

MARCOS GARCIA COSTA

ATIVIDADE PROTEINÁSICA DOS LISADOS DE *Trypanosoma cruzi*  
(Chagas, 1909)

Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia da Universidade  
Estadual de Campinas para ob  
tenção do grau de Mestre.

Campinas

São Paulo - Brasil

1977

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

À Vera e nossos filhos

Marcos José

Karime Maria

Kleber Vinícius

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Humberto de Araújo Rangel pela orientação e amizade.

Ao Professor Zeferino Vaz, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio dado ao desenvolvimento da pesquisa e ao ensino pós-graduado.

Ao Professor Walter August Hadler, Diretor do Instituto de Biologia pelo incentivo constante ao desenvolvimento das atividades do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e aos seus professores, pelos ensinamentos.

Aos Professores Doutores Osvaldo Vital Brazil (Departamento de Farmacologia), Francisco Gomes de Alcântara (Departamento de Morfologia), Luiz Augusto Magalhães (Departamento de Parasitologia), Anibal Eugenio Vercesi (Departamento de Bioquímica) e Daria Repka (Departamento de Microbiologia) pela discussão crítica dos resultados.

Aos colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia pela demonstração constante de amizade, união, colaboração e coleguismo.

Este trabalho foi realizado com recursos fornecidos ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia da UNICAMP pelas seguintes instituições:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DE ENSINO SUPERIOR - CAPES

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (Divisão de Imunologia)

BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA - BIREME

Durante o desenvolvimento deste trabalho, o autor foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

## S U M Á R I O

Introdução .....	1
Material e Métodos .....	4
Resultados .....	8
1. Atividade proteolítica dos extratos de <i>Trypanosoma cruzi</i> em diferentes pH	8
2. Investigação sobre a atividade pro- teolítica em pH neutro .....	12
Discussão .....	24
Resumo e Conclusões .....	28
Referências Bibliográficas .....	30

ABREVIATURAS

- FS : Fração Solúvel
- EDTA: Etilenodiamino-tetracetato dissódico
- DFP : Diisopropilfluorofosfato
- SNC : Soro normal de coelho
- SAH : Soro albumina humana
- GGH : Gama globulina humana
- ATC : Ácido tricloroacético
- BANA: Benzoil l-arginina - 2-naftilamida
- AFNE: Acetyl - DL - phenylalanine - 2 - naphthyl éster.
- CTN : N-carbobenzoxy-l-tyrozine-p-nitrophenyl éster

## I N T R O D U Ç Ã O

As proteinases de microrganismos são extremamente importantes para sua adaptação ao ambiente. Para que esta adaptação ocorra é necessário que haja "turnover" proteico, especialmente nos microrganismos dependentes de amino-ácidos (Mandelstam, 1957; Klein, 1962; Pine, 1972). Vários autores (Halvorson, 1958a, 1958b; Urbá, 1959; Pine, 1965 ; Schlessinger & Ben-Hamida, 1966; Willetts, 1967a, 1967b; Fukuhara, 1967; Nath & Koch, 1970), afirmam que, de um modo geral, o "turnover" proteico total é baixo nos microrganismos em crescimento quando comparado com o observado nos microrganismos em repouso.

É bem conhecido o papel de proteíneas de microrganismos no processo de ativação e inativação ou ainda de modificação de enzimas intracelulares de acordo com as necessidades fisiológicas da célula (Deutscher & Kornberg, 1968 ; Cabib & Bowers, 1971a; Cabib & Farkas, 1971b; Keller & Cabib, 1971; Rouget & Chapeville, 1971; Cabib & Ulane, 1972; Katsunuma et al, 1972; Molano & Gancedo, 1974; Saheki & Holzer, 1974; Schött & Holzer, 1974). As proteinases microbianas desempenham também importante papel na degradação de proteínas ou polipeptídeos não funcionais como o verificado em *Escherichia coli* que possui um sistema de degradação de proteínas, capaz de distinguir os polipeptídeos normais e os polipeptídeos aberrantes produzidos por mutação, verificando-se a degradação destes últimos intracelularmente (Goldschmidt, 1970 ; Platt et al, 1970; Lin & Zabin, 1972).

Na maioria dos microrganismos, durante o processo de esporulação ocorre uma intensificação do "turnover" proteico (Spudich & Kornberg, 1968; Kornberg et al, 1969 ; Hanson et al, 1970; Bernlohr, 1972). Apesar de existirem exemplos como o de *B. brevis*, cujo processo de esporulação ocorre

aparentemente sem nenhum "turnover" proteico (Slapikoff et al, 1971), existem fortes evidências de que as proteinases intracelulares são necessárias para o desencadeamento do processo de esporulação. Tem sido demonstrado, por exemplo, que a inosina 5' - monofosfato desidrogenase é rapidamente inativada durante a esporulação e que esta enzima é muito sensível, in vitro, a atividade proteolítica de extratos de esporos (Deutscher & Kornberg, 1968).

O envolvimento de proteinases nos processos de diferenciação de células eucarióticas foi estudado por vários autores (Brawerman & Chargaff, 1959; Wright & Anderson, 1959; Wright & Anderson, 1960a, 1960b; White & Sussman, 1961; Wright, 1963; Ramirez & Miller, 1964; Esposito et al, 1969). Em *Euglena gracilis*, por exemplo, que cresce na ausência total de luz e que não contém aparelho fotossintético, após estímulo luminoso ocorre formação de cloroplastos, mesmo em meios que não contêm amino-ácidos, presumivelmente pela degradação de proteínas celulares pré-existentes (Brawerman & Chargaff, 1959).

Existem fortes indicações de que as enzimas proteolíticas são inicialmente importantes para a relação parasito-hospedeiro. A literatura cita as collagenases produzidas por *Clostridium histolyticum* e *Clostridium perfringens*, capazes de lisar o colágeno de músculos e facilitar a difusão das formas de gangrena gasosa (Bidwel & Van Heyniger, 1948; Mac Lennan, 1962); quinases, produzidas por estafilococos e estreptococos, que agem sobre o plasminogênio formando a plasmina, favorecendo o alastramento da infecção (Tager & Drummond, 1965).

A análise crítica dos peritos da Organização Mundial da Saúde - OMS - (1965) sobre imunologia e enfermidades parasitárias indica a necessidade do estudo dos constituintes do parasita, principalmente daqueles que entram em contacto com o meio do hospedeiro. Dentre esses constituintes tem sido chamado a atenção para as enzimas do parasito, que além de elementos reguladores do metabolismo parasitário podem



eventualmente, desempenhar um papel na interação parasito-hospedeiro.

A literatura indica alguns trabalhos sobre enzimas de *Trypanosoma cruzi* (Baernstein & Rees, 1952; Seaman, 1953; Baernstein, 1953a, 1963b; Agosin & Weinbach, 1956; Bash-Lewinson & Grossowicz, 1957; Chakravarty et al, 1963; Warren & Guevara, 1964; Lehmann, 1965; Waks, 1965; Risby et al, 1969; Stohlman et al, 1973). Contudo, com exceção das observações de Repka et al (1972), nenhuma informação existe sobre enzimas proteolíticas desse parasito.

O presente trabalho visa obter informações sobre as proteinases da forma epimastigota do *T. cruzi* quando mantida em meio de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra de Trypanosoma cruzi - A amostra Y de *T. cruzi* (Silva & Nussensweig, 1953) utilizada no presente trabalho, nos foi cedida pelo Prof. Zigman Brener. O meio de Yaeger (Lit) preparado de acordo com as instruções de Fernandes & Castellani (1966), foi utilizado para o cultivo de *T. cruzi*. Porções de 5 ml do inóculo eram semeadas em 20 ml de meio de cultura e mantidos a 28°C durante uma semana.

Obtenção da fração solúvel - Os parasitos contidos em 100 ml de cultura foram lavados com solução gelada de NaCl 0,15M três vezes, a 1400 g, durante 15 minutos a 4°C e o sedimento ressuspenso em 10 ml de água destilada. Esta solução era imediatamente congelada e logo após liofilizada.

Porções de 250 mg do liofilizado foram sucessivamente lavados a 3020g, durante 15 minutos a 4°C, com 25 ml de: acetona (2 vezes), mistura em partes iguais éter-acetona (2 vezes) e éter (2 vezes). O sedimento obtido era seco com jato de ar e mantido a 4°C em vácuo até o momento de uso.

O material delipidado foi tratado com 25 ml de solução salina fisiológica a 4°C. A mistura foi mantida em banho de gelo durante 10 minutos, com agitação ocasional e, a seguir, centrifugada a 12000g, durante 30 minutos. O sobrenadante obtido foi concentrado em membrana ultrafiltrante PM 10 sob atmosfera de nitrogênio de 10 libras/polegada<sup>2</sup>. O material concentrado (FS) foi liofilizado e mantido a -20°C, até o momento de uso.

Otenção de hemoglobina - Os glóbulos vermelhos provenientes de 1000 ml de sangue humano ou bovino, foram lavados 5 vezes

com solução salina fisiológica e centrifugados a 1000g, durante 15 minutos a 4°C. A papa de hemácias obtida foi dialisada, com agitação constante, contra 5000 ml de água destilada durante 48 horas a 4°C. A água de diálise era renovada a cada 12 horas.

O material dialisado foi centrifugado a 12100g, durante 30 minutos e o sobrenadante (hemoglobina) liofilizado e mantido a -20°C, até o momento de uso.

#### Imune-soro - Soro de coelho anti-FS

Os coelhos foram imunizados pela inoculação sub-cutânea, na região lombar, através de quatro injeções de 2 ml da mistura em partes iguais do antígeno (1,0 mg Prot/ml) em adjuvante completo de Freund, com intervalos de 30 dias entre cada inoculação. Após 15 dias da última inoculação, os coelhos foram sangrados e o soro obtido foi armazenado a -20°C até o momento de uso.

Reagentes - O cloridrato de L-cisteína, o etilenodiamino-tetracetato dissódico (EDTA), o diisopropilfluorofosfato (DFP) e a iodoacetamida, foram obtidos, respectivamente, das seguintes firmas: Biochemicals Ltd., Fisher Scientific Company, Sigma Chemical Company & N.B. Corporation. Os solventes orgânicos utilizados neste trabalho tinham a especificação de quimicamente puros. A acetona foi redestilada a 56°C neste laboratório. O éter livre de peróxido por lavagens sucessivas com solução saturada de sulfato ferroso e livre de álcoois e de água pela adição de sódio metálico, foi destilado a 35°C em presença de sulfato ferroso seco e conservado a -20°C até o momento de uso.

Substratos proteicos - As hemoglobinas bovina e humana foram preparadas em nosso laboratório.

O soro normal de coelho foi obtido de animais mantidos em nosso biotério que foram sangrados por punção venosa. Este soro foi mantido a -20°C até o momento de uso.

A sôro albumina humana (SAH) e gama globulina humana (GGH) foram obtidas, respectivamente, de Armour Laboratories e Centre de Transfusion Sanguine, Paris, France.

Determinação da atividade enzimática da fração solúvel - A determinação da atividade enzimática utilizando substratos proteicos foi realizada segundo a técnica de Anson modificada. A FS e o substrato, em concentrações conhecidas e mantidos em banho de gelo, foram ajustados ao pH desejado através do uso de NaOH ou HCl 0,1M. Para manter o pH desejado, foram utilizados tampões indicados no texto e preparados segundo Gomori (1955).

Como controles da reação foram usados, em tubos separados, 1 ml de FS e 1 ml de substrato. Todos os tubos foram incubados a 37°C durante 2 horas. Após o período de incubação foram adicionados 2 ml de ATC a 5% em todos os tubos. Ao controle contendo substrato foi adicionado 1 ml de FS e ao controle contendo FS foi adicionado 1 ml de substrato. A seguir, todos os tubos foram incubados a 45°C, durante 15 minutos. O branco da reação foi realizado misturando-se 1 ml de FS, 2 ml de ATC a 5% e 1 ml de substrato. Esta mistura foi igualmente incubada a 45°C, durante 15 minutos. Após centrifugação a 1700 g, durante 20 minutos a 4°C, foi realizada a leitura dos sobrenadantes em espectrofotômetro Zeiss PM QII, utilizando-se comprimento de onda de 280nm, em cubas de quartzo com 1 cm de caminho ótico. Os resultados da atividade enzimática foram expressos em  $\Delta DO$  (diferença de leitura entre o tubo de reação e o tubo controle contendo FS).

Determinação da constante de Michaelis & Menten - A constante de Michaelis & Menten foi determinada, usando-se hemoglobina bovina e humana como substratos. As diferentes concentrações de substratos foram obtidas diluindo-se a hemoglobina liofilizada em solução tampão fosfato 0,05M, pH 7,0.

A lei dos quadrados mínimos foi utilizada na determinação da função linear dessa constante.

Precipitação em meio gelificado - As técnicas de imunodifusão foram realizadas em gel de ágar a 1% em meio salino isotônico de pH 7,2 - 7,4 conforme instruções de Cuchterlony (1958)

As eletroforeses e imunoeletroforeses simples foram realizadas conforme as indicações de Grabar & Burtin (1964), em placas de vidro de 6 x 4 cm, contendo uma camada de 3 mm de espessura de agarose a 1% em tampão veronal 0,05 M pH 8,6,  $\mu = 0,0025$  com gradiente de potencial de 6 volts/cm, durante uma hora e 20 minutos.

A imunoeletroforese cruzada foi realizada, procedendo-se a separação eletroforética na primeira dimensão, aplicando-se 10  $\mu$ l de FS a 2,0 mg de prot/ml num poço de 2,5 mm de diâmetro em placas de vidro (12 x 9 cm) contendo agarose a 1% em tampão veronal 0,05 M pH 8,6. O mesmo tampão foi utilizado nas cubas. Foi aplicado uma corrente de 6 V/cm por 90 minutos. Após este tempo uma faixa de agarose foi cortada e aplicada em seu lugar 4 ml de uma solução de antisoro a 10% em agarose. Após a solidificação foi aplicada uma corrente de 2 V/cm por 15 horas. As lâminas foram tratadas a seguir segundo os procedimentos descritos por Clarke (1971).

Detecção da atividade proteínásica em gel de agarose - A detecção da atividade proteolítica após eletroforese ou imunoeletroforese simples ou cruzada, foi realizada de acordo com as instruções de Uriel (1960) utilizando-se hemoglobina bovina (0,2%) como substrato diluída em tampão fosfato 0,05M - pH 7,0.

Dosagem de proteínas - As proteínas totais foram dosadas utilizando-se a técnica do biureto segundo Weichselbaun (1946).

RESULTADOS

1. Atividade proteolítica dos extratos de *Trypanosoma cruzi* em diferentes pH.

Uma investigação preliminar da atividade da FS em pH 5,5, 7,0 e 8,5 demonstrou a existência de atividade proteolítica tanto em pH neutro quanto em pH ácido ou em alcalino (tabela 1).

Tabela 1. Atividade proteolítica da FS (2,0 mg Prot/ml) sobre hemoglobina bovina (20 mg/ml).

Tubos	composição da mistura	Absorvância dos sobrenadantes		
		pH 5,5	pH 7,0	pH 8,5
1	FS + hemoglobina	0,787	0,740	0,778
2	FS + NaCl 0,15 M	0,680	0,520	0,430
3	hemoglobina + NaCl 0,15M	0,000	0,000	0,000

A investigação da atividade enzimática da FS (0,9 mg Prot/ml) frente a hemoglobina (40 mg/ml) foi então

realizada utilizando-se diferentes soluções tampão. Os resultados indicados a seguir representam a média de triplicatas de dados experimentais.

Os dados obtidos indicaram a existência de atividade proteolítica desde pH 1,0 até pH 9,0, observando-se picos de atividades na zona ácida entre pH 2,6 e 3,6 (tabelas 2, 3, 4 e 5), na zona neutra (tabelas 6 e 7) e em torno de pH 8,5 (tabela 7). A análise dos dados destas tabelas mostra que, em pH abaixo de 4,6, os controles não apresentaram leitura espectrofotométrica (tabelas 2, 3, 4 e 5) e que não houve concordância dos resultados referentes aos picos máximos de atividade da zona ácida quando diferentes tampões foram utilizados (tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7). Não foi observada nenhuma atividade proteolítica quando a FS era previamente aquecida a 56°C durante 45 minutos.

Quando os tampões utilizados tinham um pH menor do que 5,0, observou-se a ocorrência de precipitado na FS. Este precipitado foi retirado por centrifugação, testando-se apenas o sobrenadante.

Tabela 2. Atividade proteolítica da FS (0,9 mg Prot/ml) em presença de tampão KCl - HCl 0,05 M.

pH	Absorvância dos sobrenadantes		$\Delta$ DO
	tubo de reação (FS + hemoglobina)	tubo controle (FS + tampão)	
1,0	0,160	0,000	0,160
1,2	0,190	0,000	0,190
1,5	0,060	0,000	0,060
1,7	0,040	0,000	0,040
2,0	0,150	0,000	0,150
2,2	0,160	0,000	0,160

Tabela 3. Atividade proteolítica da FS (0,9 mg Prot/ml) em presença de tampão glicina - HCl 0,05M.

Absorvância dos sobrenadantes			
pH	tubo de reação (FS + hemoglobina)	tubo controle (FS + tampão)	$\Delta$ DO
2,2	0,120	0,000	0,120
2,5	0,210	0,000	0,210
3,0	0,360	0,000	0,360
3,6	0,710	0,000	0,710

Tabela 4. Atividade proteolítica da FS (0,9 mg Prot/ml) em presença de tampão citrato - fosfato 0,05M.

Absorvância dos sobrenadantes			
pH	tubo de reação (FS + hemoglobina)	tubo controle (FS + tampão)	$\Delta$ DO
2,6	1,400	0,000	1,400
3,0	0,930	0,000	0,930
3,6	0,420	0,000	0,420
4,0	0,220	0,000	0,220
4,6	0,320	0,020	0,300
5,0	0,450	0,400	0,050
5,6	0,540	0,360	0,180
6,0	0,440	0,230	0,190
6,5	0,550	0,240	0,310
7,0	0,600	0,225	0,375



Tabela 5. Atividade proteolítica da FS (0,9 mg Prot/ml) em presença de tampão citrato - ácido cítrico 0,05M.

Absorvância dos sobrenadantes			
pH	tubo de reação (FS + hemoglobina)	tubo controle (FS + tampão)	$\Delta DO$
3,0	1,100	0,000	1,100
3,6	0,570	0,000	0,570
4,0	0,550	0,000	0,550
4,6	0,475	0,060	0,415
5,0	0,620	0,390	0,230
5,6	0,760	0,390	0,370
6,0	0,650	0,275	0,375

Atabela 6. Atividade proteolítica da FS (0,9 mg Prot/ml) em presença de tampão fosfato 0,05M.

Absorvância dos sobrenadantes			
pH	tubo de reação (FS + hemoglobina)	tubo controle (FS + tampão)	$\Delta DO$
5,7	0,740	0,160	0,580
6,0	0,750	0,220	0,530
6,5	0,860	0,040	0,820
7,0	0,980	0,070	0,910
7,5	0,770	0,060	0,710
8,0	0,700	0,150	0,550

Tabela 7. Atividade proteolítica da FS (0,9 mg Prot/ml) em presença de tampão tris - HCl 0,05M.

Absorvância dos sobrenadantes			
pH	tubo de reação	tubo controle	$\Delta DO$
	(FS + hemoglobina)	(FS + tampão)	
5,5	0,725	0,240	0,485
6,0	0,750	0,160	0,590
6,5	0,945	0,175	0,770
7,0	0,940	0,175	0,765
7,5	0,840	0,155	0,685
8,0	0,865	0,095	0,770
8,5	0,840	0,020	0,820
9,0	0,680	0,335	0,345

## 2. Investigação sobre a atividade proteolítica em pH neutro.

Tendo em vista os resultados, indicados no capítulo anterior, que sugerem a presença de diferentes enzimas proteolíticas na FS, procurou-se focalizar a atenção sobre a atividade em pH neutro. Essas investigações foram realizadas utilizando-se um meio tamponado com tampão fosfato 0,05M - pH 7,0. Todas as experiências foram realizadas em triplicatas e os resultados indicados a seguir, representam as medias dos dados obtidos.

A atividade proteolítica da FS a pH 7,0 decresce à medida que a concentração iônica se afasta daquele pH, como pode ser observado na figura 1, onde se acha apresentada a atividade proteolítica relativa da FS (0,9 mg Prot/ml) frente a hemoglobina bovina (40 mg/ml) em presença de tampão fosfato 0,05M, com diferentes concentrações hidrogeniônicas.

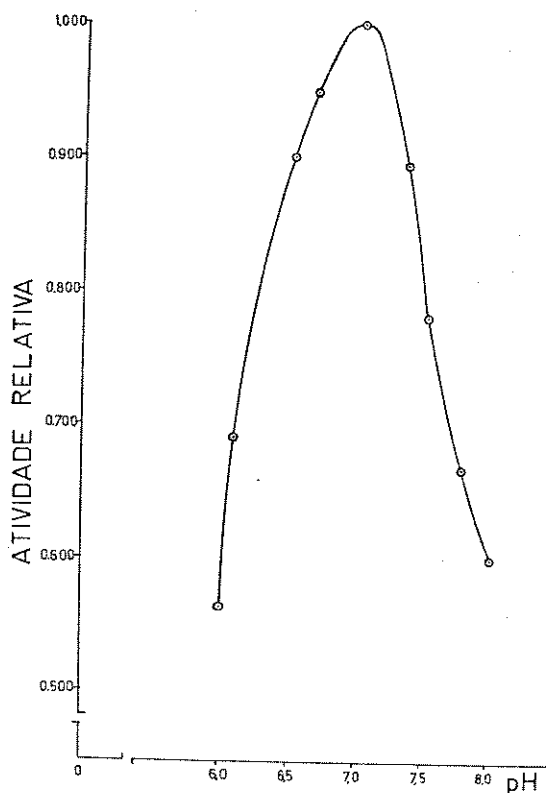


Figura 1. Relação entre atividade relativa da proteinase e o pH do meio.

O estudo da influência da concentração dos substratos hemoglobina bovina ou humana (40 mg/ml) sobre a velocidade de reação enzimática foi realizado usando-se uma concentração de 0,3 mg Prot/ml da FS.

A análise dos resultados obtidos (tabelas 8 e 9) mostrou não existir diferença significativa ( $F=4$ ), ao nível de 5%, entre os resultados obtidos com a hemoglobina bovina ou com a humana. Verifica-se, ainda, na tabela 8, que a velocidade da reação aumenta à medida que aumenta a concentração de substrato, sendo que este aumento tende a valores assintóticos quando são utilizadas concentrações superiores a 35 mg/ml.

Tomando-se a média dos resultados devidamente transformados e os aplicando na equação de Lineweaver-Burk foi possível demonstrar a existência de uma relação linear (figura 2) entre  $\frac{1}{V_0}$  e  $\frac{1}{S}$  estimando-se desse modo o valor do Km em 12,2 mg de hemoglobina.

Tabela 8 . Influência da concentração do substrato (hemoglobina bovina ou humana) sobre a atividade proteolítica da FS a pH 7,0 em presença de tampão fosfato 0,05M.

Concentração de hemoglobina /ml	Média $\Delta$ DO (hemoglobina humana)	Média $\Delta$ DO (hemoglobina bovina)	Média $\Delta$ DO (hemoglobina humana e bovina)
2,5 mg	0,165	0,130	0,147
5,0 mg	0,165	0,220	0,192
7,5 mg	0,265	0,260	0,262
10,0 mg	0,350	0,355	0,352
12,5 mg	0,375	0,400	0,385
15,0 mg	0,425	0,430	0,427
20,0 mg	0,475	0,485	0,480
25,0 mg	0,495	0,500	0,497
30,0 mg	0,520	0,625	0,572
35,0 mg	0,610	0,650	0,630
40,0 mg	0,610	0,650	0,630

Tabela 9. Análise da variância dos resultados apresentados na tabela 8.

causas de variação	graus de liberdade	soma dos quadrados	quadrado médio	fator (F)
hemoglobina	1	0,0028	0,0028	4
concentração	10	0,5548	0,0555	79,3
resíduo	10	0,0069	0,0007	-
TOTAL	21	0,5645		

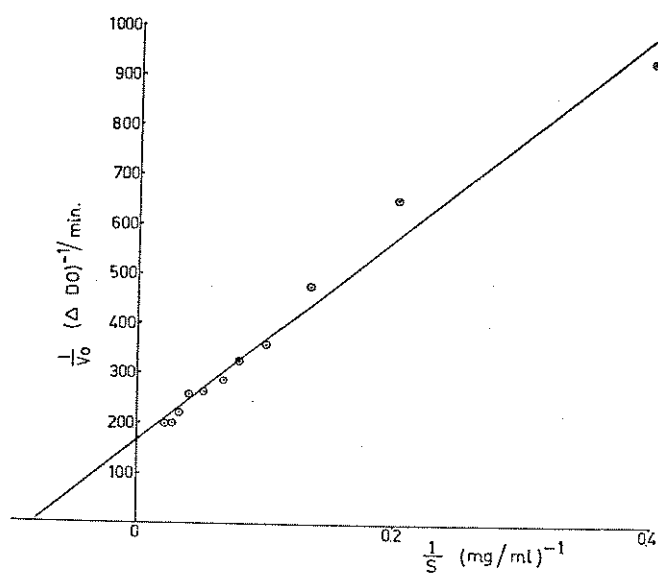


Figura 2. Determinação do Km da FS frente a hemoglobina humana ou bovina.

Quando diferentes concentrações da FS foram testadas frente a hemoglobina bovina ou humana na concentração de 40 mg/ml, os resultados obtidos mostraram existir uma relação praticamente linear entre dose e efeito quando os valores de  $\Delta DO$  se situam entre 0 e 0,500. A partir desse ponto o aumento da concentração da FS resulta em valores de  $\Delta DO$  que tendem para um valor assintótico (figura 3).

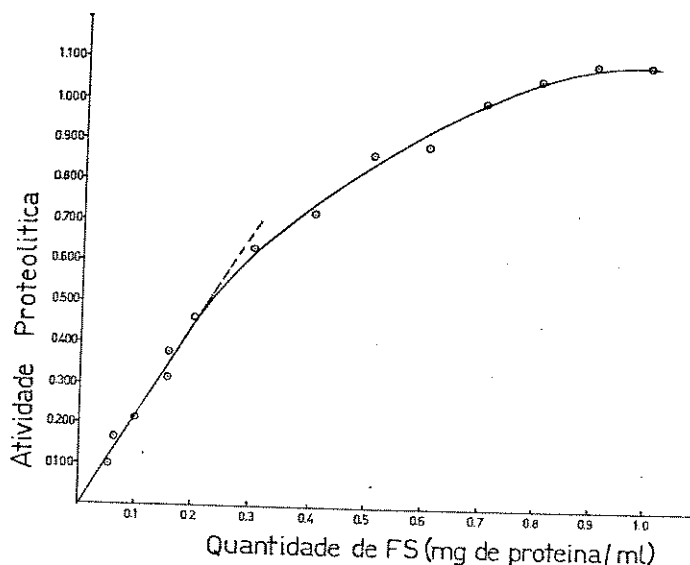


Figura 3. Relação entre concentração da FS e atividade proteolítica frente a hemoglobina bovina ou humana (40 mg/ml) em presença de tampão fosfato 0,05M - pH 7,0.

A atividade enzimática da FS foi investigada sobre diferentes proteínas e os resultados obtidos acham-se apresentados na tabela 10, onde se pode observar uma atividade significativa em todos os substratos utilizados.

Tabela 10. Atividade proteolítica da FS (500 µg Prot/ml) em presença de tampão fosfato 0,05M - pH 7,0 sobre diferentes substratos (10 mg/ml).

substratos	ΔDO
SAB	0,150
SAH	0,140
HHG	0,150
SNC	0,160

Com a finalidade de verificar se a atividade proteolítica observada nos diferentes substratos alterava o motivo antigênico foram realizadas as experiências indicadas, a seguir: porções de 1 ml da FS (1,8 mg Prot/ml), foram misturadas a igual volume de solução (10 mg/ml) de SAB, SAH, GGH ou SNC, na presença de tampão fosfato 0,05M - pH 7,0. Essas misturas foram incubadas a 37°C por 2 ou 24 horas. Os controles eram constituídos por misturas idênticas, em que a FS havia sido previamente aquecida a 56°C por 45 minutos. Após incubação todas as misturas foram analisadas através das técnicas de eletroforese e de imunodifusão.

A comparação entre os padrões eletroforéticos mostraram que os substratos não sofreram alteração pelo tratamento com a FS aquecida ou não.

Uma figura de identidade foi sempre observada quando SAB, SAH, GGH nativos eram comparados por teste de



dupla difusão, através da técnica de Ouchterlony, com esses mesmos antígenos previamente tratados pela FS aquecida ou não.

Pela técnica de imunoeletroforese não foram observadas diferenças significativas entre os substratos tratados pela FS e os controles, tratados com a FS previamente aquecida a 56°C.

A influência de diferentes reagentes sobre a FS foi investigada incubando-se a FS com diferentes concentrações desses reagentes por 30 minutos a temperatura ambiente e determinando-se a atividade enzimática residual sobre a hemoglobina bovina.

A atividade relativa foi calculada dividindo-se a  $\Delta$  DO obtida na reação contendo o reagente pela  $\Delta$ DO da reação na ausência do reagente.

Tabela 11. Ação de DFP, Iodoacetamida, EDTA e cisteína sobre a atividade proteolítica da FS em pH neutro, na presença de tampão fosfato 0,05M - pH 7,0.

Reagentes	Concentração	Atividade relativa
DFP	2 mM	1,14
	0,66 mM	1,18
	0,2 mM	1,19
Iodoacetamida	20 mM	0,01
	6,6 mM	0,01
	2 mM	0,03
EDTA	20 mM	1,10
	6,6 mM	0,68
	2 mM	0,68
Cisteína	20 mM	1,07
	6,6 mM	1,23
	2 mM	0,91

Um único componente, com atividade proteíná*si*ca, pode ser identificado, utilizando-se o método de Uriel modificado, após eletroforese em gel de agarose (figuras 4 e 5). A análise imunoeletroforética indicou a presença de vários sistemas precipitantes, sendo que apenas um desses sistemas apresentou atividade proteínásica (figuras 6 e 7). Experiências de imunoeletroforese cruzada mostraram a existência de pelo menos nove sistemas precipitantes aparentemente não relacionados entre si, dos quais apenas um apresentou atividade proteolítica (figuras 8 e 9).

Nenhuma atividade proteínásica pode ser detectada quando experiências similares às acima citadas foram realizadas em presença de 20 mM de iodoacetamida.

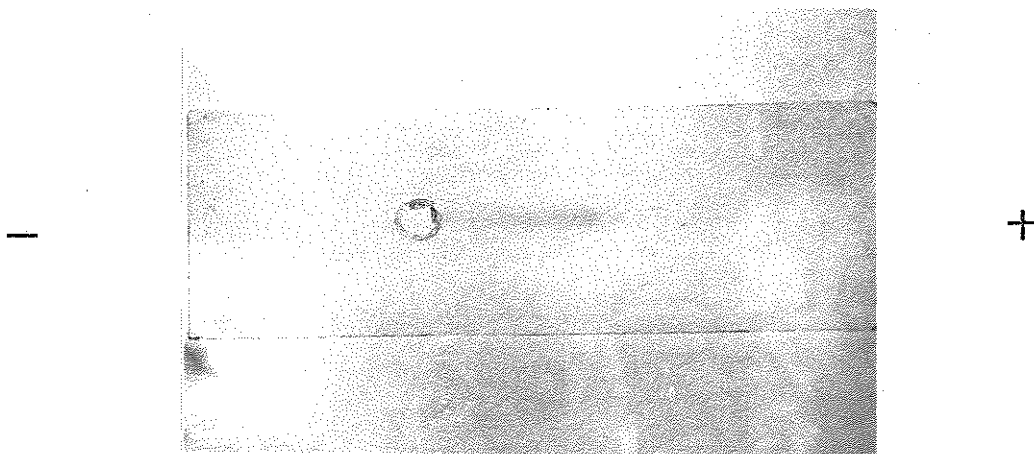


Figura 4. Eletroforese da FS (2,0 mg de prot./ml), em gel de agarose.

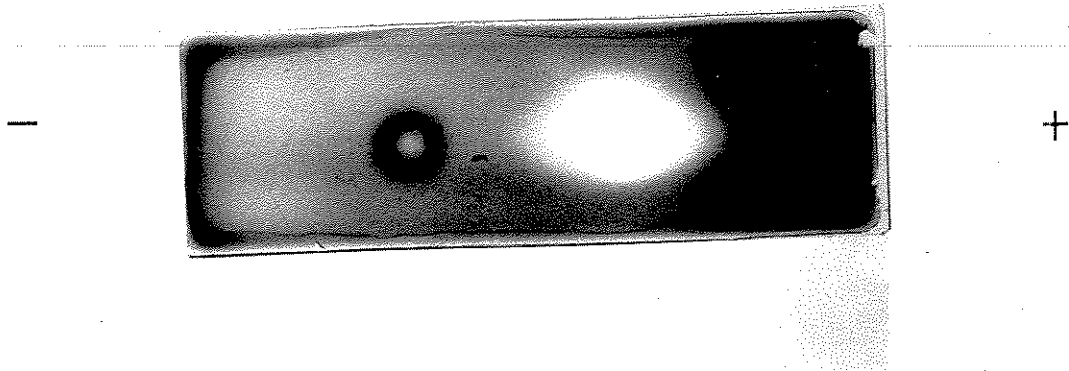


Figura 5. Detecção da atividade proteolítica da FS (2,0 mg prot/ml) após eletroforese em gel de agarose.

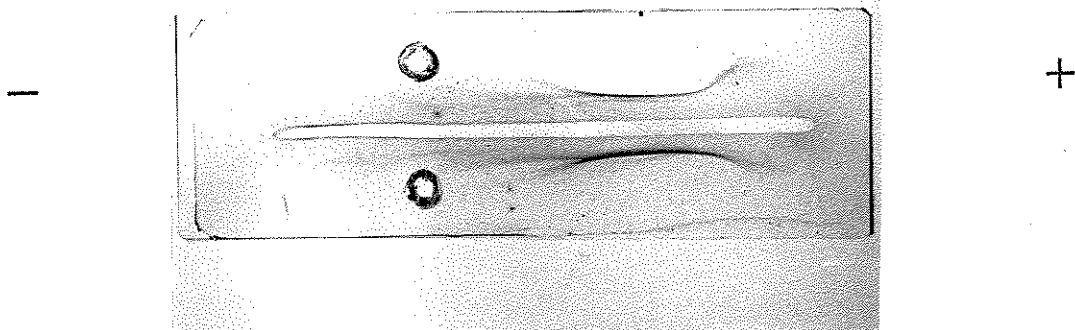


Figura 6. Imunoeletroforese simples da FS (2,0 mg prot/ml) com seu antisoro específico.

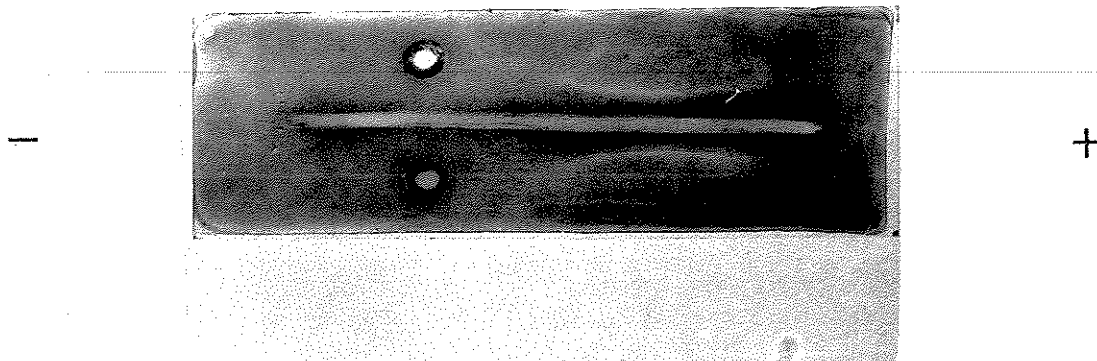


Figura 7. Detecção da atividade proteolítica da FS (2,0 mg prot/ml), após imunoeletroforese simples em gel de agarose.

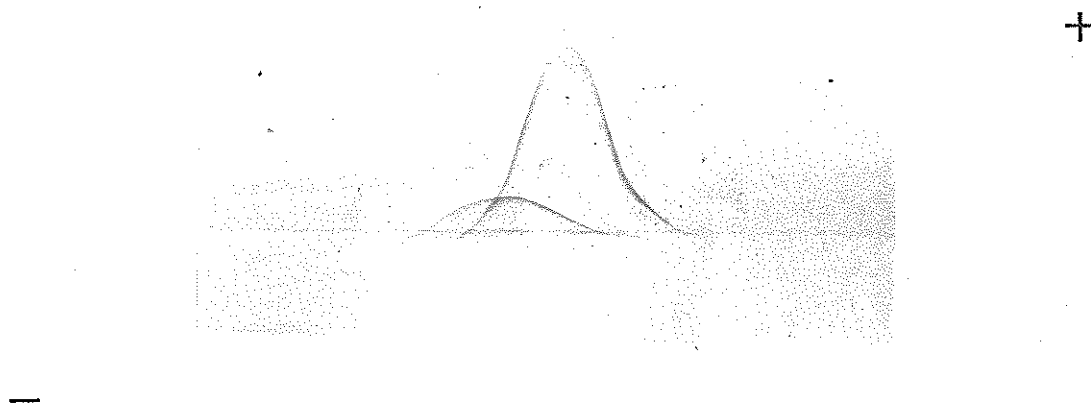


Figura 8. Imunoeletroforese cruzada da FS (2,0 mg prot/ml) , com seu antisoro específico.

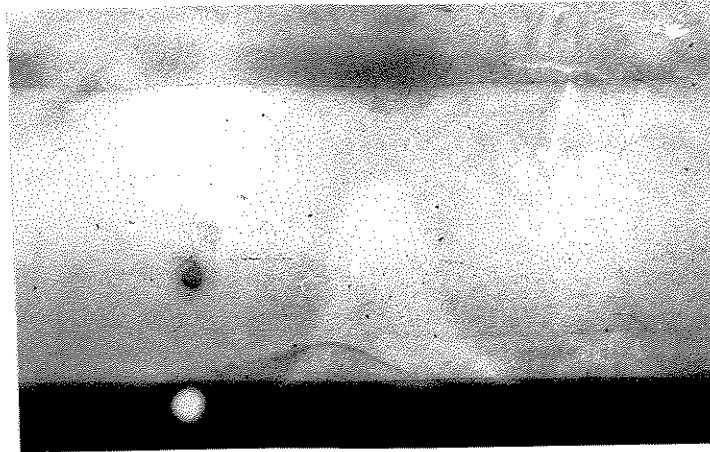


Figura 9. Detecção da atividade proteolítica da FS (2,0 mg prot/ml), após imunoeletroforese cruzada.

## DISCUSSÃO

Os dados obtidos indicam que a FS apresenta atividade proteolítica sobre a hemoglobina bovina numa extensa faixa de pH com ocorrência de três picos de atividade: em zona ácida, em pH neutro e em pH levemente básico, o que sugere a presença de diferentes enzimas proteolíticas.

A investigação da atividade proteolítica em meio ácido não permitiu determinar, com precisão, um pH ótimo de atividade. Os pontos de atividade máxima observados com diferentes tampões estavam situados no extremo na zona de efetividade da ação do tampão, tendo havido discordância entre os dados obtidos com tampão glicina-HCl que indicaram um máximo em pH 3,6 ou acima e os obtidos com tampão citrato-fosfato que indicaram um máximo em pH 2,6 ou abaixo. Com base nesses dados pode-se admitir que a zona de atividade máxima está, provavelmente, situada entre os pH 2,6 e 3,6 e que a intensidade da ação proteolítica nesta zona é dependente da natureza dos íons presentes na reação. A FS, quando ajustada a pH abaixo de 5,0, apresentava um precipitado que era removido antes da realização das experiências de atividade proteolítica na zona ácida e a análise dos protocolos mostra que, em pH abaixo de 5,0, os controles da reação (auto-digestão) não apresentavam absorvância apreciável. Esses dados são indicativos da presença de enzimas (nucleases ou proteases) naquele precipitado.

A presença de proteinases ácidas intracelulares tem sido assinalada em células eucarióticas e procarióticas de vários microrganismos tais como: *Saccharomyces cerevisiae* (Lenney, 1956; Lenney & Dalbec, 1967), *Saccharomyces carlsbergensis* (Felix & Brouillet, 1966; Maddox & Hough, 1970), *Bacteroides amylophylus* (Blackburn, 1968), *Fodospora anserina*

(Begueret, 1972; Begueret & Bernet, 1973), *Aspergillus nidulans* (Cohen, 1973), *Aspergillus niger* (Bosmann, 1973). Entre os protozoários foi assinalada a presença em *Tetrahymena pyriformis* (Dickie & Liener, 1962a, 1962b).

A ocorrência de atividade proteolítica em meio ácido nos extratos de *T. cruzi* foi observada por Repka et al (1972) e mais recentemente por Itow & Camargo que utilizaram a azocaseína como substrato. Esses últimos autores igualmente não conseguiram indicar um pH de ação, nesse caso em virtude da insolubilidade do substrato em pH abaixo de 5,0.

A atividade proteolítica sobre hemoglobina bovina e humana em pH 7,0 se deve, provavelmente, a uma única enzima, visto que a relação entre concentração iônica e atividade relativa foi descrita por uma curva cuja forma se aproxima da curva normal. Por outro lado, observou-se uma relação linear entre os inversos da velocidade inicial da reação ( $\frac{1}{v}$ ) e a quantidade de substrato ( $\frac{1}{S}$ ). Em concordância com esses fatos, apenas um único componente com atividade proteinásica pode ser detectado pela técnica de Uriel, após eletroforese em gel, imuno-eletroforese simples e imuno-eletroforese cruzada. Nesses dois últimos testes foram observados vários sistemas precipitantes não relacionados entre si, indicando que a FS contém diferentes antígenos. No entanto, apenas um desses sistemas apresentava atividade proteinásica, sugerindo fortemente a existência de uma única proteínase ativa a pH 7,0 e indicando que os anticorpos específicos para esta enzima não eram capazes de inibir a ação proteolítica nas condições do teste. A ausência de inibição da atividade proteolítica na presença de anticorpos específicos, assinalada por vários autores trabalhando com diferentes enzimas (Uriel, 1961 - 1963; Cinader & Lafferty, 1963; Uriel & Avrameas, 1964) é uma indicação da independência dos determinantes antigênicos e sítio ativo da enzima.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na ação desta proteínase sobre a hemo-

globina bovina ou humana quando se investigou a influência da quantidade de substrato sobre a velocidade da reação, o que sugere que os grupos susceptíveis à hidrólise estão igualmente acessíveis nas duas hemoglobinas.

A ação desta proteinase sobre SNC, SAB, SAH e GGH, não levou a modificações apreciáveis na mobilidade eletroforética ou no motivo antigênico desses substratos, o que sugere uma ação hidrolítica limitada a algumas ligações peptídicas que não estão diretamente envolvidas com a maioria dos determinantes antigênicos destas moléculas. Contudo, não se pode afastar a possibilidade de que várias ligações tenham sido hidrolisadas, sem a consequente liberação de peptídeos, em virtude da presença de grupos dissulfetos, e que a molécula tenha perdido algumas de suas funções.

Observações recentes realizadas neste laboratório indicam que os extratos de *T. cruzi* em pH 7,0 apresentam atividades proteolíticas semelhantes às da tripsina e da quimiotripsina, porquanto são capazes de hidrolisar o BANA e o AFNE respectivamente. Não obstante, essas ações não foram inibidas pela iodoacetamida mas o foram pelo DFP, indicando que essas atividades são dependentes de serina proteases. Este fato permite distinguir a ação proteolítica que pode ser inibida pela iodoacetamida mas não pelo DFP, da ação sobre os substratos sintéticos que pode ser inibida pelo DFP mas não pela iodoacetamida. Igualmente Itow & Camargo observaram ações semelhantes a da tripsina e quimiotripsina utilizando como substratos sintéticos o BANA e o CTN.

Pode-se praticamente excluir a possibilidade de que a ação sobre o BANA e sobre o AFNE, seja devido a proteinase que age sobre a hemoglobina em virtude das considerações acima. Contudo, não se pode excluir que a ação sobre a hemoglobina seja devida a mesma enzima que hidrolisa o CTN. No entanto, não seria de estranhar que as duas ações sejam devidas a diferentes proteases, como ocorre, por exemplo, nos extratos de baço que contêm diferentes peptidases capazes de hidrolisar substratos sintéticos (Mycek, 1970) e pelo menos duas verdadeiras proteinases, tais como as catepsinas D e E



(Press et al, 1959; Lapresle & Webb, 1962) que são capazes de hidrolisar proteínas mas não hidrolisam substratos sintéticos de baixo peso molecular.

As informações obtidas no presente trabalho são ainda insuficientes para permitir o levantamento de hipóteses sobre o possível papel biológico dessas enzimas. Contudo, as verificações de O'Dally (1975, 1976) segundo as quais o *T. cruzi* necessita diferentes componentes de soro fetal bovino para seu crescimento e diferenciação, sugerem que esta proteinase esteja envolvida no processo de metabolização desses componentes pelo protozoário.

RESUMO E CONCLUSÕES

A atividade proteinásica de uma fração solúvel, rotulada como FS, obtida a partir de lisados da forma epimastigota de *T. cruzi* foi investigada em diferentes pH, utilizando diferentes tampões e o método de Anson modificado. A atividade proteolítica em pH 7,0 foi particularmente investigada utilizando-se diferentes substratos proteicos.

A caracterização da proteinase neutra foi tentada utilizando-se os métodos de detecção de atividade proteolítica em gel de agarose, após eletroforese, imunoeletroforese simples e imunoeletroforese cruzada.

Os resultados obtidos mostram que:

1. A FS exibe atividade proteolítica em uma ampla faixa de pH (entre 1,0 e 9,0), ocorrendo picos de atividade na zona ácida (pH 2,6 a 3,6), na zona alcalina (pH 8,5) e a zona neutra.

2. A atividade proteinásica da zona neutra apresentou um ótimo de atividade em pH 7,0, quando se utilizou tampão fosfato e hemoglobina bovina ou humana como substratos. Um mesmo Km foi encontrado para as duas hemoglobinas que quando testadas frente a diferentes concentrações de FS, obteve-se uma relação praticamente linear entre dose e efeito quando os valores de  $\Delta DO$  se situam entre 0 e 0,500.

3. A proteinase neutra é capaz de agir sobre SNC, SAB, SAH e GGH, não alterando contudo o motivo antigênico desses substratos.

4. As experiências de eletroforese, imunoeletroforese simples e imunoeletroforese cruzada detectaram apenas um componente da FS com atividade proteinásica, atividade

essa capaz de ser inibida pela iodoacetamida e não pelo DFP ,  
sugerindo fortemente que essa ação se deva a uma única enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSIN, M. & Weinbach, E.C. Partial purification and characterization of the Isocitric Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. Biochim. Biophys. Acta, 21 (1): 117-126, 1956.
- ANSON, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. 22: 79, 1938.
- BAERNSTEIN, H.D. Malic Dehydrogenase and Related Enzymes in the Culture Form of *Trypanosoma cruzi*. Exptl. Parasit., 2 (4): 380-396, 1953a.
- BAERNSTEIN, H.D. The Enzyme Systems of the Culture Form of *Trypanosoma cruzi*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 56(5): 982-994, 1953b.
- BAERNSTEIN, H.D. & Rees C.W. Aldolase in the Culture Form of *Trypanosoma cruzi*. Exptl. Parasit., 1(3): 215-228, 1952.
- BASH-LEWINSON, D. & Grossowicz, N. Transaminases of *Trypanosoma cruzi*. Bull. Research Council Israel., Sect. E, 6E (2): 91-92, 1957.
- BEGUERET, J. Protoplasmic Incompatibility: Possible Involvement of Proteolytic Enzymes. Nature New Biol., 235: 56-58, 1972.
- BEGUERET, J. & Bernet, J. Proteolytic Enzymes and Protoplasmic Incompatibility in *Podospora anserina*. Nature New Biol., 243: 94-96, 1973.
- BERNLOHR, R.W. Oxygen Probes of Protein Turnover, Amino Acid Transport, and Protein Synthesis in *Bacillus licheniformis*. J. Biol. Chem., 247 (15): 4893-4899, 1972.

- BIDWELL, E. & Van Heyningen, W.E. The Biochemistry of gas gangrene toxins. The K toxin of *Clostridium welchii*. Biochem. J., 42: 140-151, 1948.
- BLACKBURN, T.H. The Protease Liberated from *Bacteroides amylophilus* Strain H18 by Mechanical Disintegration. J. Gen. Microbiol., 53: 37-51, 1968.
- BOSMANN, H.B. Protein Catabolism. II. Identification of Neutral and Acidic Proteolytic Enzymes in *Aspergillus niger*. Bioch. Biophys., 293: 476-489, 1973.
- BRAWERMAN, G. & Chargaff, E. Changes in Protein and Ribonucleic Acid during the formation of Chloroplasts in *Euglena gracilis*. Bioch. Biophys. Acta., 31: 164-171, 1959.
- CABIB, E. & Bowers, B. Chitin and Yeast Budding. J. Biol. Chem., 246(1): 152-159, 1971a.
- CABIB, E. & Farkas, V. The Control of Morphogenesis: An Enzymatic Mechanism for the Initiation of Septum Formation in Yeast. Proc. Nat. Acad. Sci., 68(9): 2052-2056, 1971b.
- CABIB, & Ulane, R. Chitin Synthetase Activating Factor from Yeast, A Protease. Biochem. Biophys. Research Communications, 50(1), 1972.
- CHAKRAVARTY, N.; Sanchez, M. & Ercoli, N. Histochemical Studies of Succinic Dehydrogenase in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania leproide*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 110 (3): 517-521, 1963.

- CINADER, B. & Lafferty, K. J. Antibody as Inhibitor of Ribo-  
nuclease: Role of Steric Hindrance, Aggregate Formation,  
and Specificity. Ann. N.Y. Acad. Sci., 103: 653-673, 1963.
- CLARKE, H.G.M. Two-dimensional (Laurell) immunoelectrophoresis  
for estimation of antigen in relative units. In: Williams,  
C.A. & Chase, M.W. (Ed.) Methods in immunology and immuno-  
chemistry. Academic Press, London, v.III, 1971.
- COHEN, B.L. The neutral and alkaline proteases of *Aspergillus*  
*nidulans*. J. Gen. Microbiol., 77: 521-528, 1973.
- DEUTSCHER, M.P. & Kornberg, A. Biochemical Studies of Bacterial  
Sporulation and Germination. J. Biol. Chem., 243(18):4653  
-4660, 1968.
- DICKIE, N. & Liener, I.E. A study of the proteolytic system  
of *Tetrahymena pyriformis* W.I. Purification and partial  
characterization of the constituent proteinases. Biochim.  
Biophys. Acta., 64: 41-51, 1962a.
- DICKIE, N. & Liener, I.E. A study of the proteolytic system  
of *Tetrahymena pyriformis* W. II. Substrate Specificity of  
the constituent proteinases. Biochem. Biophys. Acta., 64:  
52-59, 1962b.
- ESPOSITO, M.S.; Esposito, R.E.; Arnaud, M. & Halvorson, H. O.  
Acetate utilization and macromolecular synthesis during  
sporulation of yeast. J. Bacteriol., 100(1): 180-186, 1969.
- FÉLIX, F. & Brouillet, N. Purification et propriétés de deux  
peptidases de levure de brasserie. Biochim. Biophys. Acta.,  
122: 127-144, 1966.
- FERNANDES, J.F. & Castellani, O. Nutrição e crescimento do  
*Trypanosoma cruzi*. In: J. Romeu Cançado (Ed.). Doença de  
Chagas, Belo Horizonte, MG., 68-86, 1966.

- FUKUHARA, H. Protein synthesis in non-growing yeast. The respiratory adaptation system. *Biochim. Biophys. Acta.*, 134: 143-164, 1967.
- GOLDSCHMIDT, R. IN VIVO Degradation of nonsense Fragments in *E. coli*. *Nature.*, 228: 1151-1153, 1970.
- GOMORI, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: Colowick, SP. & Kaplan, N.O. *Methods in enzymology*. Academic Press Inc. Publ. N.Y., 1955.
- GRABAR, P. & Burtin, P. *Imunoelektrophoretische Analyse*. Elsevier, Amsterdam, 1964.
- HALVORSON, H. Intracellular protein and nucleic acid turnover in resting Yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 27: 255-266, 1958a.
- HALVORSON, H. Studies on protein and nucleic acid turnover in growing cultures of yeast. *Biochim. Biophys. Acta.*, 27 : 267-276, 1958b.
- HANSON, R.S.; Peterson, J.A. & Yousten, A.A. Unique biochemical events in bacterial 1542 sporulation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 24: 53-84, 1970.
- INMUNOLOGIA y enfermedades parasitarias. Washington, organizacion Mundial de la Salud, Inf. tecn., 315, 1965.
- ITOW, S. & Camargo, E.P. Proteolytic activities in cell extracts of *Trypanosoma cruzi* (no prelo).
- KATSUNUMA, T.; Schött, E., Elasässer, S. & Holzer, H. Purification and properties of tryptophan-synthase-inactivating enzymes from yeast. *Eur. J. Biochem.*, 27: 520-526, 1972.

- KELLER, F.A. & Cabib, E. Chitin and Yeast Budding. *J.Biol.Chem.*, 246 (1): 160-166, 1971.
- KLEIN, H.P. Synthesis of enzymes in cells. *Ann. N.Y. Acad.Sci.*, 102: 637, 1962.
- KORNBERG, A.; Spudich, J.A.; Nelson, D.L. & Deutscher, M.P. Origin of proteins of sporulation. *Ann.Rev.Biochem.*, 37 : 51-78, 1969.
- LAPRESLE, C. & Webb, T. The purification and properties of a proteolytic enzyme, rabbit cathepsin E, and further studies on rabbit cathepsin D. *Biochem. J.*, 84: 455, 1962.
- LEHMANN, D.L. Some dehydrogenase from five species of South American *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Ann.Trop.Med. Parasit.*, 59(4): 1965.
- LENNEY, J.F. A study of two yeast proteinases. *J.Biol.Chem.*, 221: 919-930, 1956.
- LENNEY, J.F. & Dalbec, J.M. Purification and properties of two proteinases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch.Biochem. Biophys.*, 120: 42-48, 1967.
- LIN, S. & Zabin, I.  $\beta$  Galactosidase. *J. Biol. Chem.*, 247 (7): 2205-2211, 1972.
- MAC LENNAN, J.D. The histotoxic clostridial infection of Man. *Bacteriol. Rev.*, 26: 177-274, 1962.
- MADDOX, I.S. & Hough, J.S. Proteolytic enzymes of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochem. J.*, 117: 813-852, 1970.
- MANDELSTAM, J. Turnover of protein in starved bacteria and its relationship to the induced synthesis of enzyme. *Nature* 179: 1179-1181, 1957.



- MOLANO, J. & Gancedo, C. Specific Inactivation of Fructose 1,6-Bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* by a Yeast Protease. *Eur. J. Biochem.*, 44: 213-217, 1974.
- MYCEK, M.J. Cathepsins. In: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. (ed.) *Methods in enzymology*. Academic Press, New York, v.19:285-315, 1970.
- NATH, K. & Koch, A.L. Protein Degradation in *Escherichia coli*. *J. Biol.Chem.*, 245(11): 2289-2900, 1970.
- OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel Methods for Immunological A nalysis. *Progress in Allergy.*, 5: 1, 1958.
- 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. Heterogeneity of Protein Turnover in *Escherichia coli*. *Biom. et Biophys. Acta.*, 104: 439-456, 1965.
- PINE, M.J. Turnover of Intracellular Proteins. *Annu.Rev. Microbiol.*, 26: 103-123, 1972.
- PLATT, T.; Miller, J.H. & Weber, K. In Vivo Degradation of Mutant Lac Repressor. *Nature.*, 228: 1154-1156, 1970.
- PRESS, E.M.; Portier, R.R. & Cebra, J. The Isolation and Properties of a Proteolytic Enzyme Cathepsin D, from Bo vine Spleen. *Biol. J.*, 74: 501, 1959.
- RAMIREZ, C. & Miller, J.J. The Metabolism of Yeast Sporulation. *Can. J. Microbiol.*, 10(5): 623-631, 1964.

- REKPA, D.; Rangel, H.A. & Costa, M.G. Atividade Proteolítica de Extratos de *T. cruzi*. Ciênc. Cult., 24(supl.6): 296 , 1972.
- RISBY, E.L.; Seed, T.M. & Seed, J.R. *Trypanosoma gambiense*, *T. rhodesiense*, *T. brucei*, *T. equiperdum* and *T. lewisi*: Purification and Properties of Phosphohexose Isomerase. Exptl. Parasit., 21(1-3): 101-106, 1969.
- ROUGET, P. & Chapeville, F. Leucyl-tRNA Synthetase. Eur. J. Biochem., 23: 459-467, 1971.
- SAHEKI, T. & Holzer, H. Comparisons of the Tryptophan Synthase Inactivating Enzymes with Proteinases from Yeast. Eur. J. Biochem., 42: 621-626, 1974.
- SCHLESSINGER, D. & Ben-Hamida, F. Turnover of Protein in *Escherichia coli* Starving for Nitrogen. Biochem. Biophys. Acta., 119: 171-182, 1966.
- SCHÖTT, E.H. & Holzer, H. Purification and Some Properties of Tryptophan Synthase Inactivase from Yeast. Eur. J. Biochem., 42: 61-66, 1974.
- SEAMAN, G.R. The Succinic Dehydrogenase of *Trypanosoma cruzi*. Exptl. Parasit., 2(3): 236-241, 1953.
- SILVA e Nussensweig, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin. e Biol., 20: 191-208. 1953.
- SLAPIKOFF, S.; Spitzer, J. & Vaccaro, D. Sporulation in *Bacillus brevis*: Studies on Protease and Protein Turnover. J. Bacteriol., 106(3): 739-744, 1971.
- SPUDICH, J.A. & Kornberg, A. Biochemical Studies of Bacterial Sporulation and Germination. J. Biol. Chem., 243(17):4600 -4605, 1968.

- STOHLMAN, S.A.; Kuwahara, S.S. & Kazan, B.H. Enzyme, Protein, and Nucleic Acid Content of Two Morphological Forms. *Arch. Microbiol.*, 92: 301-311, 1973.
- TAGER, M. & Drummond, M.C. Staphylocoagulase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 128(1): 92-111, 1965.
- URBÁ, R.C. Protein Breakdown in *Bacillus cereus*. *Biochem. J.*, 513-518, 1959.
- URIEL, J. Caractérisation des Cholinestérases et D'Autrés Estérases Carboxyliques après Électrophorèse et Immunoélectrophorèse en Gelose. *Ann. Inst. Pasteur.*, 101: 104-119, 1961.
- URIEL, J. Characterization of Enzymes in Specific Immune-precipitates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 103: 956-979, 1963.
- URIEL, J. et Avrameas, S. Mise en évidence D'Hydrolases Pancréatiques après Électrophorèse et Immuno-Électrophorèse en Agarose. *Ann. Inst. Pasteur*, 106: 396-407, 1964.
- URIEL, J.; Webb, T. & Lapresle, C. Bulletin de la Société de Chimie Biologique, 42(11): 1285-1291, 1960.
- WAKS, J. Enzyme changes in experimental American trypanosomiasis. *Progr. Protozool. Intern. Congr.*, (91):81, 1965.
- WARREN, L.G. & Guevara, A. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. IV. Evidence in Favor of the Presence of Hexokinase. *J. Protozool.*, 11(1): 107-108, 1964.
- WEICHSELBAUN, T.E. An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. *Am. J. Clin. Path.*, 10: 40, 1946.

- WHITE, G.J. & Sussman, M. Metabolism of Major Cell Components During Slime Mold Morphogenesis. *Biochem. Biophys.*, 53 : 285-293, 1961.
- WILLETTS, N.S. Intracellular Protein Breakdown in Non-Growing Cells of *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, 103: 453-461, 1967a.
- WILLETTS, N.S. Intracellular Protein Breakdown in Growing Cells of *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, 103: 462-466, 1967b.
- WRIGHT, B.E. Endogenous Activity and Sporulation in Slime Molds. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 102: 740-754, 1963.
- WRIGHT, B.E. & Anderson, M.L. Biochemical Differentiation in the Slime Mold. *Biochim. Biophys. Acta.*, 31: 310-322, 1959.
- WRIGHT, B.E. & 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, 1960a.
- WRIGHT, B.E. & Anderson, M.L. Protein and Amino Acid Turnover During Differentiation in the Slime Mold. II. Incorporation of [<sup>35</sup>S] Methionine Into the Slime Mold. *Biochim. Biophys. Acta.*, 43: 67-78, 1960b.