

DETECÇÃO DE UMA PROTEINASE COMUM ÀS FORMAS
EPIMASTIGOTAS, TRIPOMASTIGOTAS E AMASTIGO-
TAS, DE DIFERENTES CEPAS DE Trypanosoma
cruzi (Chagas 1909)

M. BONFITTO

MARIO BONFITTO

DETECÇÃO DE UMA PROTEINASE COMUM ÀS FORMAS
EPIMASTIGOTAS, TRIPOMASTIGOTAS E AMASTIGO-
TAS, DE DIFERENTES CEPAS DE Trypanosoma
cruzi (Chagas 1909)

Tese de Mestrado

Apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas

Orientador: Prof. Dr. H. A. Rangel

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Campinas - São Paulo

1980

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À Vera Lúcia

Aos meus pais Giuseppe Luigi e

Antonia Aucello

Aos meus irmãos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel, pela orientação e amizade.

Ao Professores: Dr. Irineu J. B. de Camargo, Dra. Dária Repka, Dr. Paulo M. F. de Araújo e Dr. José Lopes de Faria, pela discussão crítica e sugestões ao presente trabalho.

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

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pela demonstração de amizade e colaboração.

Aos técnicos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, e a todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

As instituições abaixo relacionadas, 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 DA SAÚDE (DIVISÃO DE IMUNOLOGIA)

BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA

Durante o desenvolvimento deste trabalho, o autor foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

S U M Á R I O

	Pags.
Introdução.....	1
Material e Métodos.....	5
Resultados.....	13
1 - Obtenção da proteinase.....	13
2 - Especificidade do imunossoro anti-F3.....	15
3 - Detecção da proteinase nas formas tripomastigotas e amastigotas, empregando-se o imunossoro anti- F3, pelas reações imunocitoquímicas.....	16
Discussão.....	22
Resumo e Conclusões.....	25
Referências Bibliográficas.....	26

I N T R O D U Ç Ã O

A Tripanosomíase sul-americana ou Moléstia de Chagas é uma infecção de evolução essencialmente crônica causada por um protozoário, o Trypanosoma cruzi (Chagas 1909), transmitido através de hemípteros hematófagos da sub-família Triatominae. Durante seu ciclo evolutivo o T. cruzi aparece em três formas distintas: a epimastigota, a amastigota e a tripomastigota (W.H.O. 1974).

Apesar das numerosas observações histológicas de lesões produzidas pelo T. cruzi, pouco se sabe a respeito do mecanismo patogênico desta infecção; entretanto, a hipótese de enzimas proteolíticas ou de toxinas estarem envolvidas na patogenia da Tripanosomíase sul-americana tem sido levantada por vários autores (Mayer e Rocha Lima 1912; Köberle e Alcântara 1960; Hutt, Köberle e Salfelder 1973; Tafari 1974) para explicar a degeneração de fibras do miocárdio e de neurônios, e consequentes manifestações clínicas próprias.

A Organização Mundial da Saúde tem pois recomendado o estudo dos componentes antigênicos de tripanosomatídeos, inclusive daqueles com atividade enzimática que poderiam desempenhar importante função na interação parasito-hospedeiro e na patogenia da doença (OMS 1965).

A participação de enzimas proteolíticas no mecanismo patogênico da Moléstia de Chagas é possível, uma vez que elas são mediadoras de importantes processos biológicos, incluindo a relação parasito-hospedeiro.

Dentre os processos biológicos, a regulação do "turn-over" proteico é uma função das proteases, pela qual muitas proteínas são continuamente eliminadas ou transformadas como um processo de maturação celular através da incorporação de amino-ácidos ou eliminação do material protéico catabolizado (Pine 1972). Além disso têm a função de destruir proteínas anormais ou não funcionais, como verifica

do em Escherichia coli em que proteínas de estrutura anormal são destruídas seletivamente (Pine 1967). Este processo parece aumentar à medida que ocorre o envelhecimento biológico (Holliday 1969).

Também as proteases, através do processo de proteólise limitada ativam ou inativam numerosos sistemas biológicos como por exemplo, a conversão da proinsulina em insulina (Kemmler e Steiner 1970) , sendo importantes fatores na manutenção da homeostase do organismo.

A produção de proteases pelos microrganismos pode facilitar sua implantação, multiplicação e difusão, fugindo aos mecanismos de defesa do hospedeiro. No caso dos vírus da pólio (Jacobson et al 1970), da influenza (Etchison et al 1971) e da vaccinia (Katz et al 1970) as proteases celulares, cuja síntese foi induzida pelo genoma viral, seriam necessárias na maturação do capsídeo pelo processo de proteólise limitada, bem como na liberação do genoma viral. A liberação de proteases por Clostridium hystoliticum e Clostridium perfringens, agentes causadores da gangrena gasosa, auxilia na disseminação da infecção (Maclean 1962). Certos microrganismos de importância em doenças humanas como Neisseria gonorrhoeae, N. meningitidis e Streptococcus sanguis, liberam enzimas proteolíticas que são altamente específicas para a IgA humana, podendo interferir na defesa mediada por anticorpos desta classe de imunoglobulinas, como demonstrado in vitro (Plaut 1975; Genco et al 1975; Plaut 1978). A secreção extracelular de proteases com atividade elastase por Pseudomonas aeruginosa tem sido relacionada com a patogenia da doença causada por este microrganismo (Johnson et al 1967; Miller et al 1978; Suell et al 1978). No T. cruzi as enzimas proteolíticas poderiam estar envolvidas na penetração ativa em célula hospedeira (Dvorak e Hyde 1973) e seriam também responsáveis pela migração através dos tecidos à semelhança de outros microrganismos (von Brand 1973). Metazoários como Schistosoma mansoni, cu-

ja cercária penetra na pele do hospedeiro, possivelmente o faz por ação de enzimas proteolíticas (Dresden e Asch 1972; Stirewalt 1978).

Por outro lado, no hospedeiro, as proteases podem participar da defesa antimicrobiana, como ocorre no pulmão onde macrófagos secretando um grupo de proteases neutras como ativadores do plasminogênio, collagenase e elastase, podem combater a invasão do microóbio (Gordon 1977).

Entretanto, um processo inflamatório pode ser desencadeado por ação das proteases das próprias células do hospedeiro. Assim, proteases neutras secretadas por macrófagos estimulados poderiam degradar a proteína básica na mielina, podendo ser este um mecanismo de desmielinização inflamatória (Cammer et al 1970).

Como as proteases são mediadoras de importantes processos biológicos, um mecanismo controle da proteólise deve estar envolvido para limitar sua ação de acordo com a necessidade biológica. Segundo Heimburger (1975), o mecanismo controle pode ser sumarizado como segue: a) as proteases encontram-se na forma de precursores inativos; b) os ativadores encontram-se em compartimentos diferentes sendo liberados à medida em que houver a necessidade biológica; c) a ativação ocorre localmente e é controlada por inibidores que estão presentes, não só no plasma, mas também nas mucosas dos tratos respiratório e gastrointestinal. A deficiência desses inibidores parece ser um importante fator predisponente a doenças infecciosas (Sasaki et al 1974) bem como à doença pulmonar obstrutiva crônica originada pela destruição do septo alveolar pelas proteases de granulócitos, macrófagos e das próprias bactérias presentes no pulmão (Erikson 1964; 1978; Talamo et al 1966; 1972; Williams e Fajard 1974).

A possível participação de enzimas proteolíticas na Tripanosomia se sul-americana só pode ser investigada após o seu isolamento e caracterização. A presença de atividade proteolítica em extrato bruto

de epimastigotas de T.cruzi foi inicialmente detectada por Gonçalves et al (1958). Repka et al (1972) verificaram atividade proteolítica de extrato de epimastigotas em hemoglobina em pH 3,0 e pH 7,0. Itow e Camargo (1977) identificaram em extratos de formas de cultura de T.cruzi atividade proteolítica semelhante à da tripsina, de aminopeptidases e da quimotripsina, empregando substratos sintéticos; verificaram também a presença de atividade proteolítica sobre a azocaseína que é um substrato inespecífico. Rangel et al (1976; 1977) e Araújo (1979) demonstraram independência entre a proteinase que atua em caseína a pH 7,0 e as enzimas que agem sobre substratos sintéticos. Bongertz e Hungerer (1978) utilizando extratos de epimastigotas da cepa DL e tripomastigotas da cepa Brasil isolaram e caracterizaram bioquimicamente uma protease com peso molecular 200.000, que não é afetada por EDTA, Ca ou Mg; é inibida por reagente para grupos sulfidrílicos como a iodoacetamida, e também por TLCK ("alfa-N-tosil-L-lysil-chloromethyl ketone"). Esta enzima é inativa quando sob a forma oxidada sendo reativada por agentes redutores como 2-mercaptoetanol. Araújo (1979) isolou dos lisados de epimastigotas de T.cruzi da cepa Y uma proteinase com peso molecular 60.000, tendo uma atividade aparentemente SH- dependente pois aumenta em presença de 2-mercaptoetanol e é inibida pela iodoacetamida. O EDTA aumenta sua atividade e os inibidores de esterase como TLCK, TPCK e DFP não têm ação sobre esta enzima.

No presente trabalho procurou-se verificar se esta proteinase está presente nas formas tripomastigotas e amastigotas originadas do hospedeiro vertebrado infectado por diferentes cepas de T.cruzi. Empregaram-se para este fim as técnicas de imunofluorescência e de imunoperoxidase, com o imunossoro produzido em coelhos imunizados com a proteinase isolada de extratos de epimastigotas de T.cruzi - cepa Y.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas do parasito - A cepa Y de T. cruzi (Silva e Nussensweig 1953) foi fornecida pelo Dr. Z. Brener, da Universidade de Minas Gerais e foi mantida em cultura em meio LIT ("liver infusion tryptose") (Fernandes e Castellani 1966) a 28°C com repiques semanais. As cepas CL, Colombiana, Peruana e Argentina foram fornecidas pelo Dr. G. Chaia, do Instituto de Pesquisas Johnson e Johnson - Doenças en dêmicas, Campinas, SP - sendo mantidas por passagem seriada em camundongos Swiss.

Fração solúvel (FS) do extrato bruto de epimastigotas - Epimastigotas da cepa Y de T. cruzi cultivados em meio LIT foram processados para a obtenção do pó delipidado e extração posterior da FS (Araújo 1979) que foi mantida a -20°C até o momento de usar.

Reagentes - Os seguintes reagentes foram empregados: 2-Mercaptoetanol, Cisteína, N-Benzoil-DL-arginina-2-naftil amida (BANA), N-Acetil-DL-fenilalanina-2-naftil éster (AFNE), Benzoil-L-tirosina-etil éster (BTEE), Ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB), "Fast Garnet Salt", da Sigma Chemical Co.; Tris (hidroximetil) aminometano (TRIS), Dimetil sulfoxido (DMSO), Dimetil formamida, da Fisher Scientific Laboratories; Sephadex G-200, Sephadex G-25, Sepharose 4B, "Blue Dextran", da Pharmacia Uppsala; p-aminofenil mercuriacetato (pAPMA) preparado no Departamento de acordo com o método de Dimroth (1902); Etileno-diamino-tetracetato (EDTA), Ácido iodoacético, Glutaraldeído, da Merk; Peroxidase - grau II, da Berhinger.

Proteínas - Foram empregadas a Caseína e a Ovalbumina (OVA), da Sigma Chemical Co.; Soro albumina bovina (BSA), da Pentex Biochemicals. A imunoglobulina G (IgG) de coelho foi preparada pela Dra. Julia K. Sakurada, de acordo com recomendações de Kabat e Mayer (1961), e quando testada por imunoeletroforese simples com o imune soro pluriespecífico apresentou apenas uma linha de precipitação.

Dosagem de Proteínas e de Polissacarídeos - A concentração protéica das diversas frações foi determinada pelo método de Lowry et al (1951) ou pela medida da absorção ultravioleta no comprimento de onda de 280 nm, em espectrofotômetro PMQ-II, Zeiss. A concentração de polissacarídeos foi determinada pelo método descrito por Dubois et al (1956).

Atividade enzimática - Ensaios de atividade proteásica foram feitos pelo método de Anson (1938) modificado por Araújo (1979) conforme a seguir descrito. Alíquotas da enzima foram misturadas com o substrato (caseína 6,0 mg/ml), dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,0, acrescentando-se a seguir uma solução ativadora contendo / 2-Mercaptoetanol 15 mM e EDTA 5 mM. Depois da incubação da mistura a 37°C durante 2 hs, adicionou-se ácido tricloroacético (TCA) 5%. O tubo branco da reação foi preparado adicionando-se os reagentes na seguinte ordem: TCA 5%, a enzima, o substrato e a solução ativadora. As misturas foram incubadas a 45°C por 15 min e centrifugadas a 1085 g por 30 min; fizeram-se em seguida leituras espectrofotométricas dos sobrenadantes a 280 nm. A atividade enzimática foi expressa como a diferença de absorbância entre os tubos branco e reação. Considerou-se uma unidade a quantidade de enzima que produz 0,100 de absorbância em $\lambda=280$ nm após 2 hs de reação.

A atividade caseinolítica bem como as atividades amidásica e esterásica em placas de gel foram detectadas utilizando-se como substratos caseína, BANA e APNE, de acordo com recomendações de Uriel (1971).

A verificação da atividade enzimática sobre BTEE foi feita empregando-se o método de Hummel (1959). O substrato (BTEE) foi utilizado na concentração de 0,00107 M dissolvido em metanol 50% (p/p), sendo a reação realizada em TRIS 0,08 M, pH 7,8 a 25°C.

Obtenção da proteinase - Os métodos abaixo indicados foram usados para a obtenção da enzima com atividade caseinolítica, conforme re-

comendações de Araújo (1979) a seguir descritas.

1) Precipitação com acetona - A FS mantida a 0°C foi acertada a pH 4,5 por adição de HCl 0,1 N. O precipitado foi separado por centrifugação a 4.810 g por 20 min, e o sobrenadante transferido para um banho a -20°C. Adicionou-se a ele lentamente e com agitação constante, um volume 4 vezes maior de acetona. A mistura foi mantida a -20°C por 18 hs e centrifugada a 4.810 g por 20 min a -15°C. O precipitado foi ressuspenso em solução de NaCl 0,15 M gelada, dialisado em água destilada por 18 hs, e em seguida em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 por 3 hs. Este material / foi centrifugado a 4.810 g por 20 min sendo o sobrenadante denominado FS-p, concentrado por ultrafiltração em Amicon e submetido à cromatografia de gel filtração, ou guardado a -20°C até o momento de usar.

2) Cromatografia de gel filtração - A análise da FS-p foi feita por cromatografia de gel filtração em Sephadex G-200, seguindo-se as recomendações de Flodin (1962). Amostras de 5 ml contendo 65 mg de proteína foram analisadas empregando-se uma coluna 100x2 cm, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 a 4°C. O fluxo da coluna foi de 10 ml/h e as alíquotas coletadas foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda 280 nm.

Padrões de referência de "Blue Dextran", IgG (150.000) de coelho, BSA (66.000) e OVA (45.000) foram passados nesta coluna nas mesmas condições, para a determinação do volume de eluição, com a finalidade de se estimar o peso molecular (Andrews 1965; Flodin 1962) da proteinase.

3) Cromatografia de afinidade - A Sepharose 4B foi ativada e acoplada com PAPMA de acordo com o método de Sluyterman e Wijdenes (1970). A fração do Sephadex G-200 que continha atividade caseinolítica foi inicialmente dialisada durante a noite em tampão

acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 contendo sulfito de sódio 10 mM, KCl 0,1 M, EDTA 1 mM e DMSO 10%. Em seguida foi aplicada a uma coluna 5x1 cm de Sepharose mercurial previamente equilibrada com este tampão. A eluição foi feita com o mesmo tampão com fluxo de 20 ml/h, coletando-se amostras de 1 ml e fazendo-se a leitura da absorbância em 280 nm. O material adsorvido foi eluído usando-se tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 contendo 2-Mercaptoetanol 15 mM.

Imunossoros - A fração da FS-p isolada por gel filtração e denominada F3, foi inoculada com adjuvante completo de Freund em coelhos por via intradérmica em vários pontos do dorso. A dose injetada foi de 200 μ l por coelho. Após um mês, inoculou-se a segunda dose nas mesmas condições, e três meses após a primeira dose, os coelhos foram sangrados sendo o soro liofilizado e estocado a -20°C; antes de usar, foi aquecido a 56°C por 30 min.

Os imunossoros de coelho anti-FS e anti-F3.2 foram fornecidos pelo Dr. P.M.F. de Araújo, e o imunossoro de carneiro anti - IgG de coelho pela Dra. Julia K. Sakurada, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

A imunoglobulina G de carneiro anti-IgG de coelho foi purificada pelo Dr. I.J.B. Camargo, pela passagem do soro imune de carneiro em coluna de imunoadsorvente contendo IgG de coelho, conforme recomendações de Avrameas (1969).

Eletroforese e Testes de Imunodifusão - A eletroforese foi realizada a 4°C empregando-se agarose a 1% em tampão veronal 0,05 M, pH 8,6; a voltagem aplicada foi a correspondente a 6 volts por cm, por 60 min. Os testes de imunodifusão foram feitos de acordo com Ouchterlony (1958) e a metodologia empregada para a imuno-eletroforese simples foi segundo Grabar e Williams (1953). Experimentos empregando-se a imuno-eletroforese cruzada foram realizados / de acordo com a metodologia de Clarke e Freeman (1968), utilizan

do-se lâminas 4,5x4,5 cm contendo agarose 1% em tampão veronal 0,05 M, pH 8,6, e empregando-se uma voltagem de 6 volts por cm na primeira dimensão e 3 volts por cm por 3 hs na segunda dimensão.

Para a determinação das condições de inibição da atividade enzimática em caseína realizou-se o seguinte procedimento: a cada uma das soluções de ácido iodoacético nas concentrações de 50 mM, 20 mM, 10 mM e 5 mM foi adicionada a FS (0,5 mg/ml) na proporção 1/10, incubando-se estas misturas à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida realizou-se eletroforese em gel de agarose revelando-se as proteínas e a atividade caseinolítica.

Reações de aglutinação e de inibição da aglutinação - As reações de aglutinação e de inibição da aglutinação foram realizadas conforme procedimento de Repka et al (1980) a seguir descritas. As suspensões de epimastigotas empregadas foram diluídas a 3×10^6 parasitos/ml. As reações de aglutinação foram realizadas misturando-se igual volume do imunossoro diluído, diluente e suspensão de parasito. O diluente usado foi TRIS 0,05 M, pH 7,2 contendo NaCl 0,1 M e glicose 0,5%. A mistura foi incubada à temperatura ambiente em câmara úmida por uma hora, e examinada ao microscópio Zeiss.

Para a realização dos testes de inibição da aglutinação, quantidade variável de antígeno foi misturada com diluições seriadas de imunossoro, incubando-se a seguir à temperatura ambiente por uma hora. Estas misturas foram empregadas como indicado acima para as reações de aglutinação. Misturas controles contendo suspensão de parasitos e salina tamponada, ou fração antigênica, ou imunossoro, foram feitas paralelamente.

Conjugados - O conjugado isotiocianato de fluoresceína-imunoglobulina G de carneiro anti-IgG de coelho foi cedido por Ana Maria Guaraldo (Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNUCAMP). A determinação da relação F/P foi feita pelo método de McKinney et al (1964) e o valor obtido foi 1,8. Este reagente foi

empregado nas nossas experiências nas diluições 1/40 e 1/80.

O conjugado peroxidase-imunoglobulina G de carneiro anti-IgG de coelho foi preparado segundo procedimento de Avrameas e Ternink (1971) a seguir descrito. À IgG de carneiro anti-IgG de coelho na concentração de 5,2 mg/ml, adicionou-se peroxidase na concentração de 10 mg em 0,2 ml de glutaraldeído 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,8. Deixou-se esta mistura durante 18 a 20 hs à temperatura ambiente, resguardada da luz e em seguida passou-se em coluna de gel filtração de Sephadex G-25. Este reagente foi previamente /titulado e empregado na diluição 1/10.

Reações imunocitoquímicas - As recomendações de Johnson et al (1978) foram seguidas para realizar reações de imunofluorescência e imunoperoxidase em secções de tecido. Os procedimentos de Camargo (1966) e de Ferreira et al (1971) foram empregados ao utilizar-se epimastigotas e tripomastigotas como antígeno. Os soros utilizados nestas reações foram previamente absorvidos com hemácias, células esplênicas e macerado de tecido cardíaco de camundongos normais. Para as reações de inibição empregou-se o imunossoro diluído 1/5 previamente incubado (v/v) com o antígeno na concentração protéica de 1,0 mg/ml, durante uma hora a 4°C.

Como controle do processo inflamatório, empregaram-se fragmentos de coração de camundongos Swiss que apresentavam miocardite aguda causada por Streptococcus β - hemolítico. Estes animais foram gentilmente cedidos pelo Dr. Marcelo Barcinski, da UFRJ.

1) Preparação das formas tripomastigotas, epimastigotas e das secções de coração - As formas tripomastigotas foram obtidas do sangue circulante de camundongos conforme procedimento de Krettli (1978) a seguir descrito. Parasitos da cepa Y, em número de 12×10^4 , foram reinoculados intraperitonalmente em camundongos Swiss, que foram sangrados no pico da parasitemia. O sangue foi coletado em heparina (10 UI/ml) e centrifugado a 1.080 g por 10 min, deixando

do-se em repouso à temperatura ambiente durante uma hora. Coletou-se a seguir o plasma e centrifugou-se a 1.080 g por 10 min, sendo o "pellet" de tripomastigotas lavado 2 vezes em PBS. A seguir fez-se a fixação em formol 0,1% à temperatura ambiente por 15 min. As formas epimastigotas obtidas de cultura foram fixadas em formol 1% à temperatura ambiente por 15 min. A seguir, as suspensões foram distribuídas em lâminas, sendo o número de parasitos ajustado para 20 a 30 por campo, observando-se com objetiva 40x.

As reações com amastigotas foram realizadas em secções de coração de camundongos na fase aguda da infecção. Camundongos Swiss infectados com parasitos das cepas Y, CL, Colombiana, Peruana e Argentina, foram sacrificados, sendo os fragmentos de coração envolvidos em cápsulas de alumínio e fixados em nitrogênio líquido por 10 min; em seguida foram cortados em criostato ("American Optical Co. Microtome") a -20°C , em secções de 6 micrômetros de espessura, coletadas em lâminas de microscopia e fixadas em acetona gelada por 5 seg. O mesmo procedimento foi seguido para a obtenção das secções de corações normais e de corações que apresentavam miocardite aguda causada por Streptococcus β - hemolítico.

2) Reações de imunofluorescência e imunoperoxidase - Lâminas / contendo as formas epimastigotas e tripomastigotas, e as secções de coração foram lavadas com PBS, recobertas com o imunossoro de coelho anti-F3 nas diluições de 1/20 a 1/320, e incubadas a 37°C por 30 min em câmara úmida. Depois de lavadas 2 vezes durante 10 min em PBS, foram recobertas com o conjugado (isotiocianato de fluoresceína-imunoglobulina G de carneiro anti-IgG de coelho e peroxidase-imunoglobulina G de carneiro anti-IgG de coelho) nas diluições apropriadas e incubadas a 37°C por 30 min em câmara úmida. As reações de imunoperoxidase foram a seguir reveladas pela diaminobenzidina conforme recomendações de Grahan e Karnovsky (1966). A seguir as reações foram observadas ao microscópio Zeiss, equipado

com câmara fotográfica, com luz comum e luz ultravioleta. Após fotografar as reações de imunofluorescência das secções de tecido, estas foram coradas com Giemsa 25% em PBS 1% e a mesma localização fluorescente foi fotografada em microscópio de luz comum. As fotografias em branco e preto foram realizadas com filme Kodak plus X pan 125 ASA.

Microscopia eletrônica de cortes de coração de camundongos infectados - Cortes de coração de camundongos infectados foram preparados para a microscopia eletrônica segundo recomendações de Nakane (1975) a seguir descritas. Fragmentos de coração foram fixados em solução a 2% de paraformaldeído durante 10 hs a 4°C, sendo depois transferidos para uma solução a 10% de sacarose em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4 durante a noite. Em seguida, os fragmentos foram imersos por períodos de 4 hs em uma solução a 20% de sacarose e a 40% de sacarose no mesmo tampão. Depois de transferidos para uma solução a 80% de sacarose e 10% de glicerol em tampão fosfato, os fragmentos foram armazenados a -70°C por 4 dias. Secções de 10 a 15 micrômetros de espessura foram feitas em criostato a -20°C e colhidas em lâminas de microscópio. Estas secções após a realização das reações de imunoperoxidase, conforme procedimento já descrito, foram fixadas em glutaraldeído 2,5% por 4 hs e em tetróxido de ósmio (OsO_4) 1%. Em seguida foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, incluídas em resina de Epon-Araldite, cortadas em ultramicrotomo (Porter-Blum MT II) e examinadas, sem coloração ulterior, em microscópio eletrônico Zeiss.

RESULTADOS

1. Obtenção da proteinase

Para a obtenção da proteinase utilizou-se a fração solúvel (FS) apresentando uma concentração protéica de 0,5 mg/ml, que possuía componentes com atividade enzimática sobre substratos caseína, AFNE e BANA, tendo estes componentes mobilidade eletroforética semelhante. A atividade casinolítica era totalmente inibida pelo ácido iodoacético a partir da concentração de 1 mM. Esta fração precipitada com acetona e concentrada de modo a ter 11,60 mg/ml foi submetida à cromatografia de gel filtração de Sephadex G-200 isolando-se 5 frações conforme indicado na figura 1.

A fração F3 foi a que apresentou a maior parte da atividade caseinolítica, conforme mostrado na figura 1, e a estimativa do peso molecular da proteinase feito com base no volume de exclusão em Sephadex G-200 foi de 77.600. Quando a fração F3 foi submetida à cromatografia de afinidade em Sepharose mercurial obtiveram-se duas frações: a F3.1 com alto teor protéico e baixa atividade caseinolítica, e a F3.2 com mais baixo teor protéico e mais alta atividade caseinolítica.

A fração F3.2 possuía 2.060 unidades totais de atividade enzimática, quando testada em caseína (6,0 mg/ml) em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 sob ação de 2-Mercaptoetanol 15 mM e EDTA 5 mM; a atividade específica (unidades/mg) era de 700,7 e o grau de purificação 23 vezes; possuía concentração protéica de 0,14 mg/ml e não apresentava polissacarídeos na sua constituição. A análise eletroforética da F3.2 mostrou que ela era constituída por um componente com atividade caseinolítica, o qual tinha a mesma posição relativa da atividade enzimática correspondente da FS. Não apresentava atividade enzimática em AFNE, em BANA e em BTEE. A imunoeletroforese simples desta fração utilizando-se o imunossoro pluriespecífico anti-

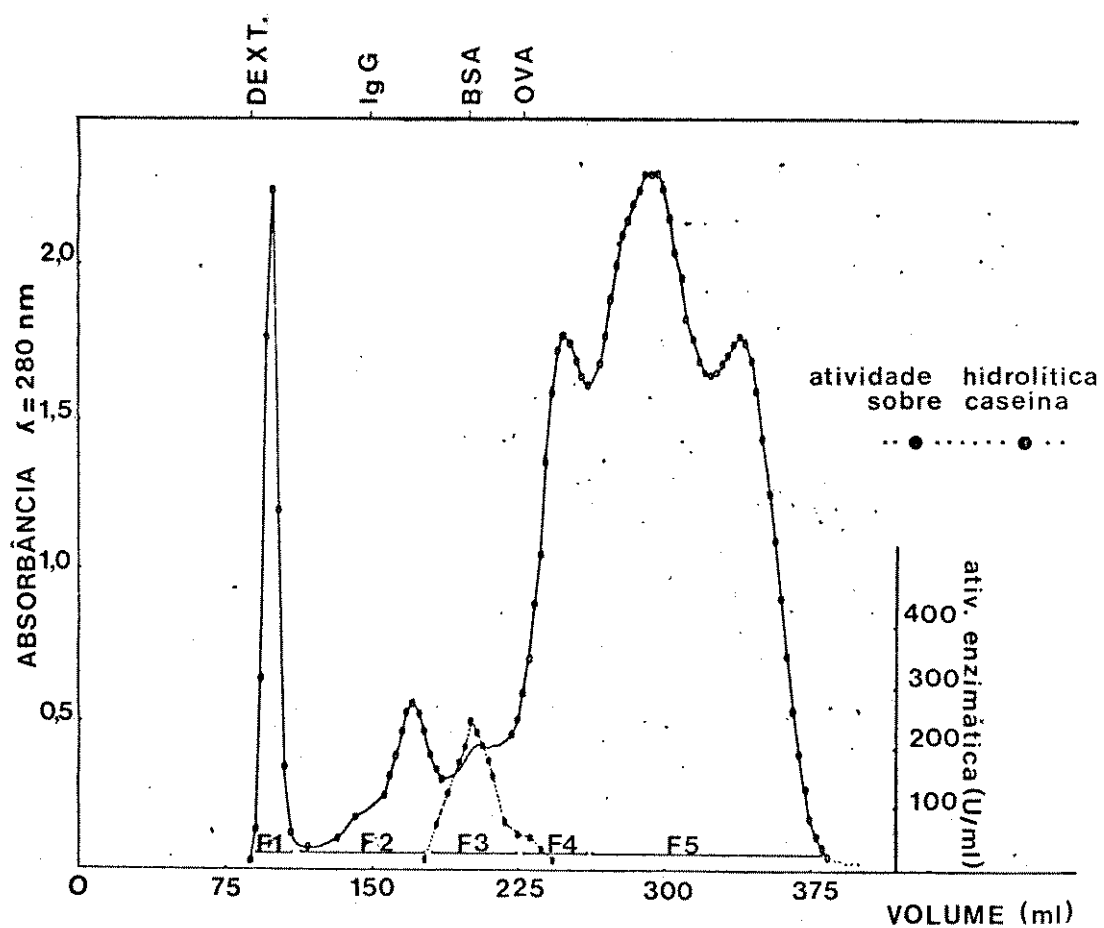


Figura 1 - Cromatografia em Sephadex-G-200 da FS-p.

FS revelou apenas um sistema precipitante que tinha atividade caseinolítica; por outro lado, a fração F3.1 era constituída de pelo menos três componentes.

Assim, tendo resultados concordes com os já obtidos (Araújo 1979), e estando a F3.2 relativamente purificada empregamos esta fração para inibir as reações de aglutinação de epimastigotas e as reações imunocitoquímicas, a fim de demonstrar a importância da participação da proteinase nestas reações.

2. Especificidade do imunossoro anti-F3

A fração F3 empregada na imunização de coelhos possuía atividade específica (unidades/mg) de 147,0 e a concentração protéica de 1,87 mg/ml. Os imunossoros produzidos apresentaram um título de anticorpos precipitantes de 1/32 quando testados (v/v) contra 500 μ /ml de F3 pela técnica de imunodifusão de Ouchterlony (1958).

Estes imunossoros foram empregados na imunoeletroforese cruzada da FS, identificando-se 4 sistemas precipitantes sendo o mais evidente aquele com atividade caseinolítica. Não se observou anticorpos contra o componente com atividade em BANA. Esta mesma técnica aplicada à fração F3.2 revelou os mesmos 4 sistemas precipitantes. Resultado semelhante obteve-se empregando-se o imunossoro anti-F3.2.

Os testes controles das reações imunoenzimáticas para a verificação da presença nos imunossoros de componentes naturais com atividade enzimática em caseína, em AFNE e em BANA foram negativos.

As reações de aglutinação e de inibição da aglutinação das formas epimastigotas foram realizadas afim de se verificar a presença ou não da proteinase na superfície do parasito. O imunossoro anti-F3 apresentou títulos aglutinantes entre 1/120 e 1/480, enquanto que o soro normal, título de 1/15. Estas reações foram ini

bidas com a F3.2 na concentração de 66,7 μ /ml, estando o imunessoro diluído 1/30.

As reações de imunofluorescência e imunoperoxidase (figura 2) com as formas epimastigotas foram positivas, utilizando-se o imunessoro até a diluição 1/80. Estas reações foram inibidas quando a fração F3.2 era previamente misturada ao imunessoro diluído 1/5.

3. Detecção da proteinase nas formas tripomastigotas e anastigotas, empregando-se o imunessoro anti-F3, pelas reações imunocito químicas

As reações de imunofluorescência e imunoperoxidase com as formas tripomastigotas foram positivas utilizando-se o imunessoro diluído até 1/80 (figura 3), sendo completamente inibidas com F3.2.

As reações de imunofluorescência (figura 4a) e imunoperoxidase (figura 5a) foram também positivas quando o imunessoro foi testado em secções de coração de camundongos infectados, com as cepas Y, CL, Colombiana, Peruana e Argentina, do T.cruzi. A presença de amastigotas no sítio das reações de imunofluorescência positiva foi sempre demonstrada por posterior coloração com Giemsa da mesma secção de tecido (figura 4b). Estas reações foram positivas até o título de 1/160 do imunessoro anti-F3. Este imunessoro diluído (v/v) com F3.2 (250 μ /ml) não apresentou reação positiva a partir da diluição 1/20. Nenhuma reação foi observada com secções de coração de camundongos normais, ou utilizando-se soro normal diluído 1/20 (figura 5b) quando testado com secções de coração de camundongos infectados. Como controle do processo inflamatório agudo, utilizou-se secções de coração de camundongos que apresentavam miocardite aguda causada por Streptococcus β -hemolítico, sendo as reações com o imunessoro anti-F3 negativas.

Em secções ultrafinas de coração de camundongos infectados, incubadas com o imunessoro e submetidas às reações de imunoperoxida-



Figura 2 - Formas epimastigotas de T. cruzi marcadas por imunoperoxidase, empregando-se o imunessoro anti-F3 diluído 1/40. xl.560

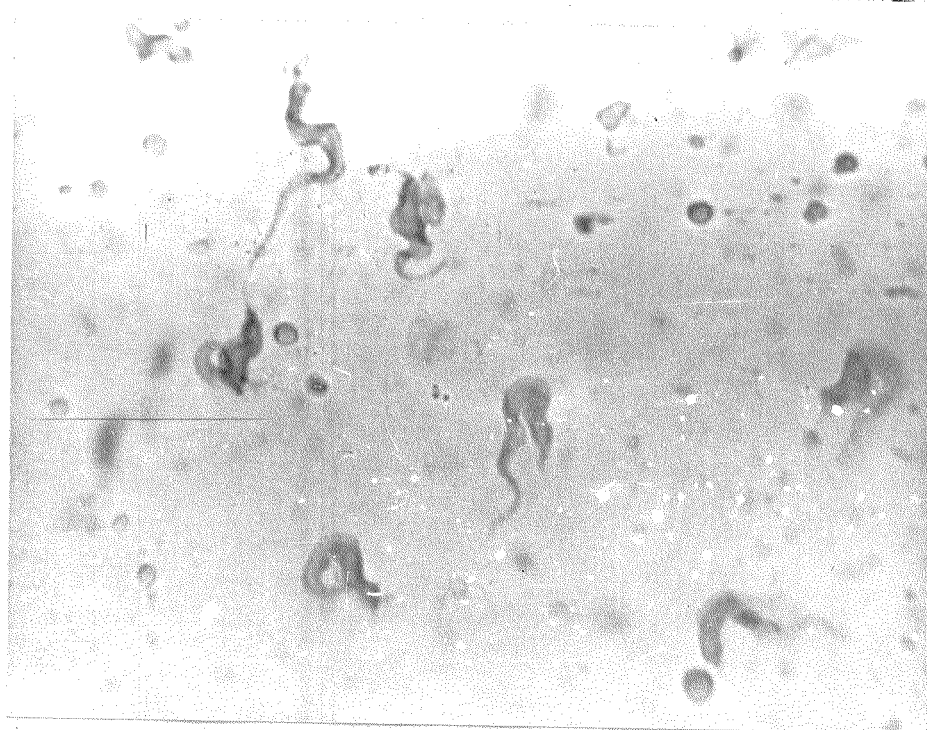


Figura 3 - Formas tripomastigotas de T. cruzi marcadas por imunoperoxidase, empregando-se o imunessoro anti-F3 diluído 1/80. xl.560

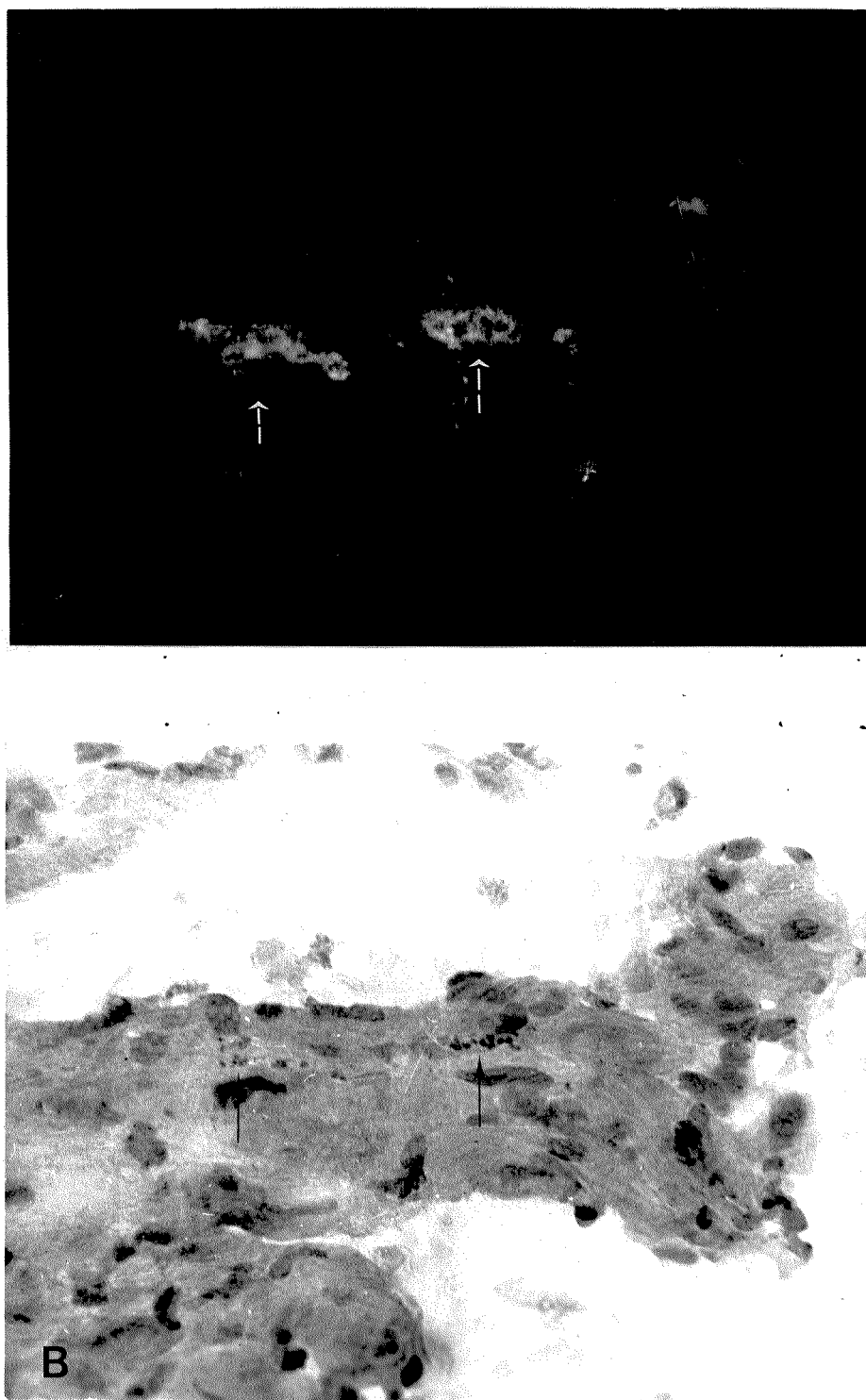


Figura 4 - A) Tecido cardíaco com ninhos de formas anastigotas (seta) de T. cruzi marcadas por imunofluorescência, em pregando-se o imunossoro anti-F3 diluído 1/40. B) O mesmo corte de tecido corado por Giemsa examinado em microscopia de luz comum. x960

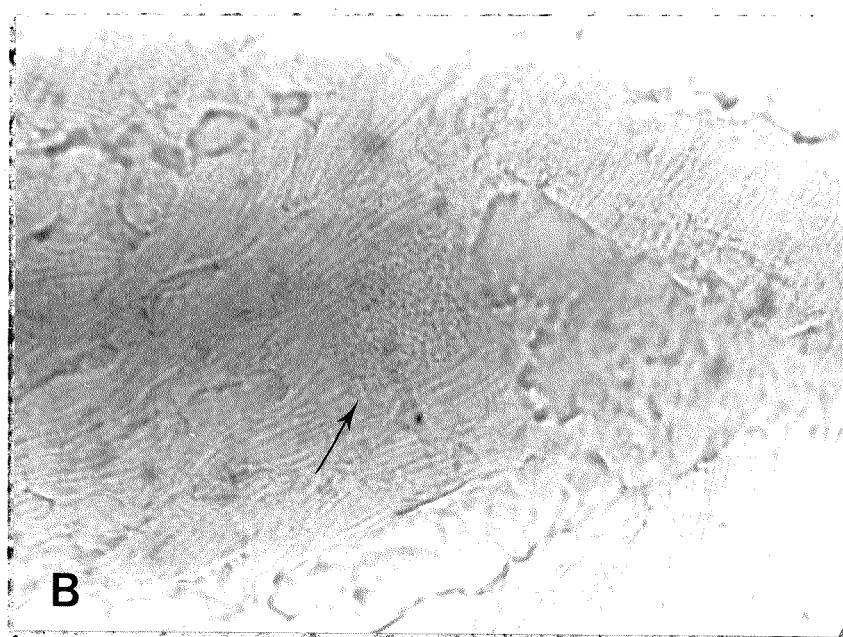
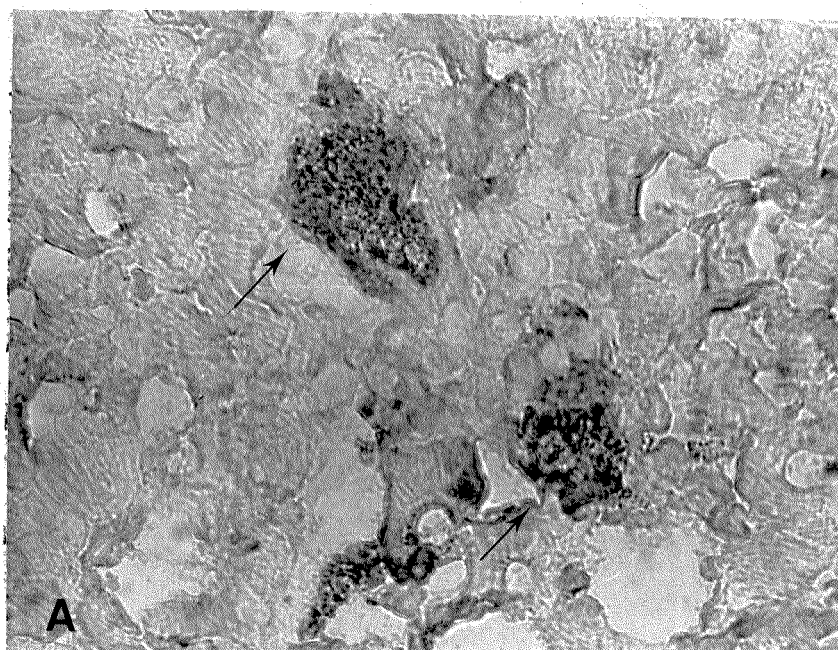


Figura 5 - A) Tecido cardíaco com ninhos de formas amastigotas de T. cruzi marcadas por imunoperoxidase, empregando-se o imunossoro anti-F3 diluído 1/40. B) Reação negativa com o soro normal diluído 1/20. x960

se, observou-se que, na maioria das vezes, havia perda da estrutura normal da musculatura cardíaca na proximidade dos amastigotas, com destruição do tecido. No parasito a reação de imunoperoxidase/ foi positiva especialmente na membrana citoplasmática, apresentando em algumas áreas uma distribuição granular (figura 6a). Em várias secções de tecido foram encontradas reações positivas no tecido destruído. Estas reações foram negativas quando se empregou soro normal de coelho (figura 6b).

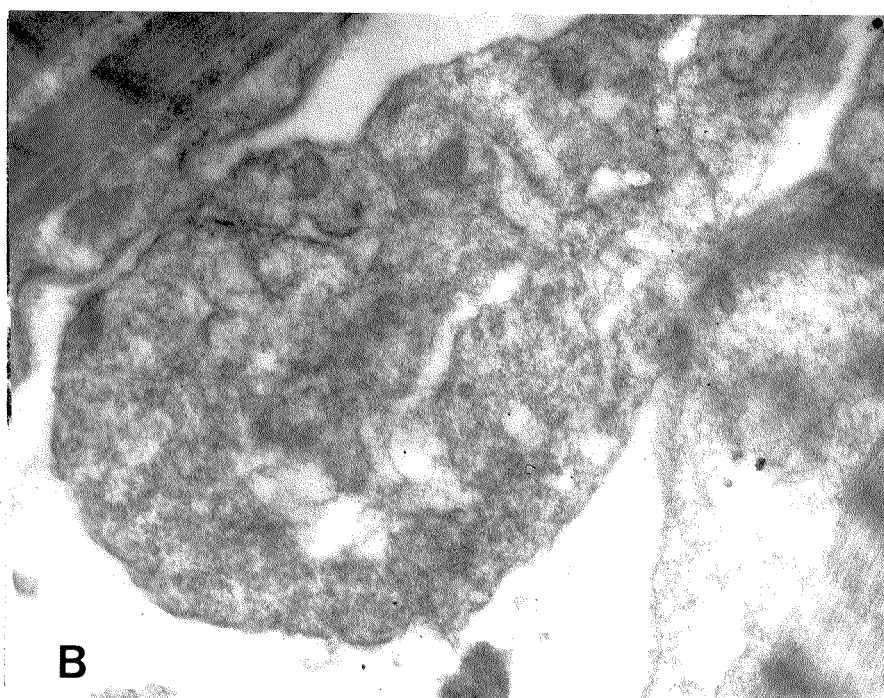
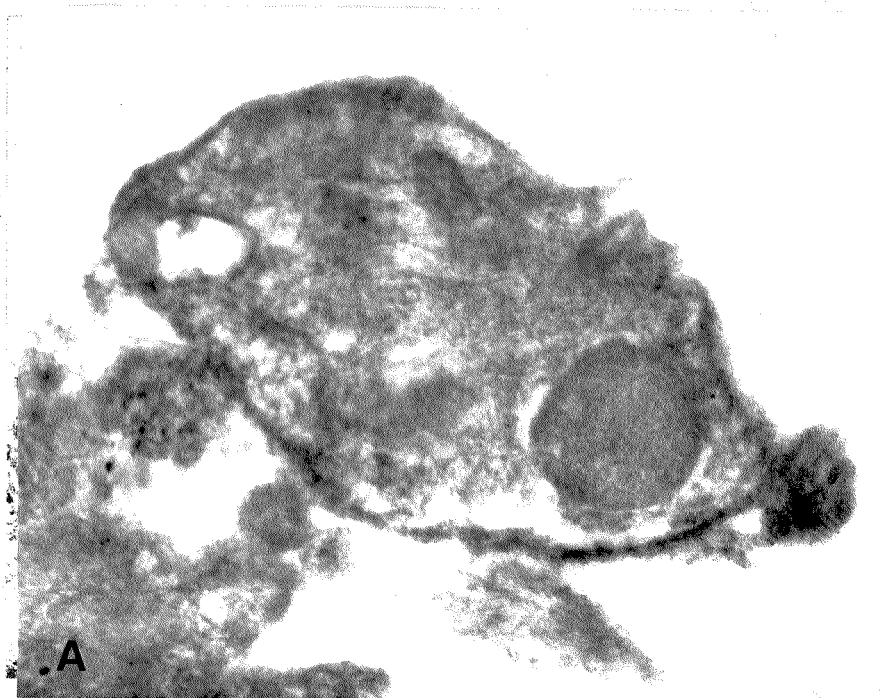


Figura 6 - A) Micrografia eletrônica de uma forma amastigota de T. cruzi, em tecido cardíaco, marcada por imunoperoxidase, empregando-se o imunossoro anti-F3 diluído 1/40. B) Forma amastigota em reação de imunoperoxidase negativa. x42.000

DISCUSSÃO

O isolamento de uma proteinase nas formas epimastigotas de T. cruzi e posterior verificação de sua presença nas formas tripomastigotas e amastigotas sugerem uma participação dessa enzima nos processos biológicos do parasito, no seu relacionamento com o hospeiro ou na patogenia da Moléstia de Chagas. Nesse sentido, esta enzima pode ter uma função no metabolismo do parasito pois que ele é capaz de obter energia das proteínas (von Brand et al 1949) e necessita dessas substâncias para seu crescimento e diferenciação, como tem sido verificado com as formas de cultura (O'Dally 1975; 1976); por outro lado, a ação da proteinase poderia auxiliar na transposição do parasito através da pele e mucosas, à semelhança das cercárias de S. mansoni (Dresden e Asch 1972; Stirewalt 1977), na migração através dos tecidos como ocorre com outros organismos (von Brand 1973), na penetração ativa na célula pelo T. cruzi (Pereira da Silva 1959; Dvorak e Hyde 1973), ou poderia estar diretamente implicada na lesão de neurônios (Tafuri 1970).

Bongertz e Hungerer (1978) isolaram e caracterizaram bioquimicamente uma protease semelhante das formas epimastigotas da cepa D1 e das formas tripomastigotas da cepa Brasil. Entretanto as características desta protease são diferentes daquela por nós empregada como já discutido por Araújo (1979); por outro lado, utilizamos uma metodologia e cepa de parasito diferentes. Vários autores (Snary e Hudson 1979; Fruit et al 1978; Repka et al 1980) verificaram que um componente da superfície celular de natureza glicoprotéica está presente nas diferentes formas do ciclo evolutivo e em várias cepas do T. cruzi; entretanto não fazem referência à enzima proteolítica por nós empregada.

A proteinase (F3.2) que obtivemos das formas epimastigotas da cepa Y apresentou características semelhantes às aquelas descritas por

Araújo (1979), comprovadas pelos testes de verificação da atividade enzimática em caseína, em APNE, em BTBE e em BANA, de inibição da atividade caseinolítica pelo ácido iodoacético, da estimativa do peso molecular da proteinase em Sephadex- G-200 e da imunoeletroforese simples.

O imunossoro produzido contra a fração F3, contendo anticorpos dirigidos principalmente contra a proteinase, foi empregado nas reações imunocitoquímicas para revelar essa enzima nas diferentes formas evolutivas do T. cruzi bem como em diferentes cepas do parasito.

A proteinase (F3.2) purificada foi capaz de inibir as reações de aglutinação das formas epimastigotas e as reações de imunofluorescência e de imunoperoxidase das diferentes formas do ciclo evolutivo do parasito e o imunossoro anti-F3. Estes resultados sugerem que a proteinase está presente nas formas tripomastigotas e amastigotas do T. cruzi. A proteinase (F3.2) inibiu também as reações imunocitoquímicas do imunossoro anti-F3 com as formas amastigotas das cepas CL, Colombiana, Peruana e Argentina, sugerindo a sua presença em outras cepas do parasito.

Estas reações eram específicas, pois foram negativas quando o imunossoro anti-F3 era testado em cortes de corações normais ou de corações que apresentavam miocardite aguda produzida por Streptococcus β - hemolítico; as reações controles do processo inflamatório agudo foram realizadas, pois proteases podem ser liberadas/no tecido por polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos e bactérias, como tem sido sugerido por Erikson (1978). E por sua vez, o soro normal de coelho diluído 1/20 não apresentou reação positiva quando testado com cortes de coração infectado, formas tripomastigotas e epimastigotas.

As reações de aglutinação permitem verificar a presença ou não de antígenos na superfície do parasito. O fato da proteinase

(F3.2) inibir especificamente as reações entre o imunossoro anti-F3 e as formas epimastigotas sugere que pelo menos parte desta enzima encontra-se na superfície do parasito. Entretanto, não se pode dizer se está aí localizada permanentemente, ou então se esta é uma situação intermediária entre a síntese intracelular e a secreção.

As reações de imunofluorescência em tecido cardíaco de camundongos infectados sugerem que a proteinase pode estar também no meio tecidual, pois a área fluorescente é maior do que aquela ocupada pelos amastigotas visualizados pela coloração com Giemsa. Com a finalidade de se estudar melhor a localização dessa enzima em tecido infectado, foram feitas as reações de imunoperoxidase. A observação em microscopia comum (aumento 960x) mostrou que esta reação imunoenzimática ocorreu em toda a área ocupada pelos amastigotas e não apenas em pontos correspondentes aos parasitos, vindo a corroborar com a observação feita em microscopia de fluorescência. Os tecidos infectados nos quais se realizou a reação de imunoperoxidase, quando observados em microscopia eletrônica, apresentaram amastigotas marcados especialmente na superfície, tendo a peroxidase em algumas áreas uma disposição granular. Observou-se, com certa frequência, uma perda da estrutura normal da musculatura cardíaca, com destruição do tecido. Algumas vezes se observou reação de imunoperoxidase positiva no meio tecidual destruído; é possível que durante o exaustivo processamento do tecido tenha ocorrido perda do antígeno. No entanto, mais estudos são necessários para se ter uma evidênciação mais segura da presença da proteinase no tecido, bem como para se conhecer o efeito dessa enzima no tecido infectado.

RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve por finalidade verificar se a proteínase isolada das formas epimastigotas de cultura, da cepa Y do T. cruzi, estava presente nas formas tripomastigotas do sangue circulante e nas formas amastigotas do tecido, no hospedeiro vertebrado.

A proteinase obtida do extrato bruto das formas epimastigotas apresentou características semelhantes às descritas por Araújo (1979).

O imunossoro anti-F3 produzido em coelhos revelou 4 sistemas precipitantes na F3, sendo que apenas um deles mostrou atividade caseinolítica.

As reações de aglutinação do imunossoro anti-F3 com as formas epimastigotas foram positivas, sendo inibidas pela fração F3.2, o que sugere a presença da proteinase na superfície do parasito.

As reações imunocitoquímicas de epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y, e de amastigotas das cepas Y, CL, Colombiana, Peruana e Argentina, de T. cruzi com o imunossoro anti-F3 foram positivas, sendo inibidas pela fração F3.2, sugerindo a presença da proteinase nas diferentes formas evolutivas e em outras cepas do T. cruzi.

Pela microscopia eletrônica das secções de coração de camundongos infectados, após a reação de imunoperoxidase, observou-se perda da estrutura normal da musculatura cardíaca na proximidade das formas amastigotas de T. cruzi, com destruição do tecido. A reação revelou-se positiva especialmente na superfície do parasito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, P. - The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.*, 96:595-606, 1964.
- ANSON, M.L. - The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22:79-89, 1938.
- ARAUJO, P.M.F. de - Isolamento e caracterização de uma proteinase dos lisados de Trypanosoma cruzi (Chagas 1909). Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP, S.Paulo, 1979.
- AVRAMEAS, S. and Ternink, T. - The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry*, 6:55-8, 1969.
- AVRAMEAS, S. and Ternink, T. - Peroxidase labeled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry*, 8:1175-9, 1971.
- BONGERTZ, V. and Hungerer, K.D. - Trypanosoma cruzi: Isolation and characterization of a protease. *Exp. Parasitol.*, 45:8-18, 1978.
- von BRAND et cols (1949) apud Pessôa, S.B. - *Parasitologia Médica* 8ª ed., Rio de Janeiro (RJ), Guanabara Koogan 1972, cap.16, p.218.
- von BRAND, T. (1973) apud Bongertz, V. and Hungerer, K.D. - Trypanosoma cruzi: Isolation and characterization of a protease. *Exp. Parasitol.*, 45:8-18, 1978.
- CAMARGO, M.E. - Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 8:227-34, 1966.
- CAMMER, W.; Bloom, B.R.; Norton, W.T. and Gordon, S. - Degradation of basic proteins in myelin by neutral proteases secreted by stimula-

- ted macrophages: a possible mechanism of inflammatory demyelination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1554-8, 1978.
- CHAGAS, C. - Nova tripanosomíase humana. Estudos sôbre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n.gen.sp., agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1:159-218, 1909.
- CLARKE, H.G.M. and Freeman, T. - Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins. Clin. Sci., 35:403-13, 1968.
- DIMROTH, O. - Weber die mercurirung aromatischer verbindungen. Ber. 35:2032-45, 1902.
- DRESDEN, M.H. and Asch, H.L. - Proteolytic enzymes in extracts of Schistosoma mansoni cercariae. Biochim. Biophys. Acta, 289:378-84, 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., 28:350-6, 1956.
- DVORAK, J.A. and Hyde, T.P. - Trypanosoma cruzi: Interaction with vertebrate cells in vitro. I. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. Exp. Parasitol., 34:268-83, 1973.
- ERIKSON, S. - Pulmonary emphysema and alfa-1-antitrypsin deficiency. Acta Med. Scand., 175:197-205, 1964.
- ERIKSON, S. - Proteases and Protease inhibitors in chronic obstructive lung disease. Acta Med. Scand., 203:449-55, 1978.
- ETCHISON, J.; Doyle, M.; Penhoet, E. and Holland, J. - Synthesis and cleavage of influenza virus proteins. J. Virol., 7:155-67, 1971.
- FERNANDES, J.F. and Castellani, O. - Growth characteristics and chemical composition of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasitol., 18:195-202, 1966.

- FERREIRA, A.W.; Camargo, M.E. and Nakahara, O.S. - Trypanosoma cruzi: Immunoperoxidase antibody test for serologic diagnosis. Exp. Parasitol., 37:131-7, 1975.
- FLODIN, P. - Dextran gels and their application in gel filtration. Pharmacia, Uppsala, Sweden. 85 p., 1962.
- FRUIT, J.; Afchain, D.; Petitprez, A. and Capron, A. - Trypanosoma cruzi: Localization of a specific antigen on the surface of blood stream trypomastigote and culture epimastigote forms. Exp. Parasitol., 45:183-9, 1978.
- GENCO, R.J.; Plaut, A.G. and Moellering, R.C. Jr. - Evaluation of human oral organisms and pathogenic streptococcus for production of IgA protease. J. Infect. Disease, 131(5):517-21, 1975.
- GONÇALVES, N.B.; Carmo, E.S. and Tavares, B.M., (1958), apud Bongertz, V. and Hungerer, K.D. - Trypanosoma cruzi: Isolation and characterization of a protease. Exp. Parasitol., 45:8-18, 1978.
- GORDON, S. - Macrophage neutral proteinases and defense of the lung. Fed. Proc., 36(13):2707-11, 1977.
- GRABAR, P. et Willians, C.A. Jr. - Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochemique d'un mélange de protéines: application au sérum sanguin. Biochim. Biophys. Acta., 10:193-4, 1953.
- GRAHAN, R.C. and Karnovsky, M.J. - The early stages of absorption / of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem., 14(4):291-302, 1966.
- HEIMBURGER, N. - Protease inhibitors of human plasma - their properties and control functions. (), ():367-86, (1975).
- HOLLYDAY, R. - Errors in protein synthesis and clonal senescence in fungi. Nature, 221:1224-8, 1969.

- 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*, Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag 1973, cap. 12, p.351-98.
- ITOW, S. and Camargo, E.P. - Proteolytic activities in cell extracts of Trypanosoma cruzi. *J. Protozool. Utica*, 24(4):591-5, 1977.
- JACOBSON, M.F.; Asso, J. and Baltimore, D. - Further evidence on the formation of poliovirus proteins. *J. Mol. Biol.*, 49:657-69, 1970.
- JOHNSON, G.G.; Morris, J.M. and Beck, R.S. - The extracellular protease from Pseudomonas aeruginosa exhibits elastase activity. / *Can. J. Microbiol.*, 13:711-9, 1967.
- JOHNSON, G.D.; Holborow, E.J. and Dorling, J. - Immunofluorescence and immunoenzyme techniques. In Weir, D.M. (ed.) - *Handbook of Experimental Immunology* 3^a ed. Oxford, Great Britain, Blackwell Scientific Publication, 1978 vol. 1 (Immunochemistry), cap. 15, p.1-30.
- KABAT, E.A. and Mayer, M.M. - *Experimental Immunochemistry*. 2^a ed. Charles C. Thomas, Springfield, Ill. USA, 1961.
- KATZ, E. and Moss, B. - Formation of a vaccinia virus structural polypeptide from a higher molecular weight precursors: Inhibition by Rifampicin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 66:677-84, 1970.
- KEMMLER, W. and Steiner, D.F. - Conversion of proinsulin in a subcellular fraction from rat islet. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 41:1223-30, 1970.
- KÖBERLE, F. e Alcântara, F.G. de - Mecanismo da destruição neuronal do sistema nervoso periférico na Moléstia de Chagas. *O Hospital* 57(6):173-8, 1960.
- KRETTLI, A.U. - Efeito de anticorpos e do complemento sobre tripomastigotas sanguíneos de camundongos infectados com Trypanosoma

cruzi. Tese apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do grau de Doutor em Ciências. Belo Horizonte, Minas Gerais, 1978.

LOWRY, D.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-75, 1951.

MCKINNEY, R.M.; Spillane, J.T. and Pearse, G.W. - Fluorescein diacetate as a reference color standard in fluorescent antibodies studies. Analyt. Biochem., 9:474-6, 1964.

MACLENNAN, J.D. - The histolytic clostridial infection of man. Bacteriol. Rev., 26:177-274, 1962.

MAYER, M. e Rocha Lima, H. da (1912) apud Romana, C. - Contribuição ao conhecimento da patogenia da Tripanosomose Americana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 39(3):253-64, 1943.

MILLER, R.V. and Becker, J.M. - Peptide utilization in Pseudomonas aeruginosa: Evidence for membrane associated peptidase. J. Bacteriol., 133(1):165-71, 1978.

NAKANE, P.K. - Recent progress in the peroxidase-labelled antibody-method. Ann. N.Y. Acad. Sci., 254:203-11, 1975.

O'DALLY, J. - A new liquid medium for Trypanosoma cruzi. J. Protozool., 22(2):265-70, 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):577-83, 1976.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD - Immunologia y enfermedades parasitarias. Informe técnico 315, 1965.

OUCHTERLONY, O. - Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progress in Allergy, 5:1-78, 1958.

- PEREIRA DA SILVA, L.H. - Observações sobre o ciclo evolutivo do T. cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo., 1(2):99-118, 1959.
- PINE, M.J. - Response of intracellular proteolysis to alteration / of bacterial protein and the implications in metabolic regulation. J. Bacteriol., 93:1527-33, 1967.
- _____ - Turnover of intracellular proteins. Ann. Rev. Microbiol., 26:103-26, 1972.
- PLAUT, A.G.; Gilbert, J.V.; Artenstein, M.S. and Capra, J.D. - Neisseria gonorrhoeae and Neisseria meningitidis: extracellular enzyme cleaves human IgA. Science, 190:1103-5, 1975.
- PLAUT, A.G. - Microbial IgA proteases. N. Eng. J. Med. 298(26): 1459-63, 1978.
- RANGEL, H.A.; Repka, D. and Costa, M.G. - Proteolytic activity of Trypanosoma cruzi. In Resumos da 3ª Reunião anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambu, Minas Gerais, de 27 a 29 de Outubro de 1976.
- RANGEL, H.A.; Repka, D.; Araújo, P.M.F. and Costa, M.G. - A neutral proteinase of the epimastigotes forms of Trypanosoma cruzi. In Resumos da 4ª Reunião anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambu, Minas Gerais, de 5 a 7 de Novembro / de 1977.
- REPKA, D.; Rangel, H.A. e Costa, M.G. - Atividade proteolítica de Trypanosoma cruzi. Ciência e Cultura 24(supl.6):296, 1972.
- REPKA, D.; Camargo, I.J.B.; Santana, E.M.; Cunha, W.M.; Souza, O. C. de; Sakurada, J.K. and Rangel, H.A. - Surface antigenic determinant of epimastigote forms common to trypomastigote and amastigote forms of different strains of Trypanosoma cruzi. Tropenmed. Parasit., 31:239-46, 1980.
- SASAKI, M.; Yamamoto, H. and Shigeki, J. - Interaction of human serum proteinase inhibitors with proteolytic enzymes of animal,

- plant and bacterial origin. J. Biochem. 75:171-7, 1974.
- SILVA, L.H.P. e 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., 200:590-3, 1970.
- SNARY, D. and Hudson, L. - Trypanosoma cruzi cell surface proteins: identification of one major glycoprotein. FEBS LETTERS, 100(1): 166-70, 1979.
- STIREWALT, M. - Quantitative collection and proteolytic activity of preacetabular gland enzyme(s) of cercariae of S.mansoni. Am. J. Trop. Med. Hyg., 27(3):548-53, 1978.
- SUELL, K. - Role of exotoxin and protease as possible virulence factors in experimental infections in Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immunol., 19(3):839-45, 1978.
- TAFURI, W.L. - Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse en experimental acute Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 19(3):405-17, 1970.
- TAFURI, W.L. (1974) apud Araújo, P.M.F. - Isolamento e caracterização de uma proteinase dos lisados de Trypanosoma cruzi (Chagas 1909). Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP, São Paulo, 1979.
- TALAMO, R.C.; Langley, C.E.; Levine, B.W. and Kasemi, H. - Genetic versus quantitative analysis of serum alfa-1-antitrypsin. N. Eng. J. Med., 287:1067-9, 1972.
- TALAMO, R.C.; Blennerhassett, J.B. and Austen, K.F. - Familial emphysema and alfa-1-antitrypsin deficiency. N. Eng. J. Med., 275: 1301-4, 1966.

- URIEL, J. - Characterization of precipitates in gels. In Williams, C.A. and Chase, M.W. (eds.) - Methods in Immunology and Immunochemistry. New York, Academic Press, 1971. vol 3 p. 294-321.
- WILLIAMS, W.D. and Fajard, L.E. - Alfa-1-antitrypsin deficiency. / Am. J. Clin. Path., 61:311-20, 1974.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - Immunology of Chagas' disease. Memoranda. Bull. W.H.O. 50:459-72, 1974.