

WIRLA MARIA DA SILVA CUNHA TAMASHIRO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA FRAÇÃO ANTIGÊNICA DA SUPERFÍCIE DO *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909).

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do grau
de Mestre em Biologia (IMUNOLOGIA)

Orientador: Prof. Dr. H.A. Rangel

Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto
de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

- Campinas -

São Paulo - Brasil

1980

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA FRAÇÃO ANTIGÊNICA DA SUPERFÍCIE DO *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909).

A meu pai (in Memoriam).

A meu esposo e companheiro.

A G R A D E C I M E N T O S

Ao professor Humberto de Araújo Rangel pela orientação científica e sobretudo pelo estímulo e apoio recebidos.

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

Aos Professores Antonio Carlos Corsini e Dária Repka da Universidade Estadual de Campinas e Sumie Hoshino-Shimizu do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pela discussão do trabalho e valiosas sugestões.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e em especial a Ajax Mercês Atta, Sílvia B. Bellucci e Mário Bonfido, pela amizade e companheirismo.

Ao pessoal técnico do Departamento de Microbiologia e Imunologia e em especial a Sra. Alzira Caluzni Castro, pelos auxílios recebidos na execução deste trabalho.

NOSSOS AGRADECIMENTOS

A autora e a Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Estadual de Campinas, agradecem os recursos fornecidos pelas seguintes Instituições:

- UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
- FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
- CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO
- COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DE ENSINO SUPERIOR
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (Divisão de Imunologia)
- BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA.

Durante o desenvolvimento deste trabalho a autora foi bolsista da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior). A autora e o orientador, externam seus agradecimentos a estas Instituições.

S U M Á R I O

| | PAG. |
|--|------|
| I. INTRODUÇÃO | 1 |
| II. MATERIAL E MÉTODOS | 8 |
| II.1. ANIMAIS | 8 |
| II.2. TRIPANOSOMA | 9 |
| II.3. OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DE EPIMAS TIGOTAS | 9 |
| II.4. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA E DE POLISSACÁRI- DE | 9 |
| II.5. OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES FA E F3.2 | 9 |
| II.6. PREPARO DAS ALBUMINAS METILADAS | 10 |
| II.7. OBTENÇÃO DOS IMUNESSOROS | 10 |
| II.7.1. Soros anti-FA, anti-EL e anti-FS . | 10 |
| II.7.2. Soros anti F3.2 | 10 |
| II.7.3. Soros anti FAD | 11 |
| II.7.3.1. Soros de coelho anti-FAD | 11 |
| II.7.3.2. Soros de coelho anti-FAD complexada com a albumi- na de coelho metilada .. | 12 |
| II.7.3.3. Soros de coelho anti-FAD complexada com a albumi- na humana metilada | 12 |
| II.7.3.4. Soros de carneiro anti- FAD | 13 |
| II.7.4. Anticorpos anti IgG de coelho mar- cados com fluoresceína (F.a-cIgG). | 13 |

| | PAG. |
|--|------|
| II.7.5. Anticorpos anti IgG de coelho mar- cados com peroxidase (P.a-cIgG) .. | 13 |
| II.8. REAÇÕES DE AGLUTINAÇÃO E DE INIBIÇÃO DA A- GLUTINAÇÃO | 13 |
| II.9. REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA E DE INIBI- ÇÃO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA | 14 |
| II.10. REAÇÕES DE IMUNOPEROXIDASE | 16 |
| II.11. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA | 16 |
| II.12. CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DA FRAÇÃO FAD .. | 17 |
| II.13. IMUNODIFUSÃO | 19 |
| II.14. ELETROFORESE E IMUNOELETROFORESE DA FRAÇÃO FAD | 19 |
| III. RESULTADOS | 21 |
| III.1. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ANTIGÊNICA FAD | 21 |
| III.2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA | 24 |
| III.3. PROPRIEDADES GERAIS DA FRAÇÃO FAD | 27 |
| III.3.1. Ação da temperatura e da filtra- ção, sobre a capacidade inibitõ- ria da fração FAD | 27 |
| III.3.2. Ação da Concanavalina A (Con A) e de soluções ácidas sobre a solubi- lidade da fração FAD | 28 |
| III.3.3. Eletroforese da fração FAD | 28 |
| III.3.4. Imunoeletroforese cruzada e detec- ção da atividade enzimática na fração FAD | 29 |
| III.4. IMUNOGENICIDADE E ANTIGENICIDADE DA FRAÇÃO FAD | 32 |

| | PAG. |
|--------------------------------------|------|
| IV. DISCUSSÃO | 42 |
| V. RESUMO E CONCLUSÕES | 50 |
| VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 53 |

I. I N T R O D U Ç Ã O

As membranas biológicas desempenham um papel importante em diversos fenômenos celulares. Em grande parte, as funções biológicas exercidas pelas membranas estão relacionadas a estruturas peculiares, localizadas na superfície das células. Desta forma, o conhecimento de detalhes da estrutura e composição molecular das membranas é considerado de fundamental importância para a compreensão de como funcionam os sistemas biológicos (Singer & Nicolson, 1972).

Essa abordagem se torna mais relevante no estudo das interações hospedeiro-parasito, uma vez que os componentes de superfície do parasito são os primeiros a entrarem em contato com as defesas do hospedeiro.

Dentre os grupos de patógenos do homem, o das bactérias é o mais bem estudado no que diz respeito a estrutura e função dos seus constituintes de superfície.

Assim sendo, os estudos sobre a composição da parede bacteriana revelaram que ela é quimicamente constituída por peptidoglicanos, ligados covalentemente a ácidos teicoícos nas Gram positivas (Archibald et al., 1967) ou a lipopolissacarídeos nas Gram negativas (Luderitz et al., 1971). Esses últimos componentes são considerados os principais antígenos de superfície bacterianos e seu isolamento é de grande valia na preparação de soros específicos utilizados na soro-diagnose.

Além da parede celular, certos grupos de bactérias como o *Diplococcus pneumoniae* e a *Klebsiella pneumoniae*, por exemplo, são revestidos por uma cápsula de natureza polissacarídica. A presença desta estrutura de superfície, frequentemente protege a bactéria patogênica da fagocitose (McCarty, 1973).

Entre os protozoários, são poucos os grupos cuja estrutura e composição da superfície são conhecidos. Neste particular, os tripanosomatídeos e em especial os tripanosomas africanos têm sido os mais bem estudados.

Desta forma, os primeiros trabalhos nesse sentido, indicavam a existência de variações antigênicas ocorrendo nas formas sanguíneas dos tripanosomas africanos (Brown & Williamson, 1964; Lanham & Taylor, 1972; Williamson & Brown, 1964). Esta variação se deve a antígenos de natureza glicoproteica (Allsopp et al., 1971; Allsopp & Njogu, 1974; Njogu & Humphries, 1972), localizados na superfície dos parasitos (Allsopp et al., 1971; Vickerman, 1969, Vickerman & Luckins, 1969) formando uma espécie de envoltório protetor. Vickerman (1969), descreveu detalhadamente o envoltório que reveste as formas sanguíneas desses tripanosomas, como sendo constituído por uma camada de material eletrôn-denso, que se projeta 12-15 nm da membrana plasmática. Esta camada glicoproteica é antigênica e estimula resposta imune protetora (Herbert & Lumsden, 1968; Herbert & Inglis, 1973; Lanham & Taylor, 1972).

No entanto, os tripanosomas podem eliminar es-

te envoltório, detectável no plasma de animais infectados como exoantígenos, e recobrir-se de outro antigenicamente distinto (D'Alessandro, 1972; Desmet et al., 1970 e Wane et al., 1971). Desta forma, os parasitos podem escapar às defesas elaboradas pelo hospedeiro. Esses exoantígenos têm sido responsabilizados por algumas das lesões mediadas por mecanismos imunológicos, encontradas nos indivíduos infectados (Tizard, 1978).

Cross (1975) descreveu a purificação de antígenos de superfície homogêneos de uma série de variantes do *Trypanosoma brucei*. Cada população antigenicamente distinta, possui essencialmente um único tipo de glicoproteína de peso molecular ao redor de 65000 daltons, que corresponde à cerca de 10% da proteína total da célula e a 30% das proteínas solúveis. As moléculas glicoproteicas contêm de 7 a 17% de carboidratos, ligados à porção da molécula associada com a membrana plasmática. O número de moléculas glicoproteicas calculado por parasito, perfaz um total (7×10^6) suficiente para recobrir toda a superfície do tripanosoma. O principal determinante antigênico dessas glicoproteínas seria o seu componente proteico (Cross, 1977).

Em relação ao *Trypanosoma cruzi*, tem sido frequentes as recomendações da OMS (1965; 1974; 1977; 1979) no sentido de se obter informações sobre os constituintes antigênicos do parasito, para estudos do papel biológico de tais antígenos.

A maior parte dos trabalhos realizados sobre o

isolamento de constituintes do *T. cruzi*, tem sido orientados para a obtenção de frações antigênicas a serem empregadas na soro diagnose (Fife & Kent, 1960; Gonçalves & Yamaha, 1969; Muniz & Freitas, 1944; Seneca & Peer, 1966) ou em experimentos de proteção (Gonzalez Cappa et al., 1968; Gonzalez Cappa et al., 1976; Kierszenbaum & Budzko, 1973; Pereira et al., 1978; Segura et al., 1974; Segura et al., 1976; Segura et al., 1977; Seneca et al., 1966).

Os estudos imunoquímicos dos antígenos do *T. cruzi* realizados por Afchain & Capron (1969; 1971), mostraram a presença de numerosos componentes antigênicos no extrato solúvel obtido de formas epimastigotas de cultivo do *T. cruzi*. Dentre estes componentes o chamado antígeno 5 se caracterizava pela sua imunogenicidade e remarcada especificidade, quando comparado com outros tripanosomatídeos parasitos do homem (Afchain et al., 1974). Em trabalhos posteriores, Afchain e colaboradores (1978) isolaram o antígeno 5, a partir do extrato solúvel total, por cromatografia de afinidade. O antígeno isolado foi detectado, através de reações de imunofluorescência, na superfície das formas epimastigotas e tripomastigotas do parasito (Fruit et al., 1978).

Empregando a extração pelo fenol a 88%, Alves & Colli (1975) isolaram uma fração polissacarídica das formas epimastigotas do *T. cruzi*. A fração obtida se mostrou capaz de inibir a aglutinação de epimastigotas pela Concanavalina A, previamente demonstrada pelos autores

Alves & Colli, 1974), sugerindo sua natureza de superfície. O principal componente da fração, um lipopeptido foglicano, foi posteriormente purificado e caracterizado quimicamente (Lederkremer et al., 1976; Lederkremer et al., 1977).

Utilizando-se também da extração pelo fenol a 88%, Gottlieb (1977) isolou uma fração polissacarídica das formas epimastigotas do *T. cruzi*, que pode ser detectada e isolada do plasma de camundongos infectados com a linhagem Y do parasito. As frações isoladas mostraram uma constituição química e antigênica idênticas e foram detectadas na superfície das formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*, através de reações de imunofluorescência e por microscopia eletrônica, usando anticorpos marcados com ferritina (Gottlieb, 1978).

Repka (1973, 1979) verificou que os sedimentos dos lisados de formas epimastigotas do *T. cruzi*, eram capazes de absorver grande parte dos anticorpos aglutinantes presentes em soros imunes anti *T. cruzi*. O sobrenadante desses lisados também possuíam tal capacidade, concentrada principalmente nas frações 1 e 2 obtidas pela gel filtração dos lisados em Sephadex G-200. Em trabalhos posteriores, foram isolados de formas epimastigotas do *T. cruzi* lisadas e liofilizadas (EL), duas frações distintas.

A primeira delas se constituía em um extrato salino de EL e foi denominada FS (Costa, 1977). Esta fração contém basicamente enzimas proteolíticas, com atividade em ampla faixa de pH. A fração FS, da maneira como

obtida, não foi capaz de inibir as reações de aglutinação e imunofluorescência de soros anti epimastigotas (Bellucci, 1979). Entretanto, a primeira fração proveniente da gel filtração desta fração em Sephadex G-200 e constituída basicamente por polissacarídeos, foi capaz de inibir especificamente as reações de aglutinação (Tamashiro, dados não publicados). As demais frações obtidas pela gel filtração, apresentaram, em graus variados, a atividade proteolítica previamente demonstrada. A partir da fração 3 do Sephadex G-200 foi isolada e caracterizada uma proteínase com atividade caseinolítica em pH neutro, denominada F3.2. (Araújo, 1979; Rangel et al., 1980).

A segunda fração isolada de EL, foi obtida pelo tratamento do sedimento resultando da extração de FS, com NaOH 0.1 N, seguida pela sua precipitação a pH 4.0 e dissolução em tampão alcalino pH 8.1 (Repka et al., 1980). Esta fração foi denominada FA e era constituída, predominantemente, por proteínas e polissacárides. Através de reações de inibição da aglutinação, imunofluorescência e imuperoxidase foi detectada na fração FA, a presença de determinantes antigênicos da superfície, comuns as três formas do ciclo evolutivo do parasito. Além, disso, foi verificado que a fração FA também continha enzimas proteolíticas, com a atividade semelhante à encontrada na fração FS, capazes de promover a digestão dos componentes da própria fração.

Apoiado nessas observações, procuramos verificar se mediante a ação dos enzimas proteolíticos presen-

tes no sedimento insolúvel, obtido dos lisados de formas epimastigotas do *T. cruzi*, seria possível isolar uma fração que contivesse antígenos da superfície do parasito.

No presente trabalho, procuramos investigar as condições de obtenção desta fração antigênica e caracterizá-la, embora parcialmente, sob o ponto de vista de suas propriedades físico-químicas, bem como analisar sua reatividade a diferentes soros anti- *T. cruzi*.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. ANIMAIS

Camundongos *Swiss* com dois meses de idade e pesando cerca de 20g, coelhos albinos pesando cerca de 2Kg e carneiro adulto, utilizados no trabalho, provieram do biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

II.2. TRIPANOSOMA

A linhagem Y do *Trypanosoma cruzi*, cedida pelo Dr. Z. Brener da Universidade Federal de Minas Gerais, foi mantida em meio de LIT (Liver-Infusion-Tryptose), de acordo com Fernandes & Castellani (1966) e em camundongos *Swiss* infectados, por passagem seriada a cada 7 dias, com 1.2×10^5 parasitos sanguícolas, injetados intraperitonealmente.

A linhagem Colombiana do *T. cruzi*, cedida pelo Dr. G. Chaia do Instituto de Pesquisas, Johnson & Johnson Laboratório de Doenças Endêmicas, Campinas, Brasil, foi mantida nas mesmas condições da cepa Y por passagem seriada em camundongos *Swiss*.

II.3. OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DE EPIMASTIGOTAS

Epimastigotas liofilizados e delipidados (EL), foram preparados utilizando a linhagem Y do *T. cruzi* como indicado por Rangel et al. (1980). Aliquotas de 200 mg de EL foram tratadas com 25 ml de uma solução de NaCl 0.15 M e deixadas em banho de gelo por 15 minutos. Após a incubação, as misturas foram centrifugadas a 12100 g por 30 minutos. Os sobrenadantes (FS) foram estocados a - 20° C. Os sedimentos foram tratados com 10 ml de uma solução salina tamponada com fosfato 0.02 M, pH 7.2 (PBS), incubados a 37°C por 60 minutos e então centrifugados a 12100 g por 30 minutos. Os sobrenadantes (FAD) foram mantidos a - 20° C até o momento do uso ou então liofilizados.

II.4. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA E DE POLISSACÁRIDE

As dosagens de proteína foram feitas pelo Folin-Ciocalteu, segundo indicações de Lowry et al. (1951). As determinações de polissacarides foram feitas pelo método de Dubois et al. (1956).

II.5. OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES FA E F3.2.

A fração FA, obtida de formas epimastigotas da

linhagem Y do *T. cruzi*, foi preparada como descrito por Repka et al. (1980).

A fração enzimática F3.2. contendo a proteínase do *T. cruzi* purificada (800 U/mg de proteína), nos foi cedida pelo Dr. P. M. F. Araújo e obtida segundo Araújo (1979).

II.6. PREPARO DAS ALBUMINAS METILADAS

Albuminas séricas, humana e de coelho, foram isoladas pela precipitação com sulfato de amônio a 75%, seguida pela cromatografia de troca iônica em CM- celulose como indicado por Pinho (1977). A metilação das albuminas foi realizada segundo indicações de Plescia (1967).

II.7. OBTENÇÃO DOS IMUNESSOROS

II.7.1. Soros de coelho anti-EL (a-EL) e soros de coelho anti-FA (a-FA) foram preparados como indicado por Repka et al. (1980). Os soros de coelho anti-FS (a-FS) nos foi cedido pelo Dr. P. M. F. Araújo e obtido segundo Araújo (1979).

II.7.2. Soros de coelho anti-F3.2.

Os soros anti-F3.2. (a-F3.2.) foram obtidos pela imunização de coelhos com o imunoprecipitado formado a-

pós imunoelctroforese cruzada da fração FS precipitada pela acetona (Araújo, 1979) frente ao soro imune de coelho anti-FS. O imunoprecipitado era retirado, homogeneizado em salina e emulsionado em igual volume de Adjuvante Completo de Freund (ACF). Cada coelho recebeu 1 ml da emulsão, por via intradérmica, em vários pontos do dorso. Após 30 dias, foi administrada a mesma dose do antígeno em ACF, por via intramuscular. Os animais foram sangrados na sétima semana a partir do início da imunização e apresentaram títulos de 1:4 a 1:8 em imunodifusão.

II.7.3. Soros anti-FAD

Os soros anti-FAD foram obtidos pela imunização de 3 grupos de coelhos com FAD pura, FAD complexada com albumina humana metilada e FAD complexada com albumina de coelho metilada, respectivamente e pela imunização de um carneiro com a FAD pura.

Antes de receberem as doses imunizantes, foi colhido um pequeno volume de sangue de cada animal, para ser utilizado com controle.

II.7.3.1. Soros de coelho anti-FAD

Os soros anti-FAD foram obtidos pela imunização de coelhos com 100 µg de proteína de FAD em ACF, por via intradérmica, em vários pontos do dorso. Após 30 dias, foi realizada sangria de prova e subsequente injeção de 100 µg de proteína de FAD, por via subcutânea. Este procedimento foi repetido semanalmente, até a décima semana.

II.7.3.2. Soros de coelho anti-FAD complexada com albumina de coelho metilada.

Estes soros foram obtidos pela imunização de coelhos, por via intradérmica, em vários pontos do dorso, com 75 µg de proteína de FAD ligada à albumina de coelho metilada (na relação molar de 3 : 1, respectivamente), emulsionadas em ACF. Após 15 dias, foi realizada sangria de prova e subsequente injeção intradérmica de 150 µg de FAD pura. Este último procedimento foi repetido, semanalmente, até a décima semana.

II.7.3.3. Soros de coelho anti-FAD complexada com a albumina humana metilada.

Estes soros foram obtidos pela imunização de coelhos conforme o seguinte esquema: inicialmente os animais receberam uma dose intradérmica de 75 µg de proteína de FAD puro, emulsionado em ACF. Após 30 dias foi realizada sangria de prova e os animais foram separados em tres subgrupos. Os animais de cada subgrupo receberam, respectivamente, uma injeção intradérmica de 100, 10 e 1 µg de FAD complexada com a albumina humana metilada (na relação molar de 3 : 1, respectivamente). Após 21 dias foi realizada sangria de prova e os animais receberam subsequentemente, doses do antígeno correspondentes à da segunda injeção por via intramuscular. Este último procedimento foi repetido semanalmente, até a décima semana.

II.7.3.4. Soros de carneiro anti-FAD.

Estes soros foram obtidos pela imunização de um carneiro com 100 µg de proteína de FAD emulsionada em ACF, por via intradérmica em vários pontos do dorso. Decorridos 30 dias, foi realizada sangria de prova e subsequente injeção da mesma dose do antígeno, também por via intradérmica. Trinta dias após a segunda dose imunizante o animal foi sangrado.

II.7.4. Anticorpos anti-IgG de coelho marcados com fluoresceína (F.a - cIgG).

A fração IgF de um soro de carneiro anti-IgG de coelho obtida por cromatografia de troca iônica (Esteves et al., 1974), foi marcada com fluoresceína, segundo descrito em Repka et al. (1980).

II.7.5. Anticorpos anti-IgG de coelho marcados com peroxidase (P.a - cIgG).

A fração IgF do soro de carneiro anti-IgG de coelho foi marcada com peroxidase, segundo descrito em Repka et al. (1980).

II.8. REAÇÕES DE AGLUTINAÇÃO E INIBIÇÃO DA AGLUTINAÇÃO

As reações de aglutinação e inibição da aglutinação foram realizadas de acordo com indicações de Repka

et al. (1979). Uma solução de tampão Tris (Tris 0.05 M, pH 7.2) contendo Na Cl 0.1 M e 0.5% de glicose foi utilizada como diluente nestas reações. Suspensões de epimastigotas, filtradas em algodão, foram diluídas para conter 3×10^6 parasitos/ml. As reações de aglutinação foram realizadas com um volume total de 60 ul, pela mistura, em placas de plástico escavada, de igual volume dos imune soros diluídos, tampão diluente e suspensão de parasitos. As misturas foram incubadas à temperatura ambiente em câmara úmida por 1 hora e examinadas com um microscópio binocular da Zeiss com aumentos de 100 e 400x.

As reações de inibição da aglutinação foram realizadas como indicado acima, precedidas apenas pela incubação dos imunossoros (em diluições seriadas) com concentrações variadas do antígeno, durante 60 minutos à temperatura ambiente. O título aglutinante dos soros imunes foi determinado como sendo o inverso da maior diluição do soro que apresentava ainda reação positiva. A dose inibitória efetiva do antígeno foi determinada como sendo a menor quantidade do antígeno capaz de reduzir 8 vezes o título aglutinante do soro imune.

II.9. REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA E DE INIBIÇÃO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA

As reações de imunofluorescência usando epimastigotas de cultura ou tripomastigotas sanguícolas como antígenos, foram realizadas segundo indicações de Camar

go (1966). As reações de imunofluorescência utilizando a mastigotas, presentes em cortes de coração de camundongos infectados com o *T. cruzi* como antígeno foram realizadas de acordo com Repka et al. (1980). Coração de camundongos normais e infectados foram colocados em cápsulas de papel de alumínio e imediatamente estocados em nitrogênio líquido. Os órgãos congelados foram cortados, a - 20°C, utilizando-se um "Cryo-Cut American Optical Co. Microtome", em secções seriadas de 6 um de espessura, que foram coletadas em lâminas de microscópio e fixadas durante 5 segundos em acetona gelada. As secções fixadas foram lavadas em PBS, cobertas com os imunossoros anti FAD, anti-FA ou anti EL diluídos, e incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Após 2 lavagens (5 minutos cada) com PBS por pH 7.2, as secções foram cobertas com F.a - cIgG (dil 1:80) e incubada à temperatura ambiente, durante 30 minutos. As secções foram então lavadas 2 vezes com PBS, montadas em 10% de glicerina em PBS e examinadas sobre luz visível ou ultravioleta em um microscópio binocular Zeiss, equipado com câmera fotográfica. Após fotografar as reações de imunofluorescência de uma secção de tecido, em uma dada coordenada espacial, as lâminas eram removidas, coradas pelo Giemsa e recolocadas na mesma posição sobre o microscópio e fotografada sobre luz visível.

As reações de inibição da imunofluorescência, foram realizadas segundo as indicações acima precedidas apenas pela incubação dos soros com diferentes concentra

ções de FAD, durante 60 minutos à temperatura ambiente.

II.10. REAÇÕES DE IMUNOPEROXIDASE

As reações de imunoperoxidase usando epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas presentes em cortes de coração de camundongos infectados com o *T. cruzi*, foram realizadas como indicado por Repka et al. (1980). Os parasitos foram preparados como descrito para imunofluorescência.

II.11. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As frações extraídas dos sedimentos dos lisados das formas epimastigotas do *T. cruzi*, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, contendo 1% de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), de acordo com indicações de Fairbanks (1975).

Para a análise eletroforética, cada amostra de extrato, previamente liofilizada, foi ressuspensa em pequeno volume de água destilada e dialisada contra PBS pH 7.2, durante 18 horas. A seguir foram realizadas dosagens de proteína e polissacáride de cada extrato e suas concentrações ajustadas para 5 mg de polissacáride / ml. Cada amostra foi analisada em duplicata, na ausência de Ditiotreitól (DTT), tendo sido aplicados 100 µg de cada amostra por gel. Uma das duplicatas foi revelada para po

lissacáride, pela reação de PAS e a outra para proteína, usando o Coomassie blue.

II.12. CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DA FRAÇÃO FAD

Diferentes amostras do extrato obtido pela incubação do sedimento de EL, a 37°C durante 60 minutos (frações FAD), foram reunidas em "pool" após dosagem de proteína e polissacáride e determinadas algumas de suas propriedades físico-químicas, através de diversos procedimentos, a saber:

a) Ação da temperatura e da Ultrafiltração.

Amostras de 1 ml da fração FAD, contendo 1 mg de proteína/ml, foram incubadas a 56° C por 1, 2 e 24 horas e a 100° C por 30 minutos. A fração FAD foi ainda submetida ao congelamento e descongelamento sucessivos e à liofilização.

Alíquotas de FAD, contendo 1.5 mg de proteína/ml, foram submetidas à diálise contra PBS pH 7.2, em membranas comuns e à ultrafiltração, em membrana de Diaflo PM 10.

b) Ação da Concanavalina A (Con A) e de soluções ácidas sobre a solubilidade da FAD.

Amostras de 1 ml da fração FAD, contendo 1 mg

de proteína/ml, foram misturadas a concentrações crescentes de Con A pela adição de volumes seriados (10, 20, 30, 500 ul) de uma solução contendo 1 mg/ml de Con A. As misturas e os controles (FAD pura e a Con A), tiveram os seus volumes ajustados para 2 ml e a seguir foram incubados a 37°C durante 60 minutos. Os precipitados formados, foram separados por centrifugação a 3020 g por 15 minutos e a seguir foram realizadas dosagens de proteína e de polissacáride dos precipitados e dos sobrenadantes.

Porções de 1 ml de FAD, contendo 1 mg de proteína/ml, foram misturadas a volumes crescentes de uma solução de HCl 0.1 N, de tal maneira a se estabelecer um gradiente de pH variando de 7 a 2. O volume final das misturas e do controle (FAD puro), foi ajustado para 2 ml. Os precipitados formados por esse tratamento, foram separados por centrifugação a 12100 g por 30 minutos e ressuspensos em volumes de 2 ml de PBS pH 7.2. Tanto o precipitado como o sobrenadante foram neutralizados com uma solução de NaOH 0.1 N e dosados quanto ao teor de proteína e de polissacáride.

c) Tratamento com soluções de albuminas metiladas

Alíquotas de 0.1 ml até 0.5 ml de FAD, contendo 1.5 mg de proteína/ml foram misturadas a porções de 0.1 ml de uma solução de albumina metilada (humana ou de coelho), contendo 7.0 mg de proteína/ml, tendo-se estabelecido uma relação molar albumina: FAD de 1:3 a 1:15, respectivamente. O volume final das misturas foi ajusta-

do para 1.0 ml com solução salina 0.15 M e a seguir elas foram deixadas à temperatura ambiente por 30 minutos, tendo sido observada a presença ou não de precipitado, formado após esse período.

O produto de cada um desses tratamentos acima descritos, após dosagens de proteína e de polissacáride, foi testado pela reação de inibição da aglutinação entre soro imune de coelho anti-EL e as formas epimastigotas de cultura do *T. cruzi*.

II.13. IMUNODIFUSÃO

A fração FAD foi submetida à imunodifusão em gel de agarose, frente a diferentes imunessoros, seguindo as recomendações descritas por Ouchterlony (1967).

II.14. ELETROFORESE E IMUNOELETROFORESE DA FRAÇÃO FAD

a) Eletroforese em gel de agarose.

Volumes de 5 ul da fração FAD (20 mg de proteína/ml) e de soro humano normal, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão barbital-glicina/Tris (pH 8.6, força iônica 0.02 u), com o gel na espessura de 0.15 cm.

A análise eletroforética foi realizada, apli-

cando-se uma diferença de potencial de 6 Volts/cm durante 1 hora. Após a eletroforese, a lâmina foi revelada pelo Coomassie blue a 1% em ácido acético-etanol.

b) Imunoeletroforese cruzada.

A presença de componentes enzimáticos na fração FAD foi investigada através de uma variante da técnica de imunoeletroforese cruzada ("Tandem-crossed immunoelectrophoresis") segundo Krøll (1973).

Nos procedimentos imunoeletroforéticos foram empregados 10 μ l de FAD (2.5 mg de proteína/ml) e de F3.2. (0.6 mg de proteína/ml) e soro de coelho anti F3.2. na diluição de 1:20 em agarose a 1% em tampão barbital-glicina/Tris (pH 8.6, força iônica 0.02 u).

A corrida eletroforética foi realizada em primeira dimensão sob uma diferença de potencial de 10 Volts/cm, durante 45 minutos. Na segunda dimensão foi aplicada uma diferença de potencial de 1 Volt/cm, durante 15 horas. Após a eletroforese a lâmina foi lavada em solução salina 0.15 M, durante 24 horas e fotografada, para observação das linhas de precipitação formadas.

A detecção da atividade enzimática da FAD, após a imunoeletroforese cruzada foi realizada segundo indicação de Uriel (1960), utilizando-se caseína a 2% como substrato, diluída em tampão fosfato 0.05 M pH 7.2, contendo 15 mM de 2-Mercaptoetanol e 5 mM de EDTA.

III. RESULTADOS

III.1. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ANTIGÊNICA FAD

Com o objetivo de determinar as condições ótimas para a obtenção de FAD, alíquotas de 200 mg de EL foram inicialmente incubadas com solução de NaCl 0.15 M, a 0°C por 15 minutos e a seguir, centrifugadas a 12100 g por 30 minutos, a fim de se extrair a fração solúvel (FS) rica em enzimas proteolíticas.

Os sedimentos obtidos foram tratados, separadamente, com 10 ml de PBS 0.002 M, pH 7.2 e incubados a 0°C e a 37°C, por períodos de tempo variados (15, 30, 60 e 120 minutos), na presença ou ausência de efetores enzimáticos (5 mM de ácido iodoacético e 20 mM de 2-Mercaptoetanol). Os sobrenadantes obtidos após centrifugação a 12100 g por 30 minutos, foram analisados quanto ao seu conteúdo de proteína e polissacáride. Os resultados encontrados estão expressos nas figuras 1 e 2.

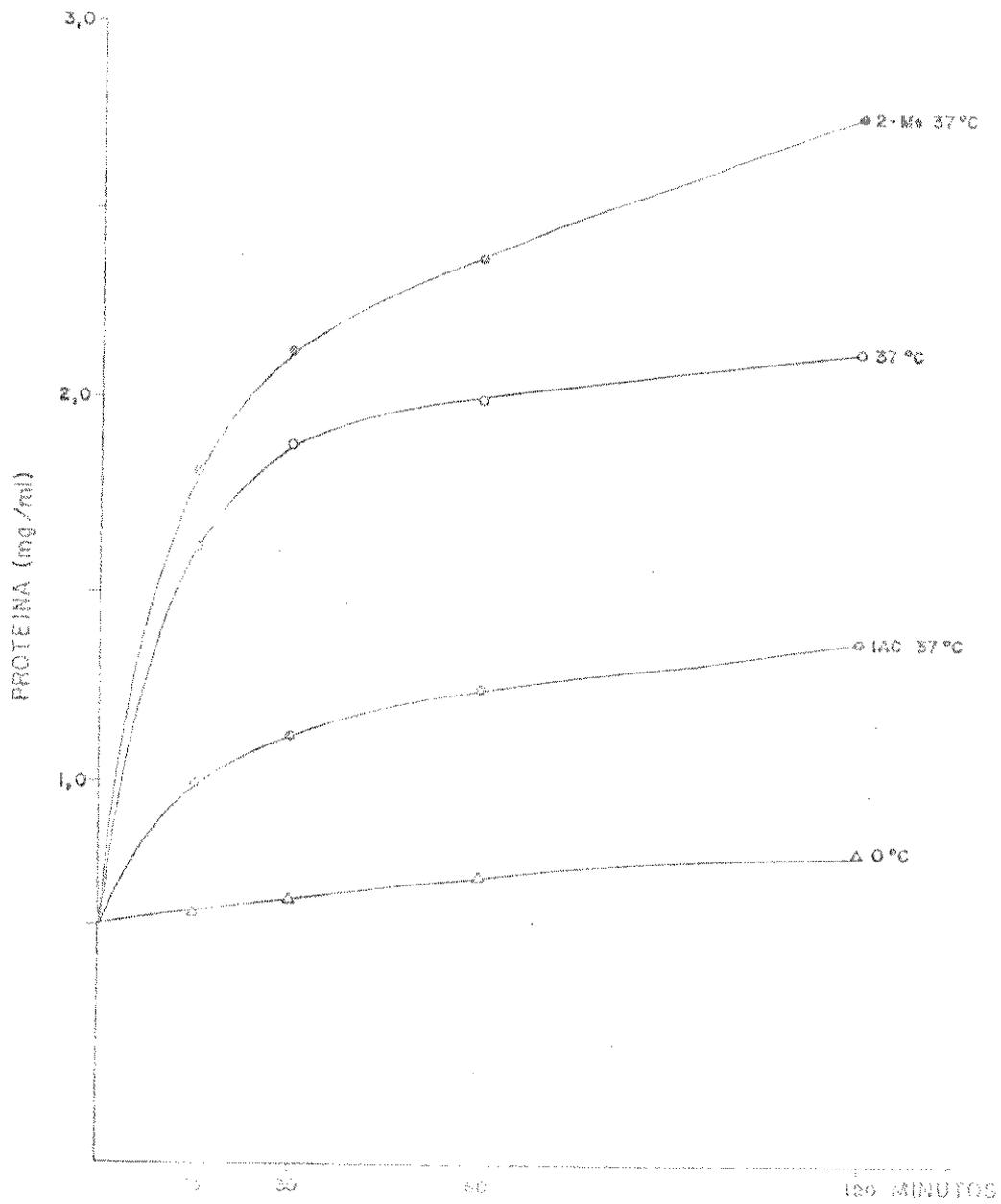


FIGURA 1 - Influência da temperatura e de efetores enzimáticos na extração de proteína dos sedimentos obtidos dos lisados das formas epimastigotas do *T. cruzi*.

As extrações foram realizadas a 0°C e a 37°C, na presença ou ausência de 5 mM de ácido iodoacético (IAc) ou de 20 mM de 2-Mercaptoetanol (2-Me).

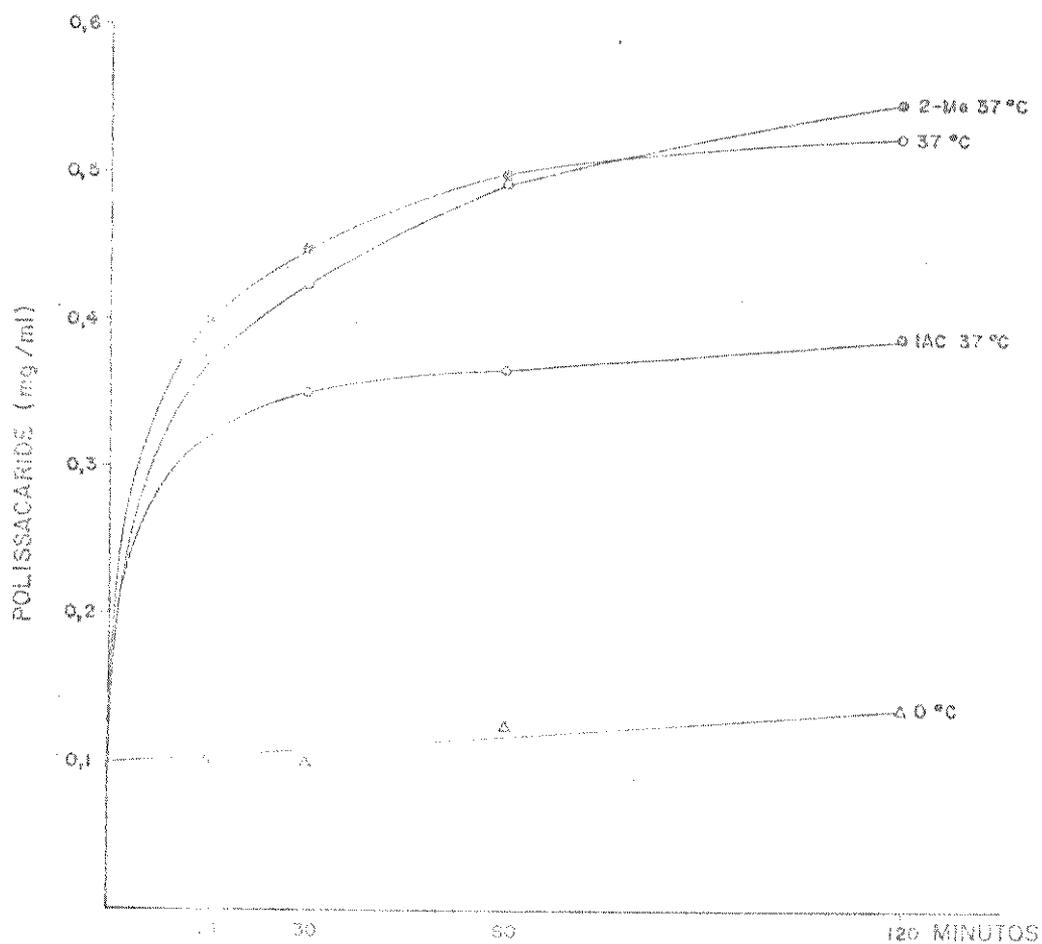


FIGURA 2 - Influência da temperatura e de fatores enzimáticos sobre a extração de polissacarídeos dos sedimentos obtidos dos lisados das formas epimastigotas do *T. cruzi*.

As extrações foram realizadas a 0°C e a 37°C, na presença ou ausência de 5 mM de ácido iodoacético (IAC) ou de 20 mM de 2-Mercaptoetanol (2-Me).

Como pode ser visto na figura 1, a quantidade de proteína presente nas frações foi dependente da temperatura empregada para a extração, tendo sido maior a 37°C do que a 0°C. Pode-se verificar ainda que foi dependente também da presença dos efetores enzimáticos, tendo sido significativamente mais alta na presença de 2-Me, e mais baixa na presença de IAc.

Com relação a extração de polissacárides (figura 2), foi observada também uma nítida influência da temperatura, tendo sido maior a 37°C do que a 0°C. Na presença de ácido iodoacético, a quantidade de polissacárides extraída a 37°C, também foi menor do que na ausência desse efector. Entretanto, não houve diferença significativa na quantidade de polissacárides presente nas frações obtidas a 37°C, na presença ou na ausência de 2-Mercaptoetanol.

III.2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As frações obtidas pela extração a 0°C ou a 37°C na presença de ácido iodoacético, mostraram basicamente o mesmo padrão eletroforético em gel de poliacrilamida. Na figura 3A está representada a análise eletroforética da fração obtida pela extração a 0°C por 1 hora. Dois grupos de componentes PAS positivos foram detectados nessa fração. Um deles não penetrava na matriz do gel, o que indica a presença de componentes de alto peso

molecular. O segundo grupo é constituído por 3 componentes que apresentaram Rm de 0.5, 0.6 e 0.9 respectivamente.

As frações obtidas por extração a 37°C, na presença ou na ausência de 2-Me, mostraram padrões eletroforéticos semelhantes entre si. A figura 3B representa a análise eletroforética da fração obtida por extração a 37°C por 1 hora. Neste caso, não foi detectado o componente de alto peso molecular e a quantidade relativa dos componentes de Rm 0.5, 0.6 e 0.9 foi significativamente maior do que nos extratos obtidos a 0°C e a 37°C na presença de IAc.

As duplicatas dessas análises eletroforéticas, quando reveladas para proteína pelo Coomassie blue, mostraram os mesmos componentes revelados pelo PAS, porém, muito fracamente corados (não mostrado).

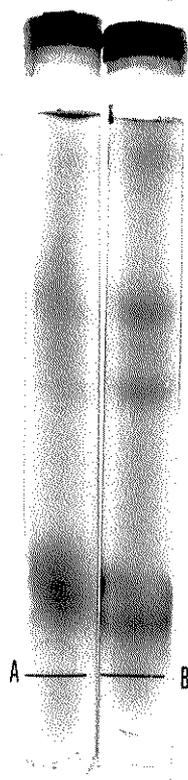


FIGURA 3 - Análise eletroforética das frações obtidas a 0°C (A) e a 37°C (B) em gel de poliacrilamida a 15% contendo 1% de SDS. Os geis foram revelados pelo PAS.

Os extratos obtidos dos sedimentos dos lisados das formas epimastigotas do *T. cruzi* em condições que favoreciam ou não a ação da proteinase, foram testados nas reações de inibição da aglutinação entre soros imunes anti-EL e as formas epimastigotas de cultura do parasito. Quando esses extratos foram padronizados em termos de concentração proteica, verificou-se grande variação entre eles na dose inibitória efetiva. Ao contrário, quando foram padronizados em termos de concentração polissacarídica, todos os extratos exibiram uma dose inibitória efetiva de 32 µg de polissacáride.

III.3. PROPRIEDADES GERAIS DA FRAÇÃO FAD

A partir dos resultados acima apresentados, diferentes partidas da fração antigênica, que denominamos FAD, foram preparadas por autodigestão dos sedimentos dos lisados de epimastigotas do *T. cruzi*, a 37°C por 60 minutos.

As frações dosaram em média 1.366 (\pm 0.137)mg/ml de proteína e 0.327 (\pm 0.029) mg/ml de polissacáride portanto, numa relação proteína/polissacáride de 4:1. A dose inibitória efetiva dessas frações nas reações de inibição da aglutinação, entre diferentes soros imunes anti-EL e as formas epimastigotas de cultivo, foi sempre de 32 μ g de polissacáride.

A amostra constituída pelo "pool" dessas partidas de FAD, foi empregada na imunização de coelhos e carneiro, assim como nos experimentos relativos ao estudo de suas propriedades gerais.

III.3.1. Ação da temperatura e da filtração, sobre a capacidade inibitória da fração FAD.

Os determinantes antigênicos contidos na fração FAD, responsáveis pela inibição da aglutinação, no sistema já descrito, se mostraram resistentes ao aquecimento a 56°C, por períodos de até 24 horas de incubação e à fervura por 30 minutos. Da mesma forma, permaneceram inalterados pelo congelamento e descongelamento sucessi-

vos, assim como pela liofilização. Eles não se mostraram dialisáveis em membranas comuns e em membrana de Diaflo PM 10, não foram detectados no ultrafiltrado.

III.3.2. Ação da Concanavalina A (Con A) e de soluções ácidas sobre a solubilidade da fração FAD.

A fração FAD foi precipitada pela Con A. A precipitação foi máxima, isto é, mais de 90% da proteína e polissacáride contidos na fração foram precipitados quando, FAD e Con A foram misturados na proporção de 200 µg de polissacáride de FAD para 100 µg da lectina.

A fração FAD foi também precipitada por solução de HCl 0.1 N e pelas albuminas metiladas. A maior quantidade de proteína e de polissacáride foi encontrada no precipitado formado a pH 4.0. Contudo, a dose inibitória efetiva nas reações de aglutinação, tanto do sobrenadante como do precipitado, obtidos a esse pH, foram semelhantes a do controle (32 µg de polissacáride). Os resultados encontrados na precipitação com as albuminas metiladas indicaram que a FAD possui radicais COO^- livres e é, portanto, bastante ácida.

III.3.3. Eletroforese da fração FAD

A fração FAD foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão barbital-glicina/Tris (pH 8.6,

força iônica 0.02 M). Sob essas condições, a fração se mostrou negativamente carregada, corável pelo Coomassie blue e aparentemente homogênea. No entanto, a fração apresentou uma região corada mais intensamente, com migração comparável a da região da pré-albumina de um soro normal humano (SHN), analisado em paralelo (figura 4). Quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida, na ausência de SDS, a fração não penetrou na matriz do gel. Na presença de SDS a 1%, os resultados obtidos foram sempre semelhantes ao apresentado na figura 3B.

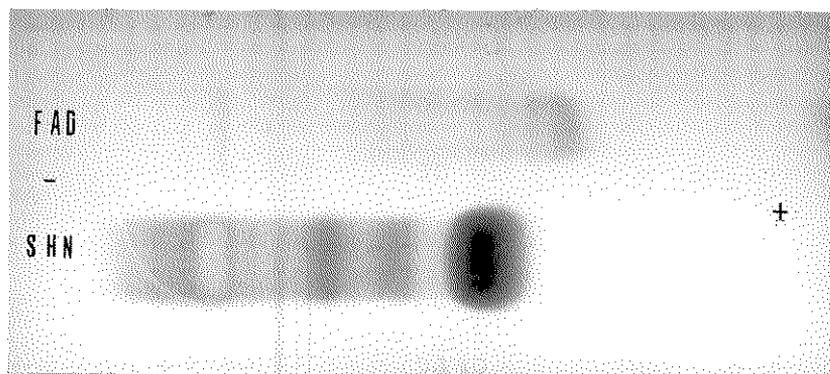


FIGURA 4 - Eletroforese em gel de agarose a 1% da fração FAD (20 mg de proteína/ml) comparada à de um soro humano normal (diluição a 1:2). A revelação para proteína foi feita com o Coomassie blue.

III.3.4. Imunoeletroforese cruzada e detecção de atividade enzimática na fração FAD.

A fração FAD foi extraída dos sedimentos dos li-

sados das formas epimastigotas do *T. cruzi*, em condições que favoreciam a atividade da proteinase (PBS, pH 7.2 ; 37°C por 60 minutos) presente nesses lisados. Com o objetivo de verificar se a fração FAD continha tal proteína ativa, ambas, a fração FAD e a proteinase (F3.2.) isolada a partir da fração PS, foram submetidas simultaneamente a imunoelektroforese cruzada em gel de agarose, contendo imunossoro específico anti-F3.2., pela técnica de "Tandem-crossed immunoelectrophoresis". A seguir, a atividade enzimática dos imunoprecipitados formados foi verificada pela incubação da preparação com caseína a 2% e posterior coloração pelo Coomassie blue.

Os resultados mostraram que a fração FAD contém a proteinase do parasito. Na figura 5, podemos verificar a reação de identidade formada entre um componente da FAD e a proteinase F3.2. Além disso, podemos verificar que o componente revelado na fração FAD possui atividade caseinolítica semelhante à da F3.2. (figura 6).

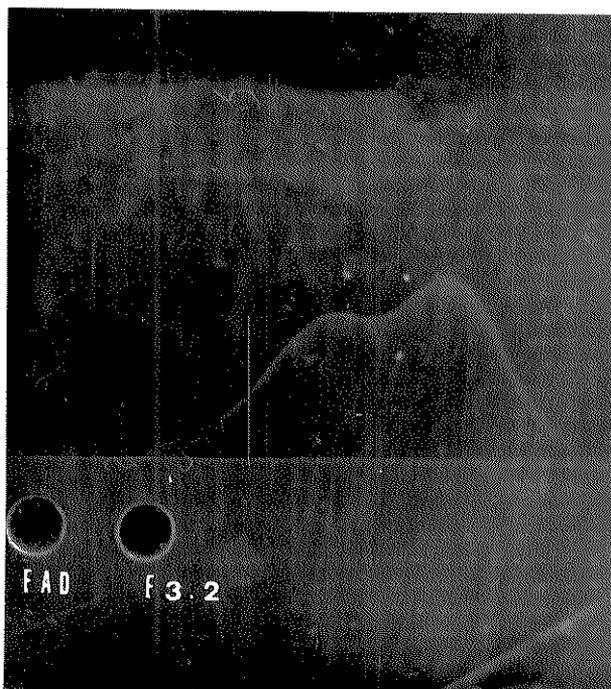


FIGURA 5 - "Tandem - crossed immunoelectrophoresis" das frações FAD (2.5 mg de proteína/ml) e F3.2. (0.6 mg de proteína/ml) frente a soro imune de coelho anti-F3.2. (diluído a 1:20).



FIGURA 6 - Detecção da atividade caseinolítica das frações FAD e F3.2. após "Tandem-crossed immunoelectrophoresis".

III.4. IMUNOGENICIDADE E ANTIGENICIDADE DA FRAÇÃO FAD

Grupos de coelhos foram imunizados com a fração FAD, complexada ou não com albuminas metiladas (humana ou de coelho), emulsionada com Adjuvante Completo de Freund. A produção de anticorpos durante a imunização foi pesquisada pelas reações de precipitação em gel, aglutinação imunofluorescência e imunoperoxidase.

No decorrer das imunizações não foram detectados nesses soros, a presença de anticorpos precipitantes para a FAD nem para as albuminas, como verificado pela técnica de imunodifusão em gel de agarose.

A presença de anticorpos aglutinantes para as formas epimastigotas de cultura foi, no entanto, detectada em todos os soros de coelho e de carneiro imunizados com a fração FAD, pura ou complexada com as albuminas metiladas. A evolução dos títulos aglutinantes dos soros imunes de coelho, seguiu o padrão apresentado na figura 7.

Nenhuma diferença apreciável foi encontrada nos títulos aglutinantes dos soros dos animais que receberam a FAD pura ou complexada com as albuminas metiladas. Diferenças também não foram encontradas em função da dose do antígeno empregada na imunização desses coelhos. Os títulos máximos de aglutinação (120 - 480) foram encontrados ao redor da oitava semana de imunização.

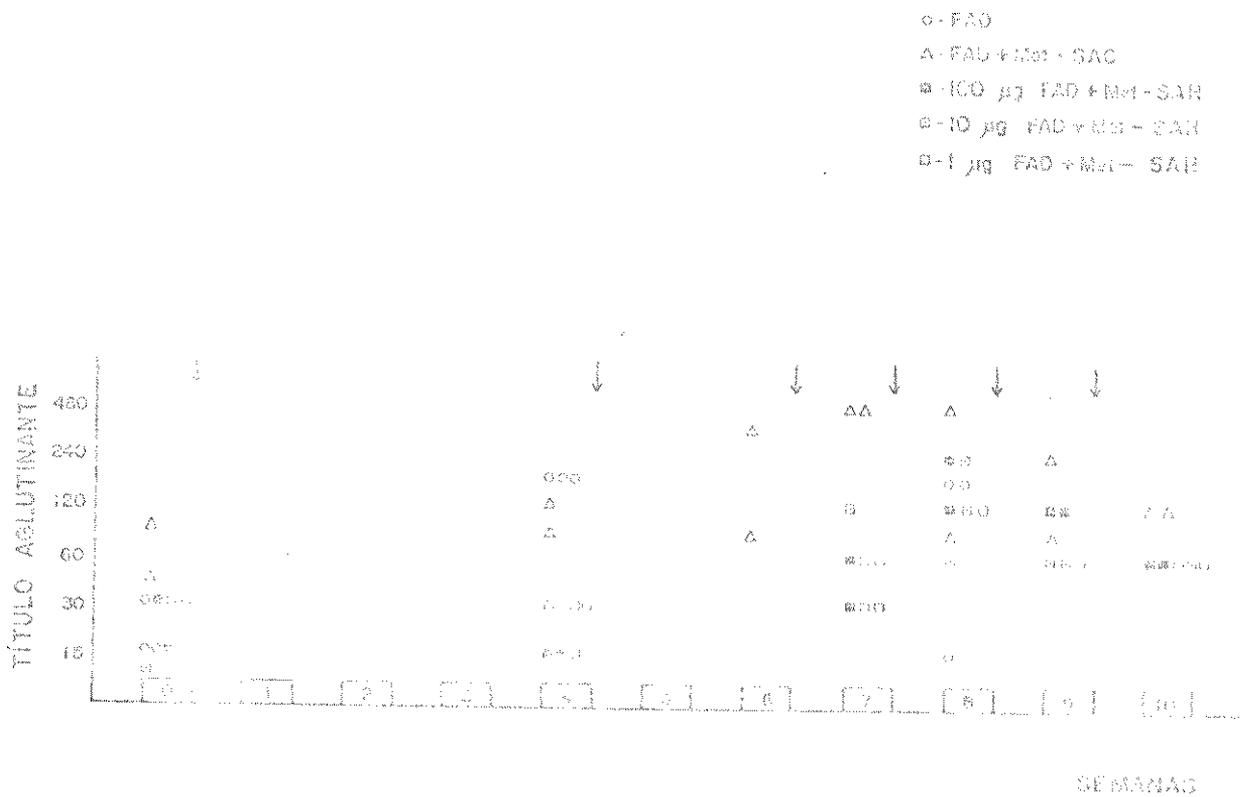


FIGURA 7 - Evolução dos títulos aglutinantes dos soros de coelhos imunizados com a fração FAD pura ou complexada com albumina humana metilada (Met-SAH) ou com albumina de coelho metilada (Met-SAC). As setas indicam a ocasião em que os animais receberam as doses imunizantes do antígeno.

Os soros obtidos em carneiro, pela imunização com a fração FAD, também foram capazes de aglutinar as formas epimastigotas do *T. cruzi*. Os títulos aglutinantes dos soros imunes variaram de 300 - 600.

Os soros imunes de coelho anti-EL e anti-FA, também aglutinam fortemente as formas epimastigotas do

parasito. A incubação prévia desses soros, bem como dos soros anti-FAD, com concentrações crescentes da fração FAD, resultou em acentuada redução de seus títulos aglutinantes. Os resultados obtidos nas reações de inibição da aglutinação, pela fração FAD, estão esquematizados na tabela 1.

TABELA 1 - Inibição da reação de aglutinação entre os soros imunes de coelho e as formas epimastigotas do *T. cruzi* pela fração FAD.

| Soros | Título aglutinante dos imunossoros após incubação com a fração FAD (μ g de polissacáride) | | | | | |
|-------|--|------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 |
| | a-EL | | | | | |
| 1 | 600 | 75 | 37.5 | <37.5 | - | - |
| 2 | 300 | 150 | 75 | 37.5 | <37.5 | - |
| 3 | 600 | 75 | 37.5 | <37.5 | - | - |
| 4 | 300 | 37.5 | <37.5 | - | - | - |
| a-FA | | | | | | |
| 1 | 600 | 150 | 75 | 37.5 | <37.5 | - |
| 2 | 1200 | 300 | 150 | 75 | 37.5 | <37.5 |
| 3 | 300 | 75 | 37.5 | <37.5 | - | - |
| 4 | 300 | 75 | 37.5 | <37.5 | - | - |
| a-FAD | | | | | | |
| 1 | 120 | 15 | <15 | - | - | - |
| 2 | 120 | 15 | <15 | - | - | - |
| 3 | 240 | 30 | 15 | <15 | - | - |
| 4 | 240 | 30 | 15 | <15 | - | - |

As reações de imunofluorescência foram realizadas entre os soros de coelhos imunizados com FAD pura ou complexada com as albuminas metiladas e as formas epimastigotas de cultura, tripomastigotas sanguícolas e cortes de coração de camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*. Foram utilizados também nessas reações, cortes de coração de camundongos infectados com a cepa Colombiana do parasito.

Estes soros apresentaram títulos de fluorescência, variando de 10 a 80 nas reações realizadas com as formas epimastigotas do parasito. Reações de fluorescência positivas entre os soros normais dos respectivos coelhos e as formas epimastigotas do *T. cruzi* só foram encontradas quando se empregou os soros não diluídos ou, no máximo, diluídos duas vezes.

Reações de imunofluorescência positivas também foram obtidas entre os soros de coelho anti-EL e anti-FA e as formas epimastigotas do *T. cruzi*. Quando estes soros, bem como os soros anti-FAD, foram previamente incubados com concentrações crescentes da fração FAD, os seus títulos de fluorescência foram linearmente reduzidos. Estes resultados estão resumidos na tabela 2.

TABELA 2 - Inibição da reação de imunofluorescência entre soros imunes de coelho e formas epimastigotas do *T. cruzi* pela fração FAD.

| | | Título de imunofluorescência dos antissoro ros após incubação com a fração FAD (μ g de polissacáride) | | | |
|-------|---|--|----|----|-----|
| | | 0 | 32 | 64 | 128 |
| a-EL | 1 | 1280 | 80 | 40 | 20 |
| | 2 | 320 | 80 | 40 | 20 |
| a-FA | 1 | 320 | 10 | 5 | 5 |
| | 2 | 160 | 20 | 10 | 5 |
| a-FAD | 1 | 80 | 5 | 5 | - |
| | 2 | 80 | 5 | - | - |

Os soros de coelhos obtidos, tanto por imunização com o antígeno como complexada com as albuminas metiladas, apresentaram também reações de imunofluorescência positivas quando testados com as formas tripomastigotas sanguíneas do parasito (figura 8). Os títulos de imunofluorescência alcançaram valores de até 1:80, nos soros testados.

Os soros normais desses coelhos apresentaram sempre reações negativas com as formas sanguíneas de *T. cruzi*, mesmo quando não diluídos.

Assim como também a incubação prévia dos soros imunes em 5% de PAA com concentrações iguais ou superiores a 32 µg de glicossacárido de PAA, reduziu drasticamente seus títulos de imunofluorescência.



FIGURA 8 - Reação de imunofluorescência entre soro imune de coelho anti-PAA (dil. 1:40) e as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*. Aumento de 960 vezes.

Cortes (6 μ de espessura) de coração de camundongos infectados experimentalmente com as cepas Y e Colombiana de *T. cruzi*, apresentaram áreas de intensa fluorescência, quando tratados com os soros imunes de coelho anti-FAD (pura ou complexada com as albuminas metiladas) em títulos de até 1:80 (figura 9A). A presença de ninhos de amastigotas nas áreas onde haviam sido detectadas as reações de fluorescência positivas, foi sempre revelada, quando a mesma preparação era corada pelo Giemsa (figura 9B). Nas figuras 9A e 9B estão sendo mostrados cortes de coração de camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi*, devido ao grande número de ninhos de amastigotas que aparecem pela infecção com esta cepa e portanto maior facilidade de manuseio em comparação à cepa Y.

Reações de imunofluorescência não puderam ser detectadas quando se empregou os soros normais de coelho e cortes de coração de camundongos infectados, nem quando se utilizou cortes de coração de animais normais e os soros imunes de coelho.

As reações de imunofluorescência entre os soros imunes anti-FAD, assim como as encontradas com os soros anti-IL e anti-FA e os ninhos de amastigotas do *T. cruzi*, foram também inibidas pela fração FAD.

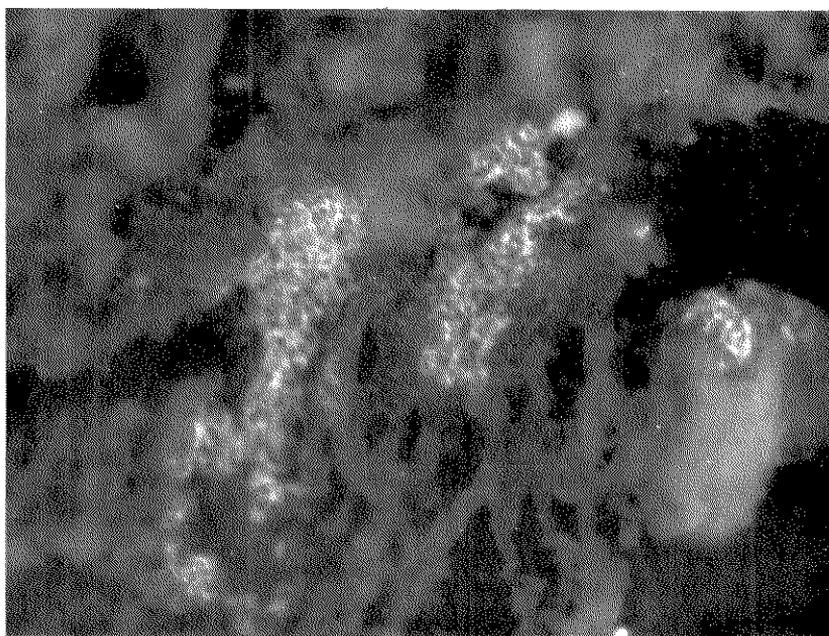


FIGURA 9A - Reação de imunofluorescência entre soro imune de coelho anti-FAD (diluição 1:40) e secção de coração de camundongo infectado com o *T. cruzi* da cepa Colombiana. Aumento de 960 vezes.

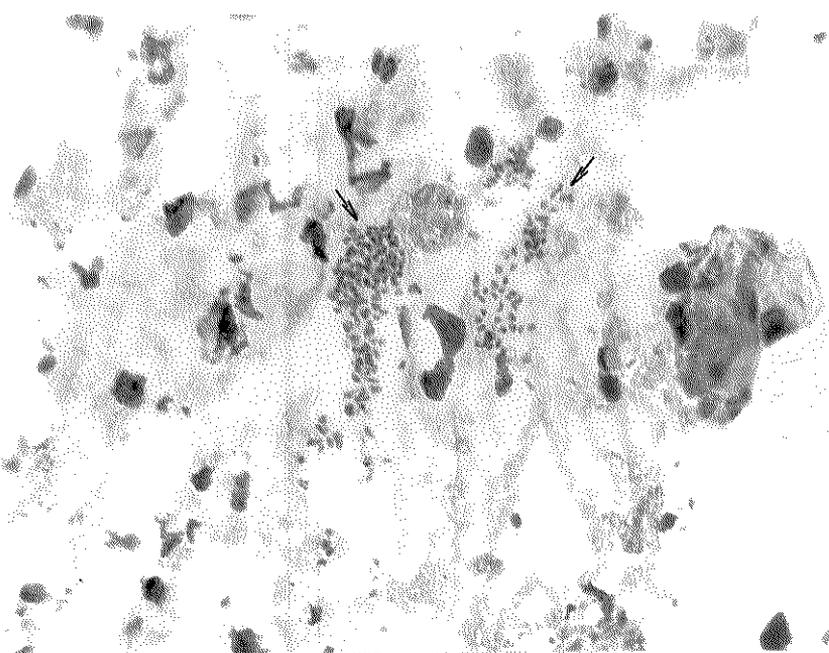


FIGURA 9B - Secção de coração de camundongo infectado com a cepa Colombiana do *T. cruzi* corada pelo Giemsa. Aumento de 960 vezes. As flechas indicam os ninhos de a mastigotas, que correspondem às áreas fluorescentes da figura 9A.

Os resultados encontrados nas reações de imunofluorescência e aglutinação foram confirmados pelas reações de imunoperoxidase realizadas com os soros anti-FAD e as formas epimastigotas de cultura (figura 10), tripomastigotas sanguíneas e amastigotas presentes em cortes de coração de camundongos infectados com o *T. cruzi* (figura 11). Estas reações também puderam ser inibidas pela fração FAD.



FIGURA 10 - Reação de imunoperoxidase entre epimastigotas do *T. cruzi* e soro de coelho imunizado com FAD(dil. 1:40). Aumento de 3.000 vezes.

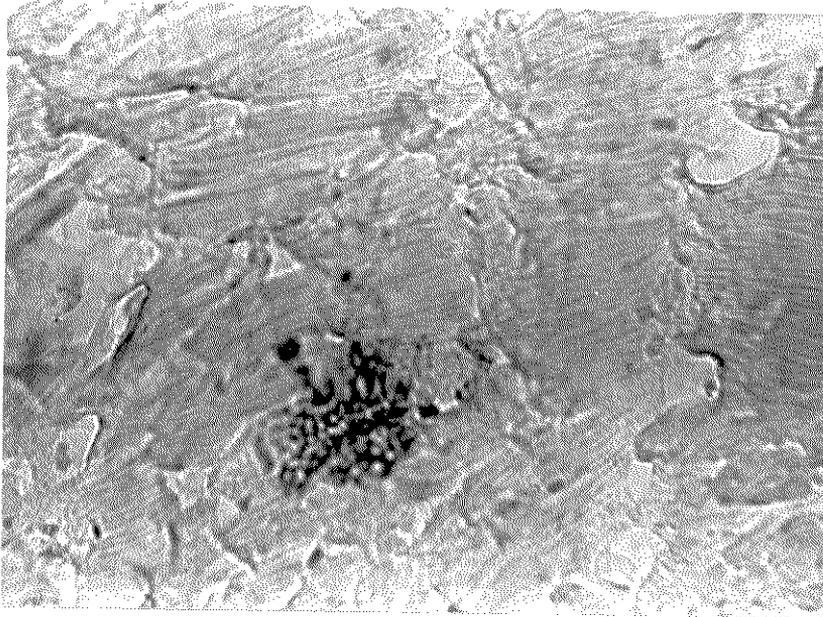


FIGURA 11 - Reação de imunoperoxidase entre soro de coelho anti-FAD (dil. 1:40) e ninhos de amastigotas presentes em cortes de coração de camundongo infectado com a cepa Colombiana do *T. cruzi*. Aumento de 960 vezes.

IV. DISCUSSÃO

A presença de enzimas proteolíticas do próprio parasito atuando sobre componentes antigênicos da superfície do *T. cruzi* foi detectada, inicialmente, na fração FA isolada dos sedimentos dos lisados das formas epimastigotas do parasito (Santana, 1977; Repka et al., 1980).

Estes resultados sugeriam a possibilidade de se extrair do sedimento dos lisados das formas epimastigotas do *T. cruzi*, constituintes antigênicos da superfície do parasito, através da ação da proteinase endôgena, dispensando portanto, o uso de tratamento drásticos como soluções ácidas, alcalinas ou detergentes.

Os resultados encontrados na extração das frações dos sedimentos de EL, confirmam esses achados iniciais. As frações obtidas pela incubação dos sedimentos de EL a 37°C, apresentaram um teor de proteína e de polissacáride bem mais elevado do que as obtidas a 0°C. Além disso, as extrações realizadas na presença de 2-Me, um ativador da proteinase presente nos lisados das formas epimastigotas do *T. cruzi* (Araújo, 1979) resultaram na obtenção de frações cujo teor de proteína foi bem mais elevado do que nas frações obtidas na sua ausência. Contrariamente, utilizando-se o ácido iodoacético, inibidor da referida proteinase, verificou-se acentuada redução na quantidade de proteína e de polissacáride ex-

traídos a 37°C.

Estes resultados sugerem que a proteinase do parasito deve agir sobre a estrutura complexa que constitui o sedimento desses lisados, fragmentando-o em porções menores, facilitando assim a dissolução da fração antigênica.

Os resultados obtidos pela análise eletroforética dos diferentes extratos, em gel de poliacrilamida contendo SDS e na ausência de DTT, confirmam estas observações. O padrão eletroforético apresentado pelo extrato obtido a 0°C, revela a presença de um componente complexo, de natureza glicoproteica e de alto peso molecular, visto que este componente não foi capaz de penetrar na matriz do gel. Este componente não pode ser observado, quando se analisou o extrato obtido a 37°C. Além disso, os padrões eletroforéticos das frações obtidas a 37°C na presença de ácido iodoacético ou de 2-Me foram semelhantes aos encontrados na análise dos extratos obtidos a 0°C e a 37°C, respectivamente. Estes resultados sugerem que à temperatura de 37°C, o complexo de alto peso molecular deve sofrer a ação da proteinase do parasito dando origem aos tres componentes de peso molecular mais baixo, observados.

Embora as frações obtidas a 0°C e a 37°C possuam algumas características eletroforéticas distintas entre si, os resultados obtidos nas reações de aglutinação sugerem que elas possuem a maioria dos determinantes antigênicos em comum, visto que todos eles apresentaram u-

ma dose inibitória efetiva de 32 μ g da polissacáride.

Uma vez que as frações obtidas eram antigenicamente semelhantes e a 37°C se extraía uma maior quantidade de material de baixo peso molecular dos sedimentos, foram escolhidos essa temperatura e o período de 1 hora de incubação como condições ótimas para a obtenção da fração antigênica (FAD), com a finalidade de serem estudadas as suas propriedades físico-químicas, além de suas características imunogênicas e antigênicas.

A análise eletroforética da fração FAD revelou os tres componentes já mencionados, coráveis simultaneamente pelo PAS e pelo Coomassie blue. Entretanto, eles se apresentaram como bandas fracamente coradas pelo Coomassie blue, o que sugere que esses componentes sejam de natureza glicopeptídica. Esta hipótese foi reforçada por mais duas observações experimentais. Primeiro, a fração FAD foi precipitada pela Con A, uma lectina que se combina especificamente com polissacarídeos que contenham resíduos de -D-glicopiranosil, -D-manopiranosil, -D-frutofuranosil ou -D-arabinofuranosil ocupando posições terminais não reduzidas (Sharon & Lis, 1972). Segundo, a fração FAD foi precipitada pelo HCl 0.1 N e no precipitado foram encontrados tanto componentes proteicos como polissacarídicos. Esse último resultado sugere, que a ligação entre estes dois tipos moleculares é de natureza covalente.

Observou-se ainda na FAD, uma forte tendência a agregação em soluções aquosas, o que indicava a presença

ça de componentes hidrofóbicos, provavelmente lípidos, (Tamashiro, dados não publicados). Foi verificado também que a fração é fortemente ácida, uma vez que se mostrou carregada negativamente, em experimentos de eletroforese em gel de agarose e foi capaz de reagir com as albuminas metiladas, formando um complexo insolúvel.

O conjunto desses resultados sugere que a fração FAD é muito semelhante ao lipopeptidofosfoglican isolado por Alves & Colli (1975), à partir das formas epimastigotas do *T. cruzi* e caracterizado por Lederkremer et al. (1976; 1977). Este composto que contém açúcares neutros (galactose e manose) e glucosaminas além de lípidos, peptídeos e fósforo foi capaz de inibir a aglutinação de formas epimastigotas do parasito pela Con A o que indicava a sua natureza de superfície.

Gottlieb (1977), isolou e caracterizou parcialmente uma fração obtida de formas epimastigotas do *T. cruzi*, pelo tratamento com fenol a 88%. Esta fração se mostrou muito semelhante à isolada por Alves & Colli (1975), no que diz respeito a suas características eletroforéticas, composição molecular e propriedade físico-químicas (Gottlieb, 1978). No referido trabalho, o autor verificou também que ela inibia a aglutinação de formas epimastigotas pela Con A e que, efetivamente, ela é uma fração antigênica da superfície do parasito como demonstrado através de reações de imunofluorescência e por microscopia eletrônica, utilizando anticorpos marcados com ferritina.

Além dos componentes glicopeptídicos, foi demonstrado na fração FAD um componente apresentando reação de identidade com a proteinase isolada da fração FS (Araújo, 1979). A proteinase encontrada na fração FAD, apesar de bastante ativa, deve estar presente em concentração relativamente baixa, uma vez que não foi possível detectá-la como uma banda proteica definida na análise eletroforética da fração em gel de poliacrilamida.

Desta forma, a reatividade da fração FAD com os diferentes soros testados pode ser atribuída basicamente aos componentes glicopeptídicos pela sua resistência ao calor, ao tratamento com HCl e pela precipitação com a Con A. Além disso, as tentativas de padronização de uma dose inibitória do antígeno baseada no teor de proteína, mostrou a existência de ampla variação ao passo que, com a padronização em termos de concentração polissacarídica, a dose inibitória efetiva foi constante.

A imunização de coelhos e carneiro com a fração FAD, resultou na obtenção de soros cujos títulos de anticorpos aglutinantes não ultrapassaram mais de quatro vezes os títulos de anticorpos naturais encontrados nos soros normais destes coelhos. A utilização de técnicas indiretas como a imunofluorescência e a imunoperoxidase, que potencializam a detecção destes anticorpos, também não revelou altos títulos nos soros de coelho.

Outros esquemas de imunização em coelhos foram testados, utilizando-se a fração FAD em diferentes doses, complexada com as albuminas, humana ou de coelho, metila

das. Os resultados encontrados, quanto aos títulos de aglutinação, imunofluorescência e imunoperoxidase foram ainda semelhantes aos encontrados com a FAD pura.

Embora com baixos títulos, os soros produzidos contra a fração FAD foram capazes de revelar a sua localização na superfície das formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*, através de reações de aglutinação e ou imunoperoxidase e imunofluorescência. Além disso, tais reações entre os soros imunes anti-El, anti-FA e anti-FAD puderam ser linearmente inibidas pela FAD. A absorção desses soros com formas epimastigotas vivas também reduziu consideravelmente os seus títulos de imunofluorescência e imunoperoxidase. Além da fração FAD ter sido detectada na superfície das formas epi-, tripomastigotas e amastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, ela foi também detectada, através de reações de imunoperoxidase e imunofluorescência, em ninhos de amastigotas da cepa Colombiana do parasito. Resultados semelhantes foram encontrados para a fração FA (Repka et al., 1980). Esses resultados, associados ao fato da fração FAD inibir as reações de aglutinação, imunoperoxidase e imunofluorescência dos soros anti-FA, sugerem que as duas frações contêm determinantes antigênicos semelhantes.

Nos soros obtidos de coelhos imunizados com a FAD complexada com albumina humana metilada, foram pesquisadas também, a presença de anticorpos contra a albumina. As quantidades desse antígeno que foram empregadas na primeira dose imunizante são, via de regra, suficien-

tes para provocar nesses animais, respostas em títulos de anticorpos precipitantes, 30 dias após o início da imunização. Entretanto, mesmo após a injeção de várias doses desse antígeno complexado à FAD, não foram detectados anticorpos precipitantes para a albumina nesses soros.

Da mesma forma, não puderam ser detectados anticorpos precipitantes para a proteinase presente na fração, nos diferentes soros anti-FAD obtidos, apesar da comprovada imunogenicidade desta enzima (Araújo, 1979).

É possível que estes resultados tenham relação com os achados de Corsini e colaboradores (1980). Estes autores verificaram que a fração FAD, injetada por via endovenosa em camundongos, produzia nesses animais uma depressão da resposta imune humoral, primária e secundária, a hemácias de carneiro. A resposta imune mediada por células e verificada pela reatividade ao DNFB, também foi deprimida pela FAD. A diminuição do número de unidades formadoras de colônia em baços de camundongos que haviam recebido a fração FAD, levaram os autores a concluir que essa fração, provavelmente, interfere em algum estágio da divisão celular, levando a diminuição da resposta.

Clinton et al. (1975) e Ramos et al. (1978) observaram o fenômeno de imunodepressão ocorrendo em camundongos infectados experimentalmente com o *T. cruzi*.

O fato da FAD conter alguns determinantes antigênicos da superfície das formas tripomastigotas do *T. cruzi* e aparentemente ser semelhante ao exoantígeno de-

tectado no soro de camundongos infectados com este parasito (Gottlieb, 1977; 1978), sugere uma possível participação de componentes da fração FAD, no fenômeno de imunodepressão a antígenos não relacionados, observado na doença de Chagas experimental.

Se por um lado sabe-se que a fração FAD produz imunodepressão em camundongos, por outro se desconhece qual dos componentes é o responsável pelo fenômeno. Esses resultados só poderão ser mais bem esclarecidos quando os componentes desta fração tiverem sido purificados e caracterizados individualmente.

A presença de anticorpos precipitantes para a fração FAD, foi detectada em soros de pacientes chagásicos e em soros de camundongos infectados experimentalmente com o *T. cruzi* (Atta et al. dados não publicados). No entanto, o papel de tais anticorpos, bem como dos antígenos que evocaram tal resposta no curso da infecção, é uma questão ainda aberta.

Desta forma, os fatos ora apresentados justificam um estudo mais aprofundado sobre a composição molecular dos constituintes de FAD, no sentido de esclarecer o possível papel biológico dessa fração antigênica, a exemplo do que ocorreu com a endotoxina de *Escherichia coli* (Morrison & Ulevitch, 1978).

V. RESUMOS E CONCLUSÕES

Foram realizadas experiências com o sentido de verificar a possibilidade de se extrair determinantes an tigênicos da superfície do *Trypanosoma cruzi*, através da ação da proteinase existente no sedimento dos lisados das formas epimastigotas do parasito.

Os resultados mostraram que pode ser extraída uma fração antigênica (FAD), quando esses sedimentos são incubados em condições propícias à ação da proteinase (PBS, pH 7.2; 37°C por 1 hora). O teor de proteína e de polissacáride da fração antigênica era aumentado quando se utilizava ativadores da ação enzimática (37°C; 2-Me) e se encontrava diminuído quando se utilizava inibidores dessa ação (0°C; IAc), indicando que a enzima facilita a obtenção dos constituintes da superfície. Através de pro vas de imunoeletroforese cruzada, foi demonstrado que a enzima presente nesses sedimentos é antigenicamente i- dêntica à anteriormente isolada por Araújo (1979).

A análise em gel de poliacrilamida, mostrou que as frações obtidas em condições que favoreciam a ação da proteinase, eram constituídas por tres componentes de bai xo PM (R_m : 0.5, 0.6 e 0.9, respectivamente), ao passo que as frações obtidas na presença do inibidor ou a 0°C eram constituídas principalmente por componentes de alto PM. Em ambos os casos, as frações obtidas inibiam as rea

ções de aglutinação dos soros anti-epimastigotas (a-EL), indicando que as diferentes moléculas, de alto e de baixo PM, continham os mesmos determinantes antigênicos.

A fração obtida em condições padronizadas (PBS, pH 7.2, a 37°C por 1 hora), continha proteínas e polissacárides na relação de 4:1 e apresentava uma dose inibitória efetiva de 32 µg de polissacáride, nas reações de aglutinação.

Essa fração, que exibia uma forte tendência a agregação em soluções aquosas, apresentou apenas um componente, com alta mobilidade anódica, na análise eletroforética em gel de agarose. Quando submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, apresentou um componente principal com Rm de 0.9 e dois outros componentes, em menor concentração, com Rm de 0.5 e 0.6, respectivamente. Os tres componentes eram corados simultaneamente pelo PAS e pelo Coomassie blue, embora reagissem apenas fracamente com o segundo corante. Esses resultados, associados à experiências de precipitação pelo ácido clorídrico e pela Con A, indicaram que tais componentes são de natureza glicopeptídica.

Essa fração, que também precipita na presença de albuminas metiladas, quando inoculada em coelhos e em carneiro, induziu a formação de anticorpos, que se mostraram capazes de dar reações de aglutinação com as formas epimastigotas e de imunofluorescência e imunoperoxidase com as formas epi-, tripo- e amastigotas do *T. cruzi*, mostrando que ela contém determinantes antigênicos de

superfície do parasito. A fração FAD foi também capaz de inibir completamente não só essas reações, como também as observadas entre os soros anti-FAD, anti-EL e anti-FA e as formas amastigotas da cepa Colombiana do parasito, indicando assim que a exemplo da fração FA, anteriormente isolada, a fração FAD contém determinantes antigênicos comuns à essas duas cepas do *T. cruzi* e provavelmente às demais cepas do parasito.

Os imunossoros anti-FAD não foram capazes de dar reações de precipitação com qualquer dos componentes da fração ou com as albuminas metiladas. Entretanto, anticorpos precipitantes para a fração FAD foram detectados nos soros de pacientes chagásicos e em soros de camundongos infectados com o *T. cruzi*, indicando que pelo menos alguns dos determinantes antigênicos contidos na fração FAD, estão representados durante o processo infeccioso.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afchain, D. & Capron, A. Etude préliminaire des antigènes solubles de *Trypanosoma cruzi*. Applications à la trypanosomiase expérimentale de la souris. Comptes Rendus Academic Sciences. Paris. Series D. 269: 272-274, 1969.

Afchain, D. & Capron, A. Analyse immunoelectrophorétique des antigènes solubles de *Trypanosoma cruzi*. Application à la trypanosomiase expérimentale de la souris. Gazeta Médica da Bahia. 71: 7-15, 1971.

Afchain, D.; Le Ray, D.; Fruit, J. & Capron, A. Comparative antigenic analysis of trypanosomes *Stercoraria*. Practical consequences. In: Proceedings, Third International Congress of Parasitology. Munchen. 216-217, 1974.

Afchain, D.; Fruit, J.; Yarzabal, L. & Capron, A. Purification of a specific antigen of *Trypanosoma cruzi* from culture forms. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27 (3): 478-482, 1978.

Allsopp, B. A.; Njogu, A. R. & Humphries, K. C. Nature and location of *Trypanosoma brucei* subgroup exoantigen and its relation to 4S antigen. Exp. Parasitol. 29: 271-284, 1971.

- Allsopp, B. A. & Njogu, A. R. Monosaccharide composition of the surface glycoprotein antigens of *Trypanosoma brucei*. Parasitol. 69: 271-281, 1974.
- Alves, M. J. M. & Colli, W. Agglutination of *Trypanosoma cruzi* by Concanavalin A. J. Protozool. 21(4): 575-578, 1974.
- Alves, M. J. M. & Colli, W. Glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*: Partial purification by gel chromatography. FEBS LETTERS. 52(2): 188-190, 1975.
- Araújo, P. M. F. Isolamento e caracterização de uma proteínase dos lisados de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. 1979.
- Archibald, A. R.; Baddiley, J. & Blumson, N. The theicoic acids. Adv. Enzimol. 30: 223, 1967.
- Bellucci, S. B. B. Investigação sobre a atividade biológica de uma fração solúvel de lisados de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 1979.

Brown, C. N. & Williamson, J. The chemical composition of trypanosomes. IV. Localisation of antigens in sub-cellular fractions of *Trypanosoma rhodesiense*. Exp. Parasitol. 15: 69-86, 1964.

Camargo, M. E. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 8: 227-234, 1966.

Clinton, P. A.; Ortiz-Ortiz, L.; Garcia, W.; Martinez, T. & Capin, R. *Trypanosoma cruzi*: Early immune response in infected mice. Exp. Parasitol. 37: 417-425, 1975.

Corsini, A. C.; Costa, M. G.; Oliveira, O. L. P.; Camargo, I. J. B. & Rangel, H. A. A fraction (FAD) from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes depress immune response in mice. Immunol. 40: 505-554, 1980.

Costa, M. G. Atividade proteínásica dos lisados de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 1977.

- Cross, G. A. M. Identification, purification and properties of variant-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol.* 71: 393-471, 1975.
- Cross, G. A. M. Antigenic variation in trypanosomes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26(6): 240-243, 1977.
- D'Alessandro, P. A. *Trypanosoma lewisi*: Production of exoantigens during infection in the rat. *Exp. Parasitol.* 32: 149-164, 1972.
- Desmet, G. Wane, A. & Mattern, P. Antigènes somatique and seriques mis evidence au cour de la trypanosomiase à *Trypanosoma gambiense*. *C. R. Soc. Biol.* 146: 1879-1886, 1970.
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A. & Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356, 1956.
- Esteves, M. B.; Sant'Anna, O. A.; Santos Annes, V. C. & Binaghi, R. A. Characterization and properties of an anaphylactic 7S antibody in sheep. *J. Immunol.* 112(2): 722-727, 1974.

- Fairbanks, G.; Steck, T. C. & Wallach, D. F. H. Electro-
phoretic analysis of the major polypeptides of the hu-
man erythrocyte. *Memb. Biochem.* 10: 2607-2617, 1971.
- Fernandes, J. F. & Castellani, O. Growth characteristics
and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. *Exp.*
Parasitol., 18: 195-202, 1966.
- Fife, E. H. & Kent, J. F. Protein and carbohydrate com-
plement fixing antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J.*
Trop. Med. Hyg. 9: 512-517, 1960.
- Fruit, J.; Afchain, D.; Petitprez, A. & Capron, A. *Trypa-*
nosoma cruzi : Location of a specific antigen on the
surface of bloodstream trypomastigote and culture epi-
mastigote forms. *Exp. Parasitol.* 45: 183-189, 1978.
- Gonçalves, J. M. & Yamaha, T. Immunochemical polisaccha-
ride from *Trypanosoma cruzi*. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 72:
39-44, 1969.
- Gonzalez Cappa, S. M.; Schmunis, G. A.; Traversa, O. C.;
Yanovisk, J. K. & Parodi, A. S. Complement fixation
test, skin tests and experimental immunization with an-
tigens of *Trypanosoma cruzi* prepared under pressure.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 17: 709-716, 1968.

- Gonzalez Cappa, S. M.; Cantarella, A. J.; Lajmanovich, S. & Segura, E. S. Experimental Chagas' disease. Studies on the stability of a protective antigen. J. Parasitol. 62(1): 130-131, 1976.
- Gottlieb, M. A carbohydrate-containing antigen from *Trypanosoma cruzi* and its detection in the circulation of infected mice. J. Immunol. 119(2): 465-470, 1977.
- Gottlieb, M. *Trypanosoma cruzi*: Identification of a cell surface polysaccharide. Exp. Parasitol. 45: 200-207, 1978.
- Herbert, W. J. & Lumsden, W. H. R. Single dose vaccination of mice against experimental infection with *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei*. J. Med. Microbiol. 1: 23-32, 1968.
- Herbert, W. J. & Inglis, M. D. Immunization of mice against *Trypanosoma brucei* infection by administration of released antigen absorbed to erythrocytes. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 67: 268, 1973.
- Kierszenbaum, F. & Budzko, D. B. Immunological properties of a trypanosomal lipopolisaccharide and its effects on the infection with *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. Immunol. Communic. 2: 265-276, 1973.

- Krøll, J. Tandem-crossed immunoelectrophoresis. In: A manual of quantitative immunoelectrophoresis. Ed. N. H. Axelson, J. Krøll and B. Weeke. UNIVERSITETSFORLAGET, Oslo-Bergen-Tromsø. 57-59, 1973.
- Lanham, S. M. & Taylor, A. E. R. Some properties of the immunogens (protective antigens) of a single variant of *Trypanosoma brucei brucei*. J. Gen. Microbiol. 72: 101-116, 1972.
- Lederkremmer, R. M.; Alves, M. J. M.; Fonseca, G. C. Colli, W. A lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* (epimastigote). Isolation, purification and carbohydrate composition. Biochem. Biophys. Acta. 444: 85-96, 1975.
- Lederkremmer, R. M.; Tanaka, C. T.; Alves, M. J. M. & Colli, W. Lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. Amide and ester linked fatty acids. Eur. J. Biochem. 74: 263-267, 1977.
- Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L. & Randel, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.

- Luderitz, O.; Westphal, O.; Staub, A. M. & Nikaido, H.
Isolation and chemical and immunological characterization of bacterial lipopolysaccharides. In: Microbial Toxins, Vol. 4 pp 145 (G. Weinbaum, S. Kadis and S. J. Ajl eds.) Academic Press, New York, 1971.
- McCarty, M. Pneumococci. In: Microbiology. Chapter 25. Second Edition (Harper & Row, Publishers, Inc.), 1973.
- Morrison, D. C. & Ulevitch, R. J. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. 93(2): 527-617, 1978.
- Muniz, J. & Freitas, G. Contribuição para o diagnóstico da Doença de Chagas pelas reações de imunidade. II. Isolamento de polissacarídeos de *Schizotrypanum cruzi* e outros tripanosomatídeos, seu comportamento nas reações de precipitação, fixação de complemento e de hipersensibilidade. Os "tests" de floculação (sublimado e formol-gel). Rev. Bras. Biol. 4: 421-438, 1944.
- Njogu, A. R. ; Humphries, K. C. The nature of the 4S antigens of the brucei subgroup trypanosomes. Exp. Parasitol. 31: 178-187, 1972.

- Organización Mundial de la Salud. Immunologia y enfermedades parasitarias. Informes de un Comité de Expertos de la OMS. Ginebra. (Séries de Informes Tecnicos nº 315), 1965.
- Ouchterlony, O. Immunodifusion and Immuno-electrophoresis. In: Weir, B. M. (eds.). Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Sci. Publ., Oxford pp. 665, 1967.
- Pereira, N. M.; Timm, S. L.; Da Costa, S. C. G.; Rebelo, M. A. & De Souza, W. *Trypanosoma cruzi*: Isolation and characterization of membrane and flagellar fractions. Exper. Parasitol. 46: 226-234, 1978.
- Pinho, R. T. Purificação de albumina humana por cromatografia de troca iônica para estudos imunoquímicos. Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 1977.
- Plescia, C. J. Preparation of antigens for eliciting antibody with nucleic acid specificity. In: Methods in Immunology. Vol. I, cap. XIII. (Eds. C. A. Williams and Chase). Academic Press. New York, 1967.

- Ramos, C.; Lamoy, E.; Pooli, M.; Rodriguez, M.; Perz, M. & Ortiz-Ortiz, L. *Trypanosoma cruzi*: Immunossupressed response to different antigens in the infected mouse. *Exp. Parasitol.* 45: 190-199, 1978.
- Rangel, H. A.; Araújo, P. M. F.; Repka, D. & Costa, M. G. *Trypanosoma cruzi* : Isolation and characterization of a procoainase. *Exp. Parasitol.* 1980 (in press).
- Repka, D. contribuição ao estudo imunológico das formas de cultivo do *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 1973.
- Repka, D.; Rangel, H. A.; Costa, M. G. & Bellucci, S. B. Immunoenzymological study of the lysates of the epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *Rev. Bras. Biol.* 39(3): 721-733, 1979.
- Repka, D.; Canargo, I. J. B.; Santana, E. M.; Cunha, W. M.; Sakurada, J. K. & Rangel, H. A. Surface antigenic determinant of epimastigote forms common to trypomastigote and amastigote forms of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Tropenmed. Parasitol.* 31(2): 239-246, 1980.

- Santana, H. M. Investigações sobre determinantes antigênicos da superfície das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 1977.
- Segura, E. L.; Cura, E. N.; Paulone, I.; Vasquez, C. & Cerisola, J. A. Antigenic make up of subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool. 21(4): 571-574, 1974.
- Segura, E. L.; Paulone, I.; Cerisola, J. & Gonzalez Cappa, S. M. Experimental Chagas' disease: Protective activity in relation with subcellular fractions of the parasite. J. Parasitol. 62(1): 131-133, 1976.
- Segura, E. L.; Vasquez, C.; Bronzina, A. & Campos, J. M. Antigens of the subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. I. Flagellar and membrane fractions. J. Protozool. 24(4): 540-543, 1977.
- Seneca, H. & Peer, P. Immunobiological properties of Chagastoxin (lipopolysaccharide). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 60: 610-620, 1966.
- Seneca, H.; Peer, P. & Hampar, B. Active immunization of mice with chagastoxin. (London). 209: 309-310, 1966.

- Sharon, N. & Lis, H. Lectins : Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*. 177: 949-959, 1972.
- Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the cell membrane. *Science*. 175: 720-731, 1972.
- Tizard, J., Nicolson, K. R.; Seed, J. R. & Hall, J. E. Biologically active products of african trypanosomes. *Microbiol. Rev.* Dec. 661-681, 1978.
- Uriel, J.; Webb, P.; Lapresle, C. Bulletin de la Société de Chimie Biologique. 42(11): 1285-1291, 1960.
- Vickerman, K. On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. *J. Cell. Sci.* 5: 163-194, 1969.
- Vickerman, K. & Luckins, A. G. Localisation of variable antigens in the surface coat of *Trypanosoma brucei* using ferritin-conjugated antibody. *Nature*. 224: 1125-1127, 1968.
- Wane, A.; Cosmet, G. & Seck, J. Identification de certains exoantigènes de *Trypanosoma gambiense* par électrophorèse en gel mixte de polyacrylamide agarose. *C. R. Soc. Sci.* 134: 1395-1398, 1971.

Williams, J. S. & Brown, C. N. The chemical composition of trypanosomes. *Exp. Parasitol.* 15: 44-68, 1964.

World Health Organization. Memoranda. Immunology of Chagas' Disease. *Bull. World Org.* 50: 459-472, 1974.

World Health Organization. Report of the first meeting of the scientific working group on Chagas' Disease. Buenos Aires, Argentina. 14-18 Nov. 1977.

World Health Organization. The membrane pathobiology of Tropical Diseases. Chapter V - UNDP/World Bank/WHO. Ed. Schwabe & Co., AG. Basel, 1979.