks, G.; Steck, T.E. and Wallach, D.F.H. - Electro - foretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry, 10 (13): 2606-2617, 1971.
- Fernandes, J.F. and Castellani, O. - Growth characteristics and chemical composition of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasitology, 18: 195- 202, 1966.
- Flodin, P. - Dextran gels and their applications in gel filtration. Pharmacia Uppsala, Sweden, 85 p, 1962.
- Freund, J. - The mode of action of immunologic adjuvants. Adv. Tuber. Res., 7: 130, 1965.
- Gilman, A.; Phillips, S.P.; Kaelle, E.S.; Allen, R.P. and St. John, E. - Metabolic reduction and nephrotoxic action of tetrathionate in relation to a possible interaction with sulfhydryl compounds. Amer. J. Physiol., 147: 115, 1946.
- Goldschmidt, R. - In vivo degradation of nonsense fragments in E. coli. Nature, 228: 1151-1154, 1970.

Gonçalves, N.B.; Carmo, E.S. and Tavares, B.M. - "6th International Congresses on Tropical Medicine and Malaria", Instituto de Medicina Tropical, Lisboa, 1958.

Guimarães, J.A. - Enzima cinino conversora do soro humano : preparação e propriedades. Tese Escola Paulista de Medicina (Doutor), São Paulo, 1972.

_____ - Cininogênios do plasma humano: caracterização, preparação e propriedades funcionais. Tese Universidade Federal Fluminense (Titular), Rio de Janeiro, 1978.

Habermann, E. - Kininogens. In: Bradykinin, Kallidin and Kallikrein, Handbook of Experimental Pharmacology, (Erdos, E. G. ed.), 25: 250, Springer Verlag, New York, 1970.

Holzer, H.; Betz, H. and Ebner, E. - Intracellular proteinases in microorganisms. In: Current Topics in Cellular Regulation, (Horecker, B.L. and Stadtman, E.R., eds.), Academic Press, New York, 9: 103-156, 1975.

Hummel, B.C.W. - A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin and thrombin. Can. J. Biochem. Physiol., 37: 1393. 1959.

Hutt, M.S.R.; Köberle, F. and Salfelder, K. - Leishmaniasis and Trypanosomiasis. In: Spencer, H., ed., Tropical Pathology New York, Springer-Verlag, 12: 352-398, 1973.

Itow, S. and Camargo, E. P. - Proteolytic activities in cell extracts of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool., Utica, 24 (4): 591-595, 1977.

Kabat, E.A. and Mayer, M.M. - Experimental Immunochemistry, 2nd. ed., Charles C. Thomas, Springfield, Ill., USA, 1961.

Klar, A.J.S. and Halvorson, H.D. Proteinase activities of *Saccharomyces cerevisiae* during sporulation. J. Bacteriol., 124: 863-869, 1975.

Köberle, F. & Nador, E. - Etiologia e patologia do megasofago no Brasil. Rev. Paul. Med., 47: 643-661, 1955.

Laurent, T.C. and Killander, J. - A teory of gel filtration and its experimental verification. J. Chromatog., 14: 317, 1964.

- Leighton, T.J.; Freese, P.K. and Doi, R.H. - The requirement for serine protease function during Bacillus subtilis sporulation. Fed. Proc., 30: 1069, 1971.
- Lineweaver, H. and Burk, D. - The determination of the enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc., 56: 658-666, 1934.
- Losick, R.; Shorenstein, R.G. and Sonenshein, A.L.-Structural alteration of RNA polymerase during sporulation. Nature, London, 227: 910, 1971.
- Lowry, D.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J.-Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
- Mac Lennan, J.D. - The histotoxic clostridial infection of man. Bacteriol. Rev., 26: 177-274, 1962.
- Mandelstam, J. and Waits, W.M. - Sporulation in Bacillus subtilis - The role of the exoproteases. Biochem. J., 109: 793-901, 1968.
- Means, G.E. and Feeney, R.E. - Chemical Modification of Proteins. Copyright by Holden-Day, Inc., California, USA, 1971.
- Mihalyi, E. - Application of proteolytic enzymes to protein structure studies. (Weast, R.C., ed.), C.R.C. Press, ps. 179-226, 1972.
- Meyer, H.; Mussacchio, M.O. and Mendonça, I.A. - Electron microscopic study of Trypanosoma cruzi in thin sections of infected tissue culture and blood agar forms. Parasitology, 48: 1-8, 1958.
- Millet, J. - Caractérisation de deux endopeptidases excrétées pour Bacillus subtilis marburg au cours de la sporulation. J. Bull. Soc. Chim. Biol., 51: 457-469, 1969.
- Monro, R.E. - Protein turnover and the formation of protein inclusion during sporulation of Bacillus thuringiensis. Biochem. J., 81: 225-232, 1961.
- Mycek, M.J. - Cathepsins. In: Methods in Enzymology (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds.), New York, Academic Press, 19: 285-315, 1970.

- O'Dally, J. - A new liquid medium for *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool., 22 (2): 265-270, 1975.
- O'Dally, J. - Effect of fetal calf serum fractions and proteins on division and transformation of *Trypanosoma cruzi* in vitro. J. Protozool., 23 (4): 577-583, 1976.
- Pine, M.J. - Response of intracellular proteolysis to alteration of bacterial protein and the implications in metabolic regulation. J. Bacteriol., 93: 1527-1533, 1967.
- Pinho, R.T. - Purificação de albumina humana por cromatografia de troca iônica para estudos imunológicos. Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1977.
- Platt, R.; Miller, J.H. and Weber, K. - In vivo degradation of mutant Lac repressor, Nature, 228: 1156, 1970.
- Rangel, H.A.; Repka, D. and Costa, M.G. - Proteolytic activity of *Trypanosoma cruzi*. In: Resumos da 3^a Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambú-Minas Gerais, 27 a 29 de Outubro de 1976.
- _____ Araújo, P.M.F. and Costa, M.G. - A neutral proteinase of the epimastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. In: Resumos da 4^a Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambú-Minas Gerais, 5-7 Novembro, 1977.
- Reich, E.; Rifkin, D.B. and Shaw, E. - Proteases and Biological Control. Edited from: Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. vol. 2, 1975.
- Repka, D.; Rangel, H.A. & Costa, M.G. - Atividade proteolítica de *Trypanosoma cruzi*. Ciência e Cultura, 24 (6): 296, 1972.
- Silva, L.H.P. & Nussensweig, V. - Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin. Biol., São Paulo, 20: 191-208, 1953.
- Sluyterman, L.A. and Wijdenes, J. - An agarose mercurial column for the separation of mercaptopapain and nonmercaptapapain. Biochim. Biophys. Acta, 200: 590-593, 1970.

- Schaeffer, P. - Sporulation and the production of antibiotics exoenzymes and exotoxins. Bacteriol. Rev., 33: 48-71, 1969.
- Spudick, J.A. and Kornberg, A. - Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. VII- Protein turnover during sporulation of Bacillus subtilis. J. Biol. Chem., 243: 4600-4605, 1968.
- Tafuri, W.L. - Alterações ultra-estruturais dos componentes , muscular, intersticial e nervoso do coração, esôfago e intestinos na doença de Chagas experimental e humana. Tese Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1974.
- Tager, M. and Drummond, M.C. - Staphylocoagulase. Ann. N.Y. Acad. Sci., 128 (1): 92-111, 1965.
- Tahin, Q.S.; Rocha, T.L. and Paiva, A.C.M. - Effect of pH on the proteolysis of ovalbumin by pepsin and dephosphorylated pepsin. Enzymologia, 37: 153, 1969.
- Uriel, J. - In: Methods in Immunology and Immunochemistry . (Williams, C.A. and Chase, M.W., eds.), New York, Academic Press, vol. III, p. 294-321, 1971.
- _____ Webb, T. et Lapresle, C. - Étude par électrophorèse en gélose des activités protéolytique et estérasiques d'un extrait de rate de lapin. Bull. Soc. Chim. Biol., Tome XLII , nº 11, pp. 1285-1291, 1960.
- Venkatesan, S.; Bird, R.G. and Ormerod, W.E. - Intracellular enzymes and their localization in slender and stumpy forms of Trypanosoma brucei rhodiense. Int. J. Parasitol., 7: 139-147, 1977.
- Walsh, K.A. and Wilcox, P.E. - Serine proteases. In: Methods in Enzymology. (Perlmann, G.E. and Lorand, L., eds.), N. York Academic Press, vol. 19: 31-41, 1970.
- World Health Organization - Immunology of Chagas disease. Bull. World Org., Memoranda, 50: 459-472, 1974.
- Wright, B.E. and Anderson, M.L. - Protein and amino acid turnover during differentiation in the slime mold. I- Utilization of endogenous amino acids and proteins. Biochim. Biophys. Acta., 43: 62-66, 1960.