

CAMPINAS - 1986

St. Campinas responde a pedido final de
Tese defendida pelo candidato Edgar Zanolli
e aprovada pela Comissão Julgadora.

EDGARD ZANOLLI

"INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE NEURAMINIDASE DE T. CRUZI
POR SOROS DE CANUDONGOS INFECTADOS"

Tese apresentada ao curso de
Pós-Graduação em IMUNOLOGIA
do INSTITUTO de BIOLOGIA da
UNICAMP, para a obtenção do
grau de MESTRE.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Trabalho desenvolvido no Departamento de Microbiologia e
Imunologia do I.B. da UNICAMP, com auxilio financeiro de:
CNPq, FAPESP e CAPES.

ORIENTADOR: Prof.Dr. HUMBERTO DE ARAUJO RANGEL

CAMPINAS

1986

A meus pais,
pelos exemplos de humildade
e perseverança.

Ao meu irmão

A REJANE,
companheira inseparável
de todos os momentos.

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

- Ao Dr.Humberto de A.Rangel pela dedicação e liberalidade com que me orientou.
- Aos amigos Prof.Dr.Judith K.Klotzel, Prof.Dr.Alberto J.S.Duarte, Prof.Dr.Tomomasa Yano, Prof.Dr.Maria Cristina R.A.Barrera e Prof.Dr.Jorge E.Kalil pelas sugestões e pelo apôio, estímulo e confiança depositados durante o desenvolvimento de minha carreira até o presente.
- Aos Prof.Drs. Antonio Campos-Neto, Judith K.Klotzel, Julia K.Sakurada, Marcos G.Costa e M.Cristina R.A.Barrera pela análise e contribuições prestadas para o enriquecimento deste trabalho.
- A todos os colegas de pós-graduação, funcionários e docentes do Depto.de Microbiologia e Imunologia ...
- e em especial, para as amigas Maria Helena S.de Brito e Wirla M.S.C.Tamashiro pela presença valiosa em todos os instantes que convivemos juntos no departamento.

S U M Á R I O

1. Introdução.....	1
2. Materiais e Métodos.....	13
2.1. Obtenção de células.....	13
2.1.1. Células humanas.....	13
2.1.2. Células de camundongos.....	14
2.2. Preparação da lectina de amendoim (PNA).....	15
2.2.1. Obtenção dos extratos.....	15
2.2.2. Caracterização dos extratos.....	17
2.3. Obtenção de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	18
2.4. Extratos de tripomastigotas.....	21
2.5. Atividade de neuraminidase.....	21
2.5.1. Atividade sobre eritrócitos.....	22
2.5.2. Atividade sobre células mononucleares (MN).....	22
2.6. Atividade hemolítica e citotóxica.....	23
2.7. Inibição da atividade hemolítica.....	24
2.8. Inibição da atividade de neuraminidase por soros de camundongos.....	24
2.8.1. Obtenção dos soros.....	24
2.8.2. Teste de inibição.....	25
2.8.3. Absorção dos soros.....	26
2.8.4. Passagem dos soros em coluna de Proteína A- sepharose (SpA).....	26
3. Resultados.....	28
3.1. Obtenção e caracterização da PNA.....	28
3.2. Separação de tripomastigotas em gradiente	

de Ficoll-Hypaque.....	32
3.3.Detecção da atividade de neuraminidase nas várias frações do gradiente de densidade.....	34
3.4.Atividade de neuraminidase em tripomastigotas viáveis e lisados sobre eritrocitos.....	36
3.5.Atividade hemolítica dos extratos de tripomastigotas.....	39
3.6.Comparação entre as atividades de neuraminidases de <i>T.cruzi</i> (EST) e de <i>C.perfringens</i> (NCp) sobre eritrocitos humanos e de camundongos.....	42
3.7.Inibição da atividade de neuraminidase por soros de camundongos.....	44
3.8.Inibição da atividade de neuraminidase do EST após passagem dos soros de camundongos infectados em coluna de SpA.....	49
3.9.Atividade de neuraminidase de <i>T.cruzi</i> sobre células MN.....	51
4.Discussão.....	55
5.Conclusões.....	81
6.Resumo.....	83
7.Bibliografia.....	85

A B R E V I A Ç Õ E S *

BSA	Soroalbumina Bovina
E-ACA	Acido Epsilon-aminocapróico
EDTA	Acido Etilenodiaminotetracético
EBT	Extrato Bruto de Tripomastigotas
EST	Extrato Solúvel de Tripomastigotas
EIT	Extrato Insolúvel de Tripomastigotas
FCS	Soro Fetal Bovino
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
HBSS	Solução Salina Balanceada de Hanks
IFI	Imunofluorescência Indireta
MN	Mononucleares
NCp	Neuraminidase de <i>C.perfringens</i>
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PMSF	Fenil-metil-sulfonil Fluoreto
PNA	Aglutinina ou Lectina de amendoim (<i>A.hypogaea</i>)
SCI	Soro de Camundongos Infectados com <i>T.cruzi</i>
SNC	Soro Normal de Camundongos
SpA	Proteína A de <i>S.aureus</i> acoplada à Sepharose-4B
TV	Tripomastigotas Viáveis

* Todos os termos que designam materiais e reagentes de utilização frequente em trabalhos de pesquisa, foram abreviados de acordo com a nomenclatura da língua Inglesa, aceita internacionalmente. Os demais termos criados durante o desenvolvimento deste trabalho foram abreviados de acordo com a língua Portuguesa.

1. INTRODUÇÃO

Durante os estudos sobre as relações entre doenças parasitárias e sistema imune, muitos pesquisadores observaram que alguns protozoários poderiam parasitar o hospedeiro sem manifestações aparentes, enquanto que outros eram causadores de vários sintomas de doença. A incapacidade dos mecanismos de resistência do hospedeiro em controlar efetivamente estes parasitas, tem sido um grande desafio para os imunologistas. Atualmente, tem-se acentuado a necessidade de se adquirir conhecimentos fundamentais, em busca de novas alternativas para o controle das doenças parasitárias causadas por protozoários. Desta forma, muitos experimentos precisam ser elaborados para a melhor compreensão de quais mecanismos da resposta imune participam de tais interações, e se estes podem ser alterados pelos parasitas que geralmente escapam das defesas do hospedeiro.

Os estudos básicos recentes que têm facilitado o esclarecimento dos mecanismos regulatórios da resposta imune, poderão dar origem futuramente, a métodos de potenciação ou de modificação desta resposta, de forma a controlar ou eliminar efetivamente muitas doenças parasitárias. Para isso, torna-se necessária a análise de quais fatores do parasita estariam relacionados com a patogenia e distúrbios imunológicos, observados na moléstia humana e nas infecções experimentais de animais. Em decorrência desse fato, a maior atividade de pesquisa em imunoparasitologia nos últimos anos, tem-se concentrado na identificação, isolamento e caracterização de estruturas derivadas

dos parasitas. A obtenção de antígenos parasitários, pode ter aplicação em imunizações, análise imunopatológica e imunodiagnóstico, sendo que os mesmos, têm-se tornado valiosíssimos para o aprimoramento cada vez maior, das pesquisas básicas e aplicadas na compreensão das doenças parasitárias.

Entre as principais doenças causadas por protozoários, podemos destacar as várias formas de tripanosomíases, que representam sérios problemas de saúde e atingem a população de extensas áreas dos continentes Africano e Americano. Além do homem, muitas espécies de mamíferos silvestres e domésticos são portadores destas infecções, constituindo assim, um grande reservatório de parasitas (David, 1983).

A penetração dos parasitas no organismo, normalmente se faz através de mucosas ou locais de descontinuidade da pele. Entretanto, nas infecções experimentais de animais, tanto a via de inoculação quanto a quantidade de tripanosomas, podem variar de acordo com os diferentes modelos de estudo (Cohen, 1983; Mahmaud, 1983). Esta prática resulta em fenômenos semelhantes aos que ocorrem durante a infecção natural, embora as analogias feitas entre modelos experimentais e a doença humana ainda sejam muito discutidas.

A tripanosomíase Americana é causada pelo protozoário flagelado, denominado **Trypanosoma cruzi** (Chagas, 1909), cujos vetores naturais ou das zonas rurais, são insetos hematófagos da família **Triatominaea**. Entretanto, nos grandes centros urbanos estes parasitas podem ser disseminados na população humana, através de transfusões de sangue (Scott & Snary, 1983). Após a penetração no hospedeiro, as formas tripomastigotas metacíclicas invadem diversas células, no interior das quais, transformam-se em formas esféricas denominadas de

amastigotas. Depois de vários ciclos de divisão binária, as formas amastigotas multiplicam-se e a seguir diferenciam-se novamente em tripomastigotas, que são liberados nos tecidos após a ruptura das células infectadas. Estas formas tripomastigotas teciduais podem invadir novas células nas proximidades, ou então difundir-se por todo o organismo através da circulação, iniciando novos ciclos intracelulares (Brener, 1962; Scott & Snary, 1983). Qualquer tecido pode ser parasitado, mas pseudo-cistos (ninhos de amastigotas) são frequentemente encontrados no baço e em fibras musculares lisas, estriadas e cardíacas (Andrade, 1983).

Durante a fase aguda da doença, caracterizada pela presença de grande número de parasitas na circulação, o hospedeiro pode não apresentar sintomas, porém em alguns casos, principalmente em crianças ou animais infectados experimentalmente, podemos verificar uma série de transtornos. Tais sintomas incluem geralmente: febre, dores musculares, aumento do fígado, baço e linfonodos, e ocasionalmente miocardite e imunodepressão (Prata, 1968; Teixeira e cols, 1978; Brener, 1980; Scott & Snary, 1983). Depois da fase aguda, a parasitemia decresce a níveis pouco detectáveis, e apesar de a cura espontânea nunca ocorrer, muitos pacientes permanecem assintomáticos por tempo indeterminado. As variações de tais manifestações estão associadas com diferentes regiões geográficas, em função da existência de cepas distintas de *T.cruzi* ou de fatores ligados à própria população das zonas endêmicas (Salgado & Pellegrino, 1968; Scott & Snary, 1983).

As tripanosomíases Africanas são causadas por várias outras espécies de protozoários flagelados, que distinguem-se do *T.cruzi* não

só através de seus vetores, mas pelo fato de se multiplicarem em meio extra-celular no hospedeiro mamífero. Desta forma, estes parasitas são detectados na circulação sanguínea ao longo de todo o período de infecção (Vickerman & Barry, 1983). Em decorrência deste fato, os sintomas apresentados nas duas formas da doença são semelhantes durante a fase aguda, tornando-se bem diferenciados somente quando instalado o processo crônico da infecção. Portanto a alteração dos níveis celulares e de outros componentes do plasma, é uma característica comum destas doenças, sendo demonstrada no instante em que grandes quantidades de parasitas são detectadas na circulação (Greenwood, 1974; Assoku e cols, 1977; Cardoso & Brener, 1980; Repka e cols, 1985). Sintomas de anemia têm sido demonstrados durante as tripanosomiasas, tanto humana quanto de animais, e a severidade destes depende da espécie de parasita e de outros fatores pouco esclarecidos inerentes ao próprio hospedeiro (ILRAD reports, 1984).

Ikede e cols (1977), através de estudos em camundongos infectados por *T.brucei* ou *T.congolense*, verificaram uma diminuição da meia-vida circulatória, de eritrócitos singeneicos marcados com radioisótopo, quando transfundidos imediatamente após a infecção. Esse período é acompanhado de um aumento da atividade de macrófagos (Murray e cols, 1974a), sugerindo que tais células podem ser as responsáveis pela remoção dos eritrócitos da circulação (Murray e cols, 1974a; Ikede e cols, 1977).

Cardoso & Brener (1980), descreveram a ocorrência de anemia, além de leucopenia e trombocitopenia, em camundongos infectados experimentalmente com as cepas Y e CL de *T.cruzi*. Este evento coincide com a fase aguda, quando grandes quantidades de parasitas são

detectados na circulação. Os sintomas mais acentuados ocorreram com a cepa Y, e os níveis dos componentes hematológicos retornaram ao normal, assim que os animais entraram na fase crônica da infecção (Cardoso & Brener, 1980).

Nas anemias de etiologias diferentes, geralmente os eritrocitos são lisados no próprio compartimento intravascular, porém este fenômeno raramente é observado durante as tripanosomíases (Assoku, 1975; Esievo e cols, 1982). Nestes casos, a destruição de eritrocitos ocorre provavelmente após a sua remoção da circulação, quando estes são reconhecidos pelos macrófagos como alterados ou danificados (Mamo & Holmes, 1975; Durocher e cols, 1975; Ikede e cols, 1977). Devemos admitir entretanto, que a anemia observada durante as tripanosomíases, ainda é pouco caracterizada, envolvendo diferenças entre hospedeiros, ou até mesmo entre espécies distintas de tripanosomas. A importância relativa de cada um dos fatores envolvidos, também é bastante desconhecida.

Além de alterações hematológicas, muitos autores observaram que durante as infecções experimentais de camundongos com espécies diferentes de tripanosomas, vários distúrbios imunológicos estariam ocorrendo. Dois fenômenos mais frequentes foram estudados inicialmente: a) o aumento da resposta humoral a antígenos não relacionados com os parasitas, e b) a supressão posterior da resposta a vários estímulos antigênicos.

Diversos trabalhos foram elaborados na tentativa de se explicar os mecanismos de supressão observados durante as tripanosomíases. Murray e cols (1974), através de um estudo detalhado em camundongos infectados com *T.brucei*, concluíram que a imunodepressão estaria

associada com alterações do Sistema Mononuclear-Fagocitário, afetando paralelamente, as funções de linfócitos B (Murray e cols, 1974a,b). O mesmo estado de tolerância, envolvendo estas células na resposta a antígenos T-dependentes e independentes, foi observado por outros pesquisadores durante a infecção de camundongos por *T.cruzi* (Clinton e cols, 1975; Ramos e cols, 1978). Através dessas observações estabeleceu-se que durante a fase aguda da infecção, ocorreria uma ativação policlonal de linfócitos, causando aumento dos níveis de anticorpos dirigidos contra vários determinantes. Depois de um período de intensa proliferação celular, ocorreria a exaustão do sistema que deixaria de responder a outros estímulos, resultando na imunodepressão (Clinton e cols, 1975; Corsini e cols, 1977; Ortiz-Ortiz e cols, 1980). Outra observação bastante frequente, resultante da ativação policlonal durante as tripanosomíases experimentais, é o fenômeno de autoimunidade (Kobayakawa e cols, 1979), que poderia estar favorecendo a debilitação profunda do hospedeiro e tornando-o imunodeprimido.

Estes dados têm incentivado as pesquisas básicas sobre as relações do hospedeiro com tais parasitas, que normalmente entram em contato direto com as células imunocompetentes através da circulação. Ramos e cols (1979), por meio de estudos "in vitro", verificaram uma diminuição da resposta mitogênica em células esplênicas de camundongos infectados por *T.cruzi*. De forma interessante, estas células além de não responderem efetivamente aos agentes mitogênicos, foram capazes de bloquear a mesma resposta de células de camundongos normais. Ao tentarem caracterizar o tipo de célula envolvida no fenômeno, os autores demonstraram que tal evento era mediado por células T-supressoras (Ramos e cols, 1979). Entretanto, dados contraditórios

foram obtidos posteriormente por Kierszenbaum (1982), que atribuiu essa função à macrófagos ativados, provavelmente através da liberação de prostaglandinas.

Simultaneamente, foram publicados trabalhos referentes à existência de uma substância supressora, em soros de camundongos infectados por **T.cruzi** (Cunningham e cols, 1978, 1980). Uma série de experimentos foram elaborados com a finalidade de se isolar e caracterizar esta substância supressora (Cunningham & Kuhn, 1980a,b,c), que culminaram entretanto, com a incapacidade dos autores em reproduzir os mesmos dados, após a renovação de seus animais de laboratório (Tarleton & Kuhn, 1984).

Outros autores confirmaram a ocorrência de supressão, por meio de experimentos "in vitro", ao estudarem a resposta mitogênica de linfócitos obtidos de camundongos infectados por **T.cruzi** (Kierszenbaum & Hayes, 1980; Hayes & Kierszenbaum, 1981; O'Daly e cols, 1984; Lalonde e cols, 1985), ou utilizando células de animais normais cultivadas em presença de extratos do parasita (Maleckar & Kierszenbaum, 1983).

Quanto à ativação policlonal, Greenwood (1974) já havia proposto inicialmente, que a hipergamaglobulinemia detectada em pacientes com diversas formas de malária e de tripanosomíases, era devido à liberação de um mitógeno específico para células B, pelos próprios parasitas. Posteriormente, Assoku e cols (1977), publicaram dados referentes à associação da ativação policlonal com ácidos graxos liberados após a lise dos parasitas na circulação, durante as tripanosomíasis Africanas. O fato mais relevante desses trabalhos, foi a constatação de que esses ácidos graxos, caracterizados como sendo

tóxicos para vários tipos de células, eram também potentes ativadores de linfócitos "in vitro", em concentrações sub-citotóxicas (Tizard & Holmes, 1976; Tizard e cols, 1977; Assoku e cols, 1979). De acordo com estes fatos, podemos verificar que a ativação policlonal e a imunossupressão estão intrinsecamente associadas, pois ambas se manifestam de forma consecutiva na fase aguda da infecção, e um mesmo fator ativador da resposta imune, pode vir a se tornar tóxico e depressivo com o aumento da concentração.

Através de estudos "in vivo", Corsini & Costa (1981), demonstraram que a injeção de extratos de formas sanguíneas de *T.cruzi* em camundongos normais, produziu os mesmos efeitos de ativação policlonal, seguida de supressão, observados durante a infecção experimental (Corsini & Costa, 1981a,b).

Todos estes dados têm incentivado as pesquisas de isolamento e caracterização imunoquímica de estruturas antigênicas de tripanosomas, além das interações entre estes parasitas e hospedeiros, observadas durante as infecções experimentais. Com relação às tripanosomíasis Americanas, maiores interesses foram dirigidos para os componentes do parasita, com atividades biológicas diretamente relacionadas com a indução de resistência e proteção, ou com os mecanismos de penetração e escape da resposta imune do hospedeiro (Nogueira e cols, 1980; Krettli, 1982; Krettli & Brener, 1982; Araújo, 1984).

Pelo que foi constatado até o momento, parece que apesar da existência de uma resposta detectável de anticorpos dirigidos contra componentes de superfície dos parasitas, o hospedeiro não é capaz de eliminá-los definitivamente. Vários pesquisadores demonstraram que a imunização ativa ou a transferência passiva de anticorpos, confere

apenas resistência parcial em animais inoculados com **T.cruzi** (Brener, 1980; Krettl, 1982; Araújo & Tighe, 1984).

Uma série de trabalhos foi publicada, a respeito do isolamento e caracterização de antígenos presentes em lisados de diversas formas evolutivas de **T.cruzi** (Repka e cols, 1979, 1980; Colli e cols, 1981; Nogueira e cols, 1981, 1982). Alguns componentes com atividades biológicas definidas foram descritos, tais como proteases (Bongertz & Hungerer, 1978; Rangel e cols, 1980a,b) e outros, envolvidos com a penetração celular ou resistência à fagocitose (Zingales e cols, 1982; Nogueira, 1983). Pereira (1983), demonstrou a existência de uma atividade de neuraminidase (sialidase), provavelmente associada com distúrbios observados na fase inicial da infecção experimental de camundongos por **T.cruzi** (Pereira, 1983a,b). Embora não tenha sido isolada a enzima, existem evidências de que esta atividade esteja diretamente relacionada com a glicoproteína de 90.000 daltons (90K), descrita anteriormente, como sendo uma estrutura de superfície do parasita (Nogueira, 1983).

Diversos parâmetros que foram constatados, apóiam a hipótese de ocorrência da atividade de neuraminidase de **T.cruzi**: a) Moléculas de ácido Siálico são liberadas de glicoproteínas ou da superfície de eritrocitos, durante a incubação "in vitro", em presença de formas tripomastigotas (Pereira, 1983a); b) Este efeito é bloqueado pela adição de substratos específicos ao sistema (Pereira, 1983b); c) Eritrocitos de camundongos infectados, ou depois do contato "in vitro" com formas tripomastigotas, são aglutinados pela lectina de amendoim (**Arachis hypogaea**) (Pereira, 1983a,b), a qual liga-se especificamente a resíduos de D-galactose existentes em estruturas de superfície dos

eritrocitos, somente após a remoção de ácido Siálico (Lotan e cols, 1975); d) Recentemente, os mesmos efeitos foram demonstrados sobre células endoteliais e de miocárdio de ratos, durante o cultivo na presença de formas tripomastigotas de **T.cruzi** (Libby e cols, 1986).

A existência de atividade de neuraminidase também foi sugerida para as tripanosomíases Africanas, com a observação da elevação dos níveis de ácido Siálico no plasma e diminuição na superfície de eritrocitos, durante a infecção de animais com **T.vivax** (Esievo e cols, 1982). Além disso, os dados mencionados anteriormente, sobre o decréscimo da vida média dos eritrocitos durante a infecção por **T.congolense** e **T.brucei** (Ikede e cols, 1977), ou os distúrbios hematológicos observados na infecção experimental por **T.cruzi** (Cardoso & Brener, 1980), parecem convergir para o mesmo ponto em questão. Todos esses fenômenos foram observados na fase aguda da infecção, quando quantidades maciças de parasitas entram em contato com componentes plasmáticos. A remoção destas células da circulação, pode estar associada a alterações provocadas por produtos dos tripanosomas, dentre os quais a própria neuraminidase.

Esta amplamente estabelecido, que a remoção de ácido Siálico da superfície de células, ou de glicoproteínas plasmáticas, diminui drasticamente a vida média destes elementos na circulação, sendo os mesmos sequestrados principalmente pelo fígado e pelo baço (Gattegno e cols, 1974; Durocher e cols, 1975; Bocci, 1976). Entretanto outros fenômenos podem resultar também da remoção do ácido Siálico de superfícies celulares, tais como: a) Ativação da via alternativa do complemento por eritrocitos (Fearon, 1978; Rademaker e cols, 1981; Brown e cols, 1983); b) Modificações na imunogenicidade e na

reatividade antigênica de eritrocitos e linfocitos (Grothaus e cols, 1971; Bird & Wingham, 1971; Rosenberg e cols, 1972; Barth & Singla, 1974); c) Alterações no padrão de recirculação de linfocitos (Woodruff & Gesner, 1969; Samlowski e cols, 1984; Rosen e cols, 1985) ou de estimulação dos mesmos por mitógenos (Novogrodsky e cols, 1975; Sharon, 1983).

A maioria das estruturas de superfície celular contendo polissacarídeos acoplados, apresentam-se ricas em ácido Neuramínico, que frequentemente ocupam a posição distal em relação ao plano da membrana (Spiro, 1963a,b; Corfield & Schauer 1979). Os radicais ácidos destas moléculas são desprotonados em pH fisiológico, conferindo carga negativa às células (Nordling e cols, 1972). Esta condição, torna pouco acessíveis determinadas estruturas de superfície, e por essa razão, as moléculas de ácido Siálico devem participar ativamente nas interações celulares que se fazem através de receptores de membrana (Czop e cols, 1978; Jancik e cols, 1978; Hood e cols, 1978). Alguns ensaios têm sido elaborados recentemente, com o objetivo de se constatar a real importância do ácido Neuramínico e outros carboidratos, na integridade das estruturas que participam de interações moleculares e celulares, e que compõem uma resposta imune efetiva (Rosen e cols, 1975; Sharon, 1983, 1984; Samlowski e cols, 1984; Klerx e cols, 1986).

Baseando-se nos fatos relatados, o presente trabalho foi realizado com a finalidade de estudar a atividade de neuraminidase de **T.cruzi** sobre eritrocitos e células mononucleares, através da interação com a lectina de amendoim (**A.hypogaea**). Utilizou-se como fonte de neuraminidase, as formas tripomastigotas obtidas de

sobrenadantes de culturas de células HeLa, infectadas com a cepa Y de **T.cruzi**. A partir desse material preparou-se suspensões de parasitas ou extratos dos mesmos, que foram utilizados nos testes de detecção da atividade de neuraminidase sobre células, e de inibição desta, por anti-soros obtidos de camudongos infectados experimentalmente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DE CÉLULAS

2.1.1.Células Humanas: Eritrocitos e células Mononucleares (MN) humanos, foram obtidos de amostras de sangue periférico de indivíduos normais, colhidas com heparina (10 U/ml - Roche, França). Amostras de 10 ml de sangue foram centrifugadas a $400 \times g$ (J21C-Beckman, USA), por 10 minutos, a 4°C , e os leucocitos localizados na porção superior do sedimento, foram aspirados com auxílio de uma pipeta Pasteur e removidos para outro tubo, contendo 2 ml de Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS - pH 7,2), preparada de acordo com Dresser (1978). Esta suspensão de células foi centrifugada a $700 \times g$, 20 min, sobre igual volume de solução de Ficoll-Hypaque (2,5 partes de Ficoll 10% - Sigma, USA + 1 parte de Hypaque 50% - Winthrop, USA), de densidade igual a $1,077 \text{ g/ml}$ (Boyum, 1976). Depois da centrifugação, as células MN localizadas na interfase do gradiente foram aspiradas e colocadas em outro tubo. Estas foram então lavadas por 3 vezes em HBSS, a $400 \times g$, 5 min, e ressuspensas no final, a uma concentração de 4×10^6 células/ml na mesma solução. O acerto da concentração foi realizado através de contagens de células ao microscópio, em câmara hemocitométrica de Neubauer (Herka, Al.Ocidental).

Parte do sedimento de eritrocitos, resultante da centrifugação da amostra inicial de sangue, foi separada em outro tubo

e os eritrocitos foram lavados várias vezes em Solução Salina Tamponada (PBS = NaCl 0,15M; PO₄ 0,01M - pH7,2), a 400 x g, 5 min. Após estas lavagens, os eritrocitos foram ressuspensos à concentração final de 5% em volume, no mesmo tampão.

As suspensões de eritrocitos e de células MN, foram sempre utilizadas imediatamente após a sua preparação. Em alguns experimentos com eritrocitos, selecionou-se doadores de grupos sanguíneos ABO e Rh conhecidos.

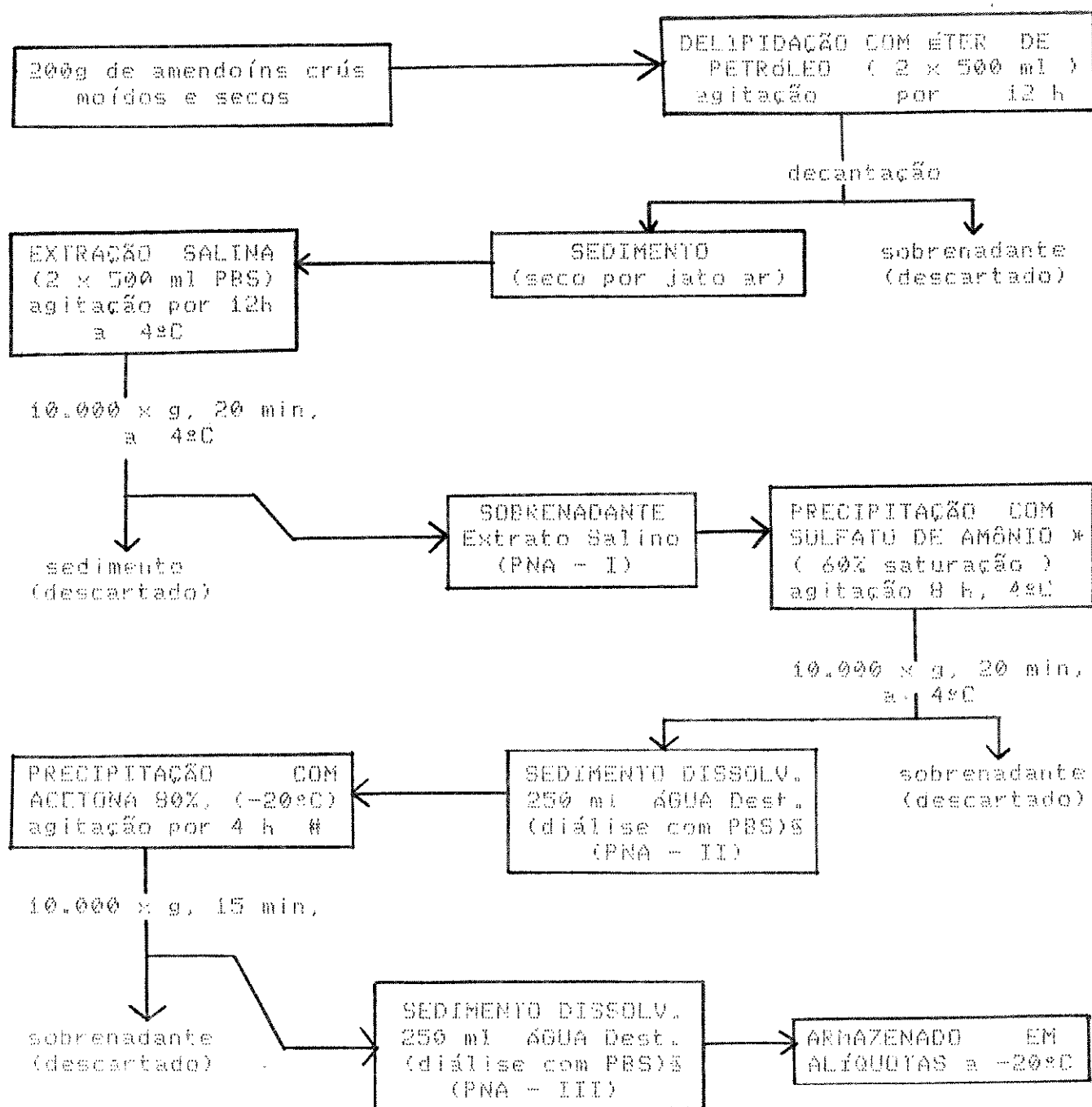
2.1.2.Células de Camundongos: Determinados experimentos foram realizados com células de camundongos de linhagens isogênicas, CBA, C57BL10 e de seus híbridos (CBA x C57BL10)F1, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, e mantidos em nossas dependências.

Suspensões de eritrocitos e de células MN foram preparadas da mesma maneira que as células humanas, a partir de amostras de sangue colhidas do plexo braquial. Células de baço também foram colhidas dos camundongos, após deslocamento cervical. Os órgãos foram colocados em tubos, contendo 2 ml de HBSS e depois da compressão dos mesmos contra o fundo dos tubos, com auxílio de um êmbolo de vidro, as células em suspensão foram removidas e centrifugadas sobre gradiente de Ficoll-Hypaque ($d = 1,077 \text{ g/ml}$), de forma idêntica às células humanas. Finalmente, as células foram lavadas em HBSS, a concentração celular foi acertada para 4×10^6 células/ml, e utilizadas imediatamente nos experimentos.

2.2. PREPARAÇÃO DA LECTINA DE AMENDOIM (PNA)

2.2.1. A lectina de amendoim (*Arachis hipogaeae*) é amplamente utilizada na detecção de resíduos D-galactosídicos, encontrados frequentemente na estrutura de glicoproteínas ou de glicolipídeos de superfícies celulares ou do plasma (Glossmann & Neville 1971; Sharon, 1983). A sequência esquematizada a seguir, representa o protocolo de preparação do extrato de amendoim, contendo atividade de lectina, segundo método de Lotan e cols (1975), com algumas modificações (Esquema I).

ESQUEMA I:



* $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Grade III-Sigma,USA ; # Acetona p.a. Merck,Brasil;
§ Tubos de diálise :Sigma,USA ;

O extrato concentrado com Sulfato de Amônio (PNA - II), depois de dialisado contra PBS, apresentou-se turvo e com coloração escura após congelamento. Este aspecto persistiu mesmo depois de centrifugação a $10.000 \times g$, por 30 min, e por esta razão procedeu-se a precipitação com Acetona 80%. No final, depois de nova diálise, obteve-se uma solução límpida e de coloração castanho-clara (PNA-III), que foi esterilizada por filtração (Millipore 0,22 μm - USA) e armazenada em alíquotas, a $-20^{\circ}C$. As amostras permaneceram estáveis, sem decréscimo do título hemaglutinante por mais de um ano.

2.2.2.Caracterização dos Extratos: As dosagens de proteínas foram realizadas nas três preparações de PNA, pelo método de Lowry e cols (1951), modificado por Schacterle & Pollack (1972).

Para os testes de atividade de lectina, utilizou-se eritrocitos humanos (O, Rh+), tratados ou não com neuraminidase de *C.perfringens* (Type VI - Sigma, USA). Em um tubo plástico (7 x 40 mm), adicionou-se 0,2 ml de suspensão de eritrocitos a 5% em PBS-pH 7,2, a igual volume de neuraminidase (10 mU/ml) diluída na mesma solução. Esta mistura foi incubada a $37^{\circ}C$, por 1 hora e depois de centrifugada a $400 \times g$, por 5 min, descartou-se o sobrenadante. Os eritrocitos foram então lavados por centrifugação, 3 vezes em PBS. Depois de lavados, ressuspendeu-se os eritrocitos à concentração final de 2%, em PBS contendo 0,2% de soroalbumina bovina (BSA - Fração V-Sigma, USA). O controle contendo apenas eritrocitos em PBS, recebeu o mesmo tratamento, desde o início do experimento. Estas suspensões foram então utilizadas na titulação das amostras de PNA.

Em placas de microaglutinação de fundo cônico (Costar, USA), contendo 0,025 ml de PBS por orifício, foram feitas diluições seriadas de cada amostra, com auxílio de alças diluidoras de Takatsi (Inlab, Brasil) de 0,025 ml. As amostras foram diluídas em duplicatas, sendo que uma fileira recebeu por orifício, 0,025 ml de eritrocitos a 2% tratados com neuraminidase. A outra fileira recebeu as mesmas quantidades por orifício, de eritrocitos tratados apenas com PBS. As placas foram agitadas por rotação durante alguns segundos, e depois mantidas em repouso à temperatura ambiente. Efetuou-se as leituras, após uma hora e os resultados positivos foram expressos em títulos aglutinantes dos extratos, considerando-se a maior diluição capaz de aglutinar os eritrocitos.

Além da detecção da atividade aglutinante dos extratos foram realizados também, testes de inibição da lectina por carboidratos conhecidos. Desta forma, algumas suspensões de eritrocitos foram preparadas em PBS, contendo D-Galactose, Lactose, D-Glucose ou Sacarose (Sigma, USA) em diversas concentrações, antes da distribuição na placa de microaglutinação. Considerou-se inibidora, a concentração de açúcar capaz de bloquear a aglutinação de eritrocitos tratados com neuraminidase, reduzindo os títulos de diluição dos extratos em mais de 4 casas.

2.3. OBTENÇÃO DE FORMAS TRIPONASTIGOTAS DE *T.cruzi*

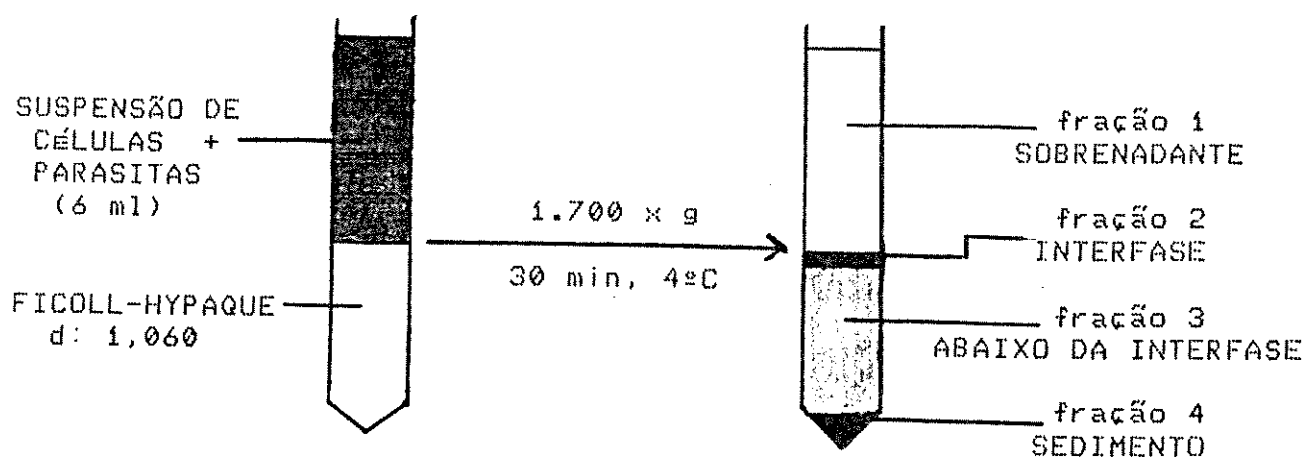
Amostras enriquecidas de tripomastigotas foram obtidas de sobrenadantes de culturas de células HeLa, infectadas com *T.cruzi* (cepa Y), através da centrifugação sobre gradiente de Ficoll-Hypaque.

Culturas de células HeLa, mantidas por passagens periódicas de 3 a 4 dias em meio RPMI 1640 (Gibco, USA), contendo 10% de soro fetal bovino (FCS; Microbiológica, Brasil), foram inoculadas inicialmente com formas tripomastigotas, obtidas de plasma de camundongos infectados com *T.cruzi*, colhidos durante o pico de parasitemia. As culturas foram mantidas em frascos estéreis a 37°C, em estufa de atmosfera úmida e 5% de CO₂ (Newbrunswick, USA), por um período de 6 dias. A partir dos sobrenadantes destas culturas contendo grande quantidade de parasitas, novas partidas de células foram infectadas, estabelecendo-se assim uma cultura sincronizada.

Os sobrenadantes de várias culturas (200 a 300 ml), foram aspirados a cada 3 ou 4 dias, e centrifugados a 1.700 x g, por 10 min. Após a remoção dos sobrenadantes, os sedimentos que continham células e parasitas, foram reunidos em um mesmo tubo, ressuspendendo-se em 10 a 15 ml de RPMI 1640 sem soro. Além de formas tripomastigotas, esta suspensão continha células HeLa, destacadas do fundo dos frascos de cultura e formas amastigotas liberadas em consequência do rompimento de algumas destas células.

Amostras contendo cerca de 6 ml desta suspensão concentrada, foram colocadas em tubos, sobre 3 ml de solução de Ficoll-Hypaque de densidade igual a 1,060 g/ml (Titto e cols, 1982). Os tubos foram então centrifugados a 1.700 x g, por 30 minutos a 4°C, e no final, todas as frações do gradiente foram aspiradas de acordo com o esquema a seguir (Esquema II):

ESQUEMA II:



Estas frações foram lavadas separadamente por 3 vezes em HBSS, a 1.700 x g, por 10 min e no final, os sedimentos foram ressuspensos em 1 ml desta solução. Determinou-se então o número de células e parasitas, através das contagens de cada amostra ao microscópio, utilizando-se câmara hemocitométrica de Neubauer.

Nos experimentos com tripomastigotas viáveis (TV), estes foram mantidos em HBSS e utilizados imediatamente após a obtenção. Entretanto, as preparações de parasitas lisados, foram mantidas em PBS ou HBSS e congeladas a -20°C, até o momento de uso. As amostras enriquecidas de tripomastigotas, sempre foram ajustadas a uma concentração de 5×10^7 parasitas/ml.

2.4. EXTRATOS DE TRIPOMASTIGOTAS

As várias amostras enriquecidas de tripomastigotas armazenadas a -20°C , quando descongeladas à temperatura ambiente apresentavam partículas em suspensão, equivalentes a agregados de fragmentos de parasitas lisados. Após a homogeneização com o auxílio de uma pipeta Pasteur, adicionou-se um inibidor de proteases, Fenil-Metil-Sulfonil Fluoreto (PMSF), à concentração final de 1mM. Estas suspensões receberam a denominação de Extrato Bruto de Tripomastigotas (EBT), que apesar do aspecto turvo, desapareceram os agregados.

A centrifugação do EBT a $10.000 \times g$, 15 min, a 4°C , resultou em 2 frações: um sobrenadante límpido e um sedimento viscoso. Ambos foram separados e o sobrenadante recebeu a denominação de Extrato Solúvel de Tripomastigotas (EST); o sedimento, depois de ressuspensão no volume inicial, em PBS ou HBSS contendo PMSF 1mM, foi denominado Extrato Insolúvel de Tripomastigotas (EIT). Estes extratos EBT, EST e EIT, e em algumas ocasiões, suspensões de TV, foram utilizados nos experimentos, de detecção da atividade de neuraminidase de *T.cruzi*, sobre eritrocitos e células MN.

2.5. ATIVIDADE DE NEURAMINIDASE

Todos os experimentos em que pretendia-se manter a viabilidade de tripanosomas ou de células MN, foram realizados em HBSS (pH 7,2). Os demais testes com eritrocitos e extratos de tripanosomas, foram realizados com PBS. O controle positivo era constituído de uma

solução de neuraminidase de *C.perfringens* (NCp), contendo 5 mU/ml. Qualquer que seja o tampão utilizado, em todas as preparações, adicionou-se PMSF à concentração final de 1mM, excetuando-se aquelas em que a sua omissão ou adição de outros compostos foi especificada.

2.5.1.Atividade sobre eritrocitos: Em tubos plásticos (10 x 50mm), foram adicionados 200 ul de suspensão de eritrocitos humanos ou de camundongos, a 5% em PBS e após centrifugação a 400 x g, 5 min, os sobrenadantes foram aspirados. Foram adicionados ao sedimento, 200 ul de suspensão de TV ou dos extratos EBT, EST e EIT e os controles receberam igual volume de tampão ou de NCp. Os tubos foram então homogeneizados e incubados em banho-maria a 37°C, por vários períodos de tempo. No final das incubações, os eritrocitos foram lavados 2 vezes em PBS, a 400 x g, 5 min, e ressuspensos a 2% em PBS-BSA 0,2% .

A atividade de neuraminidase sobre os eritrocitos foi detectada através da aglutinação pela PNA, baseando-se na mesma metodologia utilizada para a caracterização da lectina, descrita anteriormente.

2.5.2.Atividade sobre Células MN:O procedimento para a incubação das células MN com TV ou com EBT, EST e EIT, foram semelhantes ao utilizado para os eritrocitos. Entretanto, as leituras dos títulos aglutinantes de lectina foram efetuadas ao microscópio comum, entre lâmina e lamínula. Antes da adição da lectina, a viabilidade das células foi verificada pela exclusão por Azul de Trypan (Sigma, USA), 0,4% em PBS despresando-se as preparações com viabilidades celulares abaixo de 70%.

2.6. ATIVIDADE HEMOLÍTICA E CITOTÓXICA

No decorrer dos experimentos, observou-se a ocorrência de hemólise em alguns tubos contendo eritrocitos e extratos de tripomastigotas. Após a repetição controlada dos mesmos, constatou-se que esta atividade hemolítica era devida a algum fator liberado pela lise dos parasitas. Desta forma, em alguns experimentos mediu-se a atividade hemolítica, simultaneamente à de neuraminidase, nos sobrenadantes das primeiras lavagens dos eritrocitos, depois das incubações com os extratos sob condições estéreis.

Determinou-se a atividade hemolítica nos sobrenadantes, por meio da leitura espectrofotométrica das absorbâncias, em comprimento de onda igual a 420 nm. As leituras obtidas foram transformadas em porcentagens de lise, pela multiplicação por um fator, que foi calculado a partir de uma curva padrão de hemólise. Esta curva foi traçada com os resultados das leituras dos sobrenadantes, obtidos após a lise de quantidades conhecidas de eritrocitos com água destilada.

Em decorrência dessa atividade sobre eritrocitos, testou-se também a viabilidade de células MN, após incubação em presença de tripomastigotas viáveis e lisados. Amostras de 20 microlitros de suspensões de células MN, foram misturadas com igual volume de uma solução de Azul de Tripan 0,4% em PBS. A porcentagem de células viáveis foi determinada através de contagens ao microscópio comum, em câmara de Neubauer, após cada período de incubação.

2.7. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Alguns testes comparativos, das atividades de neuraminidase e hemolítica, dos extratos EST e EIT sobre eritrocitos, foram elaborados em presença de certas substâncias ou após desnaturação pelo aquecimento. As substâncias utilizadas foram: Etilenodiaminotetracetato de Sódio (EDTA) 15 mM; Azida Sódica (NaN₃) 0,1% ; Fenil-Metil-Sulfonil Fluoreto (PMSF) 1mM (todos adquiridos de Sigma, USA); e Ácido Epsilon-Aminocapróico (E-ACA) 20 mM (NIKKHO, Brasil). Algumas amostras de EST e EIT, foram tratadas por aquecimento em banho de água fervente, durante 5 minutos, sem adição de substâncias inibidoras. Após incubação dos eritrocitos com os extratos, a 37°C por 8 horas, a atividade hemolítica foi determinada nos sobrenadantes que foram separados por centrifugação. Os sedimentos de eritrocitos, depois de lavados em PBS, foram ressuspensos a 2% em PBS-BSA 0,2% e utilizados nos testes de detecção da atividade de neuraminidase.

2.8. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE NEURAMINIDASE POR SOROS DE CAMUNDONGOS

2.8.1.Obtenção dos Soros: Amostras de soros de camundongos foram obtidas de híbridos (CBA x C57BL10)F1, infectados com a cepa Y de *T.cruzi*. Vários lotes de camundongos de 3 meses de idade, machos e fêmeas, foram inoculados intraperitonealmente, com 100 formas tripomastigotas, em um volume de 0,1 ml de PBS. Constatou-se a infecção em cada animal, 10 a 12 dias após a inoculação,

determinando-se os níveis de parasitemia (Brenner, 1962), em amostras de sangue colhidas pela cauda. Ao redor de 42 dias (6ª semana) de infecção, os animais foram sangrados pelo plexo braquial e sacrificados. As amostras de sangue obtidas de cada lote de camundongos foram mantidas a 4°C, para a retração dos coágulos, e depois centrifugadas a 1.700 x g, por 30 minutos. Os diferentes lotes foram separados em alíquotas de 1 ml, e depois de inativados a 56°C por 30 minutos, foram liofilizados e armazenados em refrigerador, a 4°C. No momento da utilização, as amostras de soros liofilizados, foram reconstituídas no volume original com água destilada estéril.

Alguns lotes de soros de camundongos normais foram obtidos de maneira idêntica, a partir de animais de ambos os sexos e de mesma idade que os infectados no momento da colheita do sangue.

Os títulos de anticorpos contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*, foram determinados por imunofluorescência indireta, utilizando-se IgG de coelho conjugada com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), anti-gamaglobulinas de camundongos, preparado de acordo com Camargo (1968) (Lima & da Silva, 1970).

2.8.2. Teste de Inibição: Os testes de inibição da neuraminidase foram realizados, utilizando-se o mesmo método de detecção da atividade do EST sobre eritrocitos humanos. Desta forma, adicionou-se 50 ul de soro de camundongos normais (SNC) ou infectados (SCI), a cada tubo contendo 200 ul de EST e eritrocitos a 5%. Os controles continham o extrato ou PBS junto com eritrocitos, porém sem soro. Estas misturas foram incubadas a 37°C por 12 horas, e depois de lavados, os eritrocitos foram ressuspensos à concentração de 2% em PBS-BSA 0,2% .

Procedeu-se então a determinação do título aglutinante de PNA, de forma idêntica à descrita anteriormente.

2.8.3. Absorção dos Soros: Alguns lotes de SCI foram absorvidos com preparações enriquecidas com formas tripomastigotas de culturas de células HeLa, obtidas pela centrifugação sobre o gradiente de Ficoll-Hypaque. Amostras de 0.2 ml de soro foram misturadas com 10^8 tripomastigotas viáveis, em tubos plásticos (10 x 50 mm) que foram mantidos em banho de gelo, a 4°C, por 1 hora. Depois desse período, os tubos foram centrifugados a 1.700 x g, por 20 minutos, a 4°C e os sobrenadantes livre de parasitas, foram utilizados nos testes de inibição da atividade de neuraminidase sobre eritrocitos. Além da absorção com tripomastigotas, amostras desses lotes de soros foram absorvidas de forma idêntica, com misturas de células HeLa e formas amastigotas, assim como com amostras de eritrocitos humanos, a 20% em volume.

Após as absorções, os títulos de imunofluorescência indireta contra formas tripomastigotas, foram determinados novamente.

2.8.4. Passagem dos Soros em Coluna de Sepharose-Proteína A (spA):

Uma coluna de plástico (15 x 30 mm), contendo no seu interior, aproximadamente 5 ml de Proteína A-Sepharose (Pharmacia, Suécia) previamente hidratada, foi equilibrada com tampão Fosfato (KH₂PO₄ + NaHPO₄, Merck, Brasil) 0,1 M, pH 8,0.

Várias amostras de diferentes lotes de SCI foram reunidas em um volume de 6,2 ml, ao qual adicionou-se 2 ml de Tampão Fosfato 0,1M, pH 8,0. Em seguida adicionou-se 0,1 ml de tampão Tris-HCl 1M (Trizma

Base, Sigma, USA), pH 8,5, resultando em uma amostra de soro ligeiramente diluída, cujo pH no final, apresentou-se igual a 8,0.

Esta amostra foi aplicada na coluna em fluxo lento, de forma que o tempo de passagem fosse retardado, permitindo o contato do material com o imunoadsorvente durante 90 minutos. O material não adsorvido foi recuperado, e a partir de então, a coluna foi lavada exaustivamente com Tampão-Fosfato, até que a leitura espectrofotométrica da absorbância ($\lambda = 280 \text{ nm}$) das amostras fosse inferior a 0,05.

O material adsorvido à coluna foi removido pela passagem de Tampão Glicina-HCl 0,2M (Glicina, Sigma, USA), pH 2,6, sendo recolhido em volumes de 1 ml, em tubos separados. Depois da neutralização do pH destas amostras, foram selecionados os tubos contendo as maiores concentrações de proteínas, através da medição das absorbâncias. Desta forma, constatou-se a presença do material que foi removido da coluna em 14 tubos, ou seja, em um volume igual a 14 ml. Os materiais contidos em 10 destes tubos, apresentando as maiores concentrações proteicas, foram reunidos em uma única amostra.

As duas frações recuperadas da coluna de spA, foram dialisadas com PBS, depois de várias trocas de tampão, durante o período de 48 horas. Estas amostras foram então armazenadas em alíquotas, a -80°C , até o momento do uso em testes de inibição da atividade de neuraminidase sobre eritrocitos.

3. RESULTADOS

3.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PNA

O método de purificação da lectina de amendoim (PNA), proposto por Lotan e cols (1975), pode ser considerado bastante acessível. Entretanto alguns autores afirmam que o extrato salino, depois de concentrado com Sulfato de Amônio, pode ser utilizado de forma satisfatória, em testes de aglutinação, para a detecção da atividade de neuraminidase (Luther e cols, 1983; Pereira, 1983b). Na Tabela 1, estão indicados os resultados das dosagens de proteínas e os títulos aglutinantes, dos extratos obtidos de acordo com o esquema descrito anteriormente. Como podemos observar, somente os eritrocitos tratados com neuraminidase, são aglutinados pela lectina, que está presente nas três frações. Os rendimentos foram expressos em porcentagens de cada amostra em relação ao extrato bruto inicial (PNA-I), calculadas segundo a formula :

$$\%R = \frac{\text{ATIVIDADE ESPECÍFICA X PROT.TOTAL X 100}}{\text{ATIV.ESPEC.da PNA-I X PROT.TOT.da PNA-I}}$$

Ao compararmos os rendimentos das frações PNA-II e PNA-III, que apresentaram-se ao redor de 90%, com a quantidade inicial de lectina da fração PNA-I, podemos verificar que toda a atividade

aglutinante foi recuperada. Estas frações foram reconstituídas após a precipitação, em volumes aproximadamente quatro vezes menores que o da fração PNA-I (de 1.100 ml para 250 ml). Entretanto, a atividade aglutinante em ambas, de forma coincidente, também foi quatro vezes maior que a atividade inicial da PNA-I (25.600 e 6.400 UA/ml, respectivamente) em termos de títulos de aglutinação (Tabela 1).

A aglutinação de eritrocitos tratados com neuraminidase, pela fração PNA-III, foi testada em presença de sacarídeos conhecidos. De acordo com a Tabela 2, podemos observar que houve inibição significativa da aglutinação, somente pelos açúcares, D-galactose e Lactose, para os quais, a lectina tem especificidade (Lotan e cols, 1975). Na presença de D-glucose e Sacarose os títulos aglutinantes foram iguais aos do controle sem sacarídeos.

Através destes dados, confirmou-se a presença da lectina na fração PNA-III, pois esta foi capaz de interagir com a membrana de eritrocitos, somente após a remoção enzimática de moléculas de ácido Neuramínico (Tabela 1), além de que, esta interação foi bloqueada especificamente por açúcares que continham D-galactose em suas estruturas (Tabela 2).

Os eritrocitos humanos foram utilizados nos experimentos de detecção da atividade de neuraminidase de *T.cruzi*, pois estes são muito susceptíveis à aglutinação pela PNA, atingindo títulos elevados (1/25.600) e tornando desta forma, os testes bastante sensíveis.

TABELA 1 - Atividade aglutinante dos extratos de amendoim (*A. hypogaea*) sobre eritrocitos humanos após incubação com PBS (E-PBS) ou com Neuraminidase de *C. perfringens* (E-NCp), a 37°C por 60 min:

EXTRATOS *		P N A - I	P N A - II	P N A - III
Titulo				
Aglutinante de	E-PBS	NEG	NEG	NEG
	E-NCp	1 / 6.400	1/25.600	1/25.600
Conc. Proteinas (mg/ml)		23,4	13,2	12,5
Vol. Total (ml)		1.100	250	250
Prot. Total (mg)		25.740	3.300	3.125
Unidades Aglut. (UA/ml)#		6.400	25.600	25.600
Ativ. Específ. (UA/mg)		273	1.939	2.048
Rendimento Total da				
Atividade (%) †		100	90,8	91,0

* PNA-I: Extrato bruto em Salina (NaCl 0,15 M); PNA-II: Precipitado com $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ a 60% de saturação; PNA-III: Precipitado com Acetona 80%, a - 20°C. # Considerou-se o nº total de Unidades Aglutinantes como sendo o inverso da maior diluição capaz de aglutinar os E-NCp. † Porcentagem de Atividade Total recuperada em relação ao extrato bruto inicial (PNA-I).

TABELA 2 - Inibição da aglutinação de eritrocitos pela fração PNA-III na presença de sacarídeos:*

SACARÍDEO	TÍTULO	AGLUTINANTE
D-Galactose	1/ 1.600	
Lactose	1/ 1.600	
D-Glucose	1/25.600	
Sacarose	1/25.600	
sem sacarídeo	1/25.600	

* Eritrocitos humanos foram tratados com Neuraminidase de *C.perfringens* (E-NCp), em condições idênticas às da Tabela 1 antes do teste de aglutinação pela PNA , na presença de sacarídeos conhecidos (concentr. final de 150 mM).

3.2. SEPARAÇÃO DE TRIPOMASTIGOTAS EM GRADIENTE DE FICOLL-HYPAQUE

Durante a padronização do método de obtenção de formas tripomastigotas a partir dos sobrenadantes de cultura, foram realizadas as contagens de células HeLa e de parasitas (tripomastigotas e amastigotas), antes e depois da centrifugação sobre o gradiente. Na Tabela 3, podemos observar os resultados das contagens obtidas em cinco amostras diferentes. Os valores foram expressos em número total de cada elemento, contido em uma mesma fração do gradiente, ao lado das porcentagens destes, em relação ao número total de células e parasitas.

A banda formada na interfase, depois da centrifugação do gradiente, apresentou-se enriquecida em 90% de tripomastigotas, contendo aproximadamente 10% de amastigotas e praticamente livre de células HeLa (<2%). A observação dessas amostras ao microscópio, revelou a presença de formas flageladas intensamente ativas, indicando que a viabilidade dos parasitas permaneceu inalterada durante todo o processo de separação.

TABELA 3 - Separação de tripomastigotas de sobrenadantes de cultura de células HeLa infectadas por T.cruzi, por centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque:

A M O S T R A S		C O N T A G E N S *					
		H e L a		TRIPOMASTIG.		AMASTIGOTA	
		Total †	% #	Total	%	Total	%
ANTES DA CENTRIFUGAÇÃO		1,66 ± 0,54	14,7	5,54 ± 1,20	49,1	4,08 ± 0,92	36,2
APÓS CENTRIFUGAÇÃO							
Sobrenadante		0	-	0	-	0	-
Interfase		0,07 ± 0,06	1,4	4,48 ± 1,02	92,2	0,31 ± 0,18	6,4
Abaixo da Interfase		0,41 ± 0,20	12,3	0,72 ± 1,16	21,6	2,20 ± 0,56	66,1
Sedimento		1,48 ± 0,55	49,7	0,18 ± 0,10	6,0	1,32 ± 0,45	44,3

* Contagens de células HeLa, formas tripomastigotas e amastigotas, em câmara de Neubauer presentes nas frações resultantes da centrifugação de sobrenadantes de culturas, sobre gradiente de ficoll-Hypaque (d=1,060 g/ml, 1.700 x g, 30min).

† Número de cada elemento separadamente ($\times 10^7$), contido no volume total da amostra. Valores representativos da Média Aritmética das contagens efetuadas em 5 amostras diferentes $\pm$ Desvio Padrão.

Porcentagem média em relação ao número total de elementos contidos na mesma amostra.

3.3 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE NEURAMINIDASE NAS VÁRIAS FRAÇÕES DO GRADIENTE DE DENSIDADE

A atividade de neuraminidase sobre eritrocitos humanos, foi testada em cada fração separada pelo gradiente de Ficoll-Hypaque. De acordo com a Tabela 4, podemos observar que depois da incubação dos eritrocitos por 6, 8 e 12 horas, a 37°C, em presença dessas frações, somente aquelas enriquecidas de formas tripomastigotas ($\pm 90\%$) é que apresentaram atividade evidente (1/32, 1/64 e 1/128 para cada tempo). Nos sobrenadantes, livres de células e parasitas, não foi possível detectar-se atividade de neuraminidase, através da aglutinação com a PNA. No sedimento, contendo grandes quantidades de células HeLa e de amastigotas ($\pm 50\%$ e $\pm 40\%$ respectivamente), também não foi detectada a atividade sobre eritrocitos. Os títulos de 1/2 e 1/4, obtidos com a fração localizada na região abaixo da interfase do gradiente, depois de 8 e 12 horas de incubação, podem ser atribuídos à quantidade remanescente de tripomastigotas ($\pm 20\%$) (Tabela 4).

A partir destes dados, amostras enriquecidas de tripomastigotas de culturas de células, foram utilizadas como fonte de material, contendo atividade de neuraminidase de *T. cruzi*. Nestas amostras, que poderiam ser constituídas de parasitas viáveis ou lisados, foi adicionado um inibidor de proteases, FenilMetilSulfonil-Fluoreto (PMSF), à concentração final de 1 mM.

TABELA 4 - Atividade de neuraminidase das várias frações obtidas pelo gradiente de ficoll-hypaque, sobre eritrocitos humanos, detectada pela aglutinação com a PNA:

INCUBAÇÃO DE ERITROCITOS COM:	ELEMENTO PRESENTE *	TÍTULO AGLUTINANTE DE PNA **		
		após 6h	após 8h	após 12h
SOBRENADANTE	-	NEG	NEG	NEG
INTERFASE	90% tripom.	1/32	1/64	1/128
ABAIXO DA INTERFASE	20% tripom. 65% amastig.	NEG	1/2	1/4
SEDIMENTO	6% tripom.			
	40% amastig.	NEG	NEG	NEG
	50% HeLa			

* Porcentagem média de células e parasitas determinadas em cada amostra (vide Tabela 3), antes da incubação com eritrocitos, a 37°C, por vários períodos. ** Determinação dos títulos de aglutinação com a PNA, após cada incubação. Dados semelhantes foram obtidos com 5 amostras diferentes .

3.4. ATIVIDADE DE NEURAMINIDASE EM TRIPOMASTIGOTAS VIÁVEIS E LISADOS SOBRE ERITROCITOS

Durante a incubação de eritrocitos humanos, por vários períodos de tempo, em presença de tripomastigotas viáveis (TV) ou lisados, podemos verificar através da Figura 1, os seguintes resultados: o título de aglutinação de eritrocitos pela PNA, após a incubação com TV, aumentou lentamente, atingindo o máximo (1/256) depois de 12 horas. Este valor permaneceu inalterado, por mais 6 horas, até o término da incubação. Uma parte da suspensão de parasitas, foi utilizada na preparação do extrato bruto (EBT), e a partir deste, obteve-se por centrifugação, o extrato solúvel (EST) e o insolúvel (EIT) de tripomastigotas. As incubações dos eritrocitos com estes extratos revelaram que a atividade inicial do EBT, apesar de semelhante à dos TV, não pôde ser medida além de 6 horas de incubação. Neste momento, a ocorrência de hemólise tornou impossível o teste de aglutinação com a PNA. O mesmo fenômeno de lise ocorreu com o tubo contendo eritrocitos junto com o EIT, porém a atividade de neuraminidase medida durante 6 horas de incubação, foi bem inferior à dos TV ou do EBT, atingindo um título de apenas 1/4 . De forma inversa a incubação de eritrocitos

com o EST, não apresentou nenhuma lise, ao longo de todo o experimento (18 horas), não prejudicando assim, a determinação da atividade de Neuraminidase. Os resultados comprovam que os títulos obtidos com o EST, foram semelhantes aos dos TV, indicando que esta atividade, estaria sendo liberada sob a forma solúvel, após a lise dos parasitas em PBS.

Os valores demonstrados para cada um dos pontos deste gráfico, representam os resultados obtidos em 3 experimentos distintos, não havendo nenhuma variação nos títulos de aglutinação entre amostras contendo o mesmo número de formas tripomastigotas. Podemos observar que os títulos obtidos com TV e EST foram semelhantes, ao longo de todo o período de incubação dos eritrocitos (Figura 1). O período de 12 horas foi estabelecido como padrão, para amostras contendo de 10 a 10 tripomastigotas/ml, nos experimentos subsequentes. Em razão disso, as incubações dos mesmos puderam ser realizadas durante o período noturno, facilitando assim a elaboração do trabalho.

A Figura 1 apresenta também, os valores obtidos com os controles de eritrocitos incubados em presença de PBS ou de NCp.

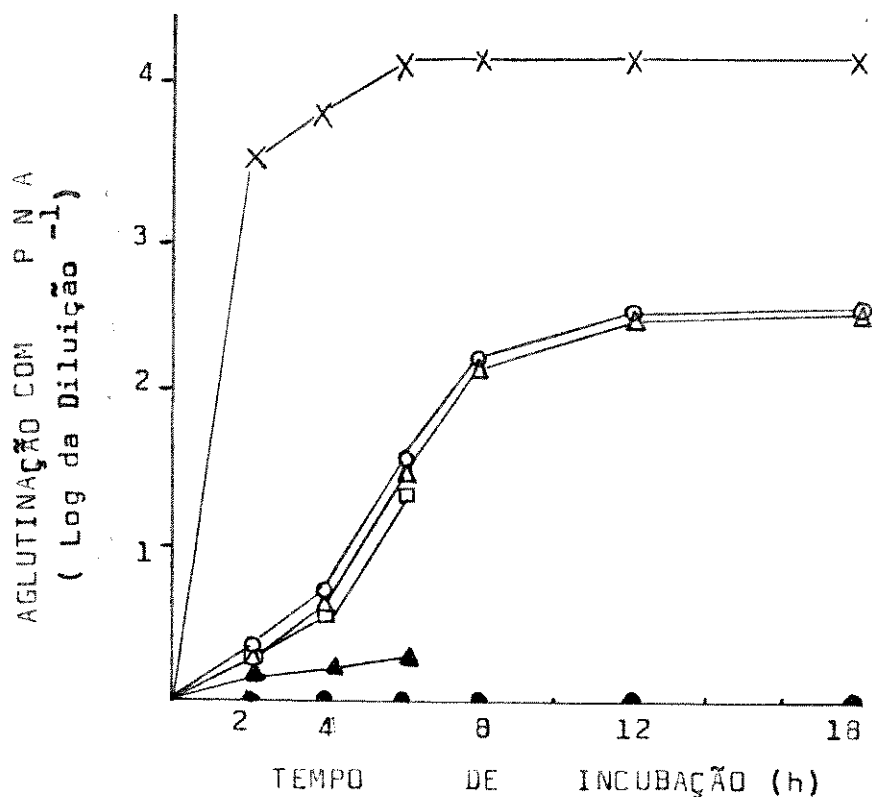


FIGURA 1 - Atividade de neuraminidase de tripomastigotas (Viáveis ou Lisados), sobre eritrocitos durante vários períodos de tempo. Eritrocitos humanos foram incubados a 37°C, por 2 a 18 h, em presença de: (●) PBS; (○) Tripomastigotas Viáveis (10 /ml em HBSS); (□) Extrato Bruto de Tripomastigotas; (△) Extrato Solúvel de Tripomastigotas; (▲) Extrato Insolúvel de Tripomastigotas; (X) Neuraminidase de *C. perfringens*. Em todas as suspensões e soluções, adicionou-se PMSF à concentração final de 1 mM.

3.5. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS DE TRIPOMASTIGOTAS

Em um experimento, foram controladas simultaneamente, a atividade hemolítica e de neuraminidase, nos extratos de tripomastigotas, sob as mesmas condições do anterior. Os resultados da Tabela 5, referem-se às porcentagens de hemólise, que foram calculadas a partir das leituras espectrofotométricas, dos sobrenadantes obtidos após cada período de incubação. A atividade de neuraminidase também foi determinada neste experimento, resultando em valores idênticos aos obtidos anteriormente (Figura 1), e por esta razão, não foram incluídos na Tabela 5.

Certas preparações de neuraminidases obtidas a partir de outros microrganismos, comumente são contaminadas com substâncias hemolíticas e citotóxicas. Este efeito geralmente pode ser bloqueado por inibidores enzimáticos ou metabólitos (Ada e cols, 1961; Kraemer, 1968). De acordo com a Tabela 6, podemos observar os dados comparativos, dos efeitos do EST e do EIT, sobre eritrocito em presença de algumas substâncias, potencialmente inibidoras de atividades enzimáticas, ou após aquecimento por 5 minutos em banho de água fervente.

TABELA 5 - Atividade hemolítica de extratos de tripomastigotas , durante incubação com eritrocito humanos, por vários períodos de tempo:

INCUBAÇÃO DE ERITROCITO COM *	PORCENTAGEM DE LISE APÓS INCUBAÇÃO POR **					
	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h	18 h
P B S	0	0	0	0,8	1,2	3,3
E B T	1,9	5,3	26,6	46,7	71,4	88,7
E S T	0	0	0	0,4	2,3	3,5
E I T	2,6	6,2	29,1	47,2	69,7	93,0
N C p	0	0	0	0,1	0,8	2,6

* Extratos de Tripomastigotas de **T.cruzi** (5×10^7 /ml em PBS-PMSF 1 mM). EBT= Extrato Bruto ; EST= Extrato Solúvel; EIT= Extrato Insolúvel; Contrôles: PBS= Solução Salina Tamponada; NCp= Neuraminidase de **C.perfringens**. ** Porcentagens de lise calculadas a partir de leituras espectrofotométricas dos sobrenadantes ($\lambda = 420$ nm), em relação a uma curva padrão de hemólise. Valores representativos da média aritmética de cada tempo em triplicata, de um único experimento.

TABELA 6 - Porcentagem de hemólise e título de aglutinação de eritrocitos humanos pela PNA, após incubação com EST e EIT, por 12 h, a 37°C em presença de substâncias inibidoras:

INIBIDORES *	E X T R A T O S †			
	E S T		S I T	
	% lise	aglut.c/ PNA	% lise	aglut.c/ PNA
P B S	58,9	N.D. #	96,0	N.D.
100°C, 5min (s/i)	0,2	Negativo	0,4	Negativo
NaN ₃ 0,1%	0,3	1 / 128	77,5	N.D.
E D T A 15mM	7,6	1 / 128	83,4	N.D.
P M S F 1 mM	0,1	1 / 128	90,2	N.D.
E-A C A 20mM	0,1	1 / 128	89,7	N.D.

† Extrato Solúvel(EST) e Insolúvel(EIT) de *Tripomastigotas* (5×10^7 /ml)

* Inibidores:NaN₃=Azida Sódica; EDTA=Etilenodiamino-tetracetato de Sódio; PMSF=FenilMetilSulfonil-Fluoreto; E-ACA=Acido Epsilon-amino-capróico; PBS=Solução Salina Tamponada. # ND= não determinado em decorrência de hemólise.

3.6. COMPARAÇÃO ENTRE AS ATIVIDADES DE NEURAMINIDASES DE *T.cruzi* (EST) E DE *C.perfringens* (NCp) SOBRE ERITROCITOS HUMANOS E DE CAMUNDONGOS.

Verificou-se anteriormente que os títulos de aglutinação de eritrocitos humanos pela PNA, eram muito elevados, depois de tratados com NCp (Tabela 1 e 2, Figura 1). Os mesmos valores não foram observados, depois da incubação destes eritrocitos com EST, resultando em títulos bem inferiores. Provavelmente isso ocorre, pelo fato deste material tratar-se de um extrato não purificado de *T.cruzi*, contendo dentre vários componentes, a atividade de neuraminidase. Desta forma, os padrões de aglutinação de eritrocitos humanos e de camundongos pela PNA, após incubação com EST e NCp foram comparados. De acordo com a Tabela 7, podemos observar que a atividade de neuraminidase do EST, da mesma forma que a NCp, não variou em relação às diferenças de grupos sanguíneos entre os eritrocitos humanos, ou de linhagens entre camundongos. Todavia, notamos uma diferença bastante evidente, entre os títulos de aglutinação das células humanas e de camundongos, quando incubados por neuraminidase, seja de *C.perfringens* ou de *T.cruzi*. Portanto, podemos verificar que os eritrocitos humanos são mais susceptíveis à aglutinação pela PNA, do que os de camundongos, quando tratados por neuraminidases sob as mesmas condições.

TABELA 7 - Comparação das atividades de neuraminidase do EST e da NCp sobre eritrocitos humanos e de camundongos, pela aglutinação com a PNA:

INCUBAÇÃO *	E R I T R O C I T O		TITULO DE AGLUTINAÇÃO #
E S T	CAMUNDONGO	CBA	1 / 32
		C57B10	1 / 32
		(CBAxC57)F1	1 / 32
	HUMANO	O+	1 / 256
		A+	1 / 256
		B+	1 / 256
N C p	CAMUNDONGO	CBA	1 / 512
		C57B10	1 / 512
		(CBAxC57)F1	1 / 512
	HUMANO	O+	1 / 12.800
		A+	1 / 12.800
		B+	1 / 12.800

* Incubação dos eritrocitos a 37°C, por 12 horas, com:: EST= Extrato Solúvel de *T.cruzi* (5 x 10 tripom./ml em PBS-PMSF; NCp= Neuraminidase de *C.perfringens* (5 mU/ml em PBS-PMSF 1mM) . # Valores semelhantes foram btidos com 3 amostras diferentes de cada grupo ou linhagem de eritrocitos.

3.7. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE NEURAMINIDASE POR SOROS DE CAMUNDONGOS

Vários lotes de soros de camundongos (CBAXC57BL10)F1, comprovadamente resistentes à infecção por *T.cruzi* (Corsini e cols, 1980), obtidos após 6 semanas de infecção, foram testados quanto a capacidade de inibir a atividade de neuraminidase sobre eritrocitos humanos. Estes lotes de soros foram titulados previamente quanto a reatividade contra formas tripomastigotas, por imunofluorescência indireta e adicionados às amostras de EST na proporção de 1:5 em volume.

De acordo com a Tabela 8, podemos verificar que os quatro lotes de soros de animais infectados (SCI) que foram testados, de alguma forma bloquearam a atividade de neuraminidase do EST sobre eritrocitos, pois não houve aglutinação dos mesmos pela PNA. Entretanto, os dois lotes de soros obtidos de camundongos normais (SNC), foram incapazes de inibir o mesmo efeito do EST. Podemos observar ainda que, tanto os SCI quanto os SNC, não bloquearam a atividade de neuraminidase de *C.perfringens* sobre eritrocitos. Na Tabela 8 estão demonstrados também, os resultados da titulação dos soros por imunofluorescência.

Ao analisarmos estes dados podemos verificar que, apesar dos lotes de SCI apresentarem títulos variáveis de imunofluorescência, a inibição da aglutinação pela PNA foi total com qualquer um deles. Todavia, ao realizar-se o mesmo teste com dois lotes de SCI, em diferentes diluições, constatou-se que os títulos de aglutinação

TABELA 8 - Atividade de neuraminidase do EST e da NCp sobre eritrocitos, na presença de soros de camundongos normais ou infectados por **T.cruzi**: *

ATIVIDADE EM			Aglut. c/ PNA após incubação com: #		
PRESENÇA DE :		I F I **	EST		NCp
PBS		-	1 / 256		1 / 12.800
SNC	lote 1	1 / 4	1 / 128		1 / 12.800
	lote 5	1 / 2	1 / 256		1 / 12.800
SCI	lote 2	1 / 60	Neg		1 / 12.800
	lote 6	1 / 160	Neg		1 / 12.800
	lote 7	1 / 80	Neg		1 / 12.800
	lote 12	1 / 160	Neg		1 / 12.800

* Soros obtidos de vários camundongos (CBAXC57BL10)F1 normais (SNC) ou infectados com **T.cruzi** (SCI), 40 dias após a inoculação.

**Títulos de Imunofluorescência Indireta contra formas tripomastigotas fixadas por formol, utilizando-se IgG de coelho anti-gamaglobulinas de camundongo, conjugada com FITC.

Títulos aglutinantes de PNA, após incubação dos eritrocitos com EST (5×10^7 trip./ml) ou NCp (5 mU/ml) em presença de PBS, SNC e SCI.

de eritrocitos aumentaram gradativamente, à medida que estes soros foram sendo diluídos com PBS. Os resultados deste experimento estão demonstrados na Figura 2, na qual podemos observar as diferenças entre o SNC e os SCI, quanto à capacidade de inibir a atividade de neuraminidase do EST.

A capacidade bloqueadora dos SCI sobre o EST, resultando na inibição da aglutinação de eritrocitos pela PNA, pode ter várias explicações. Entretanto, o fato de que o mesmo não ocorreu com os SNC e que nenhum destes soros foi capaz de bloquear a atividade de neuraminidase de *C.perfringens*, sugere que haveria uma certa especificidade envolvida no fenômeno. Por esta razão, foram realizadas algumas absorções dos SCI, com três preparações contendo separadamente: tripomastigotas, células HeLa infectadas junto com amastigotas, ou apenas eritrocitos humanos. A Figura 3, apresenta os resultados dos testes de inibição da atividade do EST, pelos dois lotes de SCI depois de absorvidos.

Como pôde ser verificado, houve uma ligeira diferença entre os lotes 2 e 12 de SCI, quanto à recuperação dos níveis de aglutinação de eritrocitos após as diluições (Figura 2). Somente as absorções dos SCI com formas tripomastigotas, tornaram estes soros, incapazes de bloquear a atividade de neuraminidase do EST. Eritrocitos humanos, células HeLa infectadas e formas amastigotas, não foram efetivos na absorção dos SCI (Figura 3).

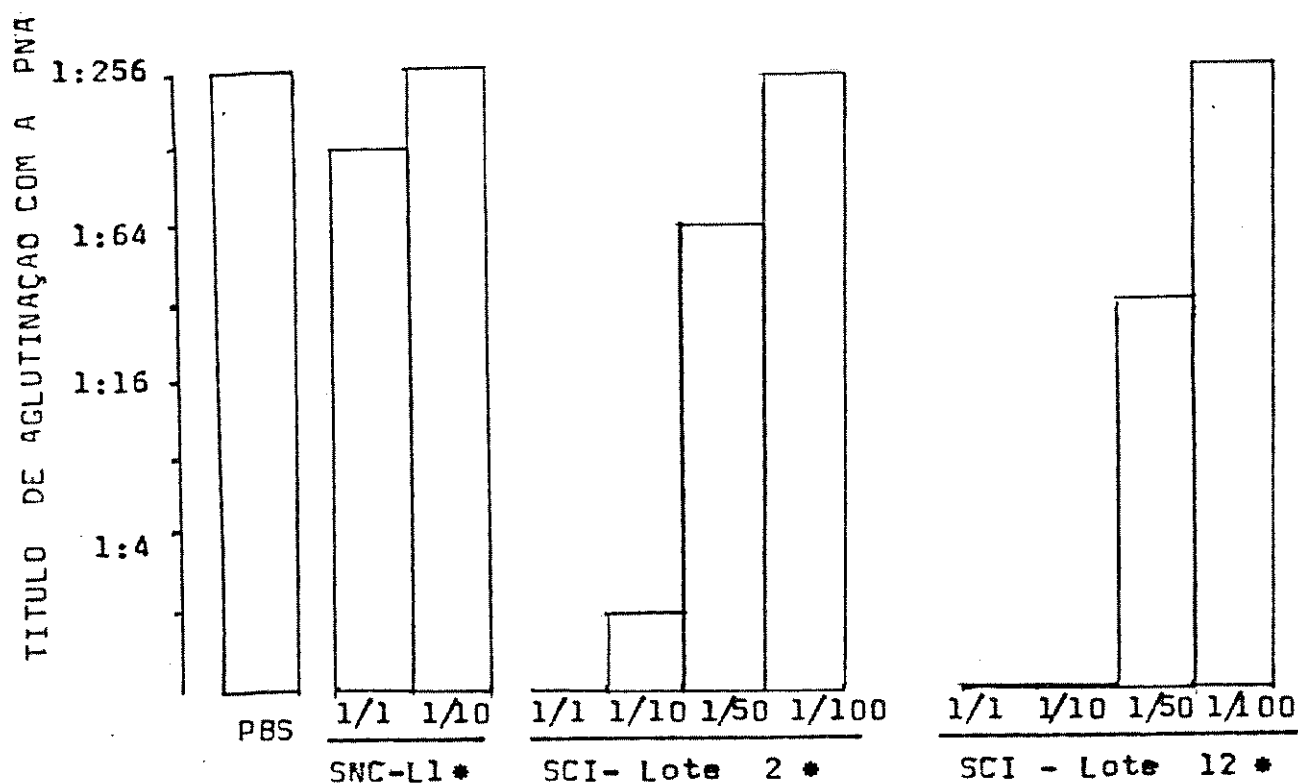


FIGURA 2 - Inibição da atividade de neuraminidase de *T.cruzi* (EST) por soros de camundongos em diferentes diluições.

* A aglutinação de eritrocitos humanos pela PNA foi testada, após incubação com EST (37°C, 12h), em presença de soros de camundongos normais (SNC) ou infectados com *T.cruzi* (SCI) em diversas diluições. Foram selecionados os lotes 2 e 12 de SCI e o lote 1 de SNC, de acordo com os resultados obtidos na Tabela 8.

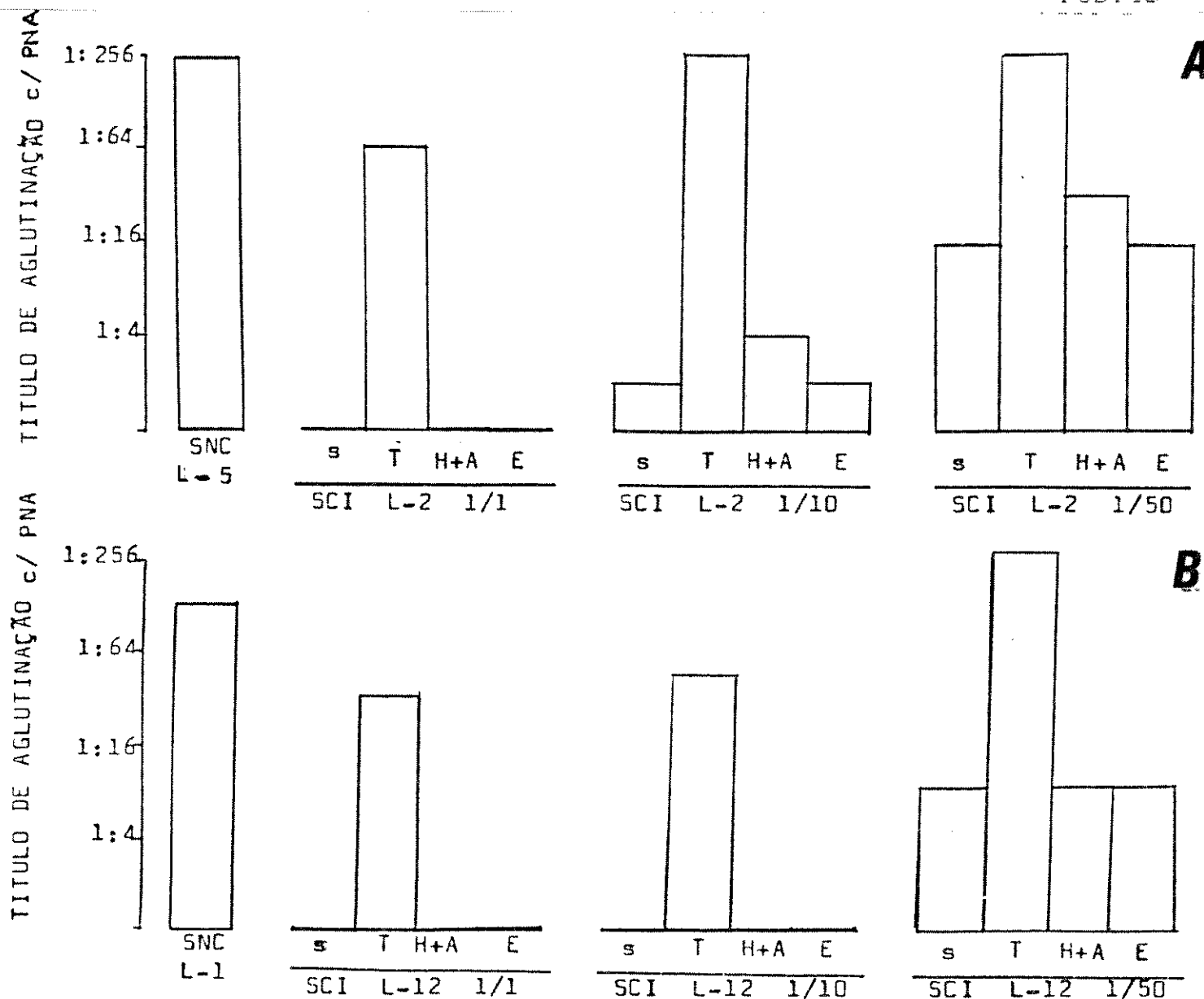


FIGURA 3 - Inibição da atividade de neuraminidase do EST por soros de camundongos infectados por *T.cruzi* (SCI), em diferentes diluições e após absorções com: Tripomastigotas (T), células HeLa + Amastigotas (H+A), eritrocitos (E) e sem absorção (s). O teste de aglutinação com a PNA foi realizado após incubação dos eritrocitos com EST em presença dos SNC (Lote 5:Fig.3A e Lote 1:Fig.3B) e dos SCI (Lote 2:Fig.3A e Lote 12:Fig.3B) em diferentes diluições e após absorções.

3.8. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE NEURAMINIDASE DO EST APÓS PASSAGEM DOS SOROS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS EM COLUNA DE SEPHAROSE-PROTEÍNA A

Uma amostra constituída de uma mistura de vários lotes de SCI, foi passada através de coluna de afinidade, contendo Proteína-A acoplada à Sepharose (SpA). A fração que não ficou adsorvida foi recuperada e após várias lavagens da coluna com tampão fosfato (0,1M, pH 8,0), o material que ficou retido foi dessorvido com tampão glicina-HCl (0,2M, pH 2,6). Depois da diálise das duas frações, determinou-se as concentrações proteicas destas e do soro total, testando-se a seguir, a capacidade bloqueadora da atividade de neuraminidase. As dosagens de proteínas apresentaram os seguintes valores: a) Soro total= 57,5 mg/ml; b) Fração não adsorvida à SpA= 27,3 mg/ml; b) Fração adsorvida à SpA= 2,94 mg/ml.

De acordo com a Figura 4, podemos constatar que a fração adsorvida, foi mais eficaz do que a não adsorvida, quanto à capacidade de inibição. Entretanto, nenhuma das amostras apresentou-se tão eficaz, quanto o soro total, ficando evidente que a capacidade bloqueadora ficou distribuída entre as duas frações, apesar de mais concentrada na amostra adsorvida à SpA (Figura 4).

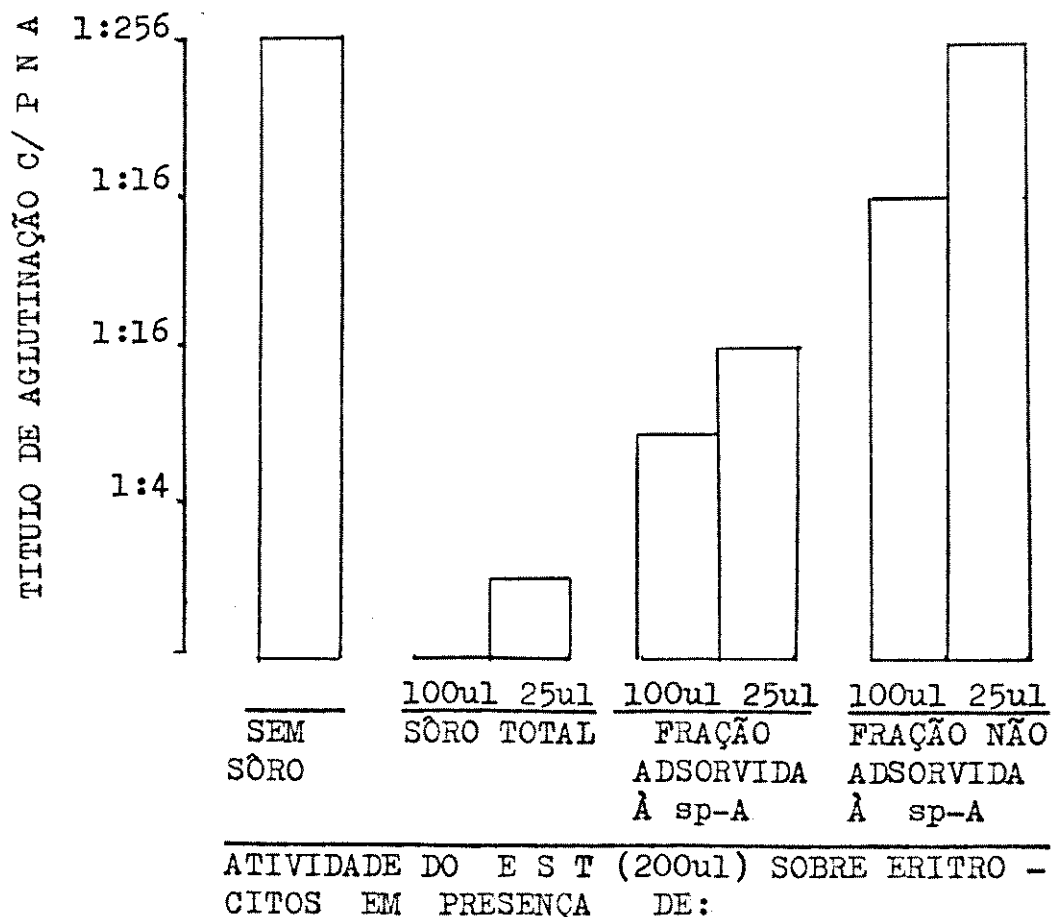


Figura 4 - Inibição da atividade de neuraminidase de *T.cruzi* (EST) por frações obtidas após a passagem de SCI em coluna de Proteína A-Sepharose (SpA). As amostras apresentaram as seguintes concentrações proteicas: Soro Total = 57,5 mg/ml; Fração Adsorvida à SpA = 2,94 mg/ml; Fração não adsorvida à SpA = 27,3 mg/ml.

3.9. ATIVIDADE DE NEURAMINIDASE DE *T.cruzi* SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES (MN)

Antes dos testes de detecção da atividade de neuraminidase, fez-se necessário o estudo da viabilidade de células MN durante a incubação com tripomastigotas viáveis e lisados, por vários períodos de tempo. Desta forma, células MN de sangue periférico humano foram incubadas em presença das preparações de TV, EBT, EST e EIT, em HBSS-PMSF 1mM, durante 8 horas, a 37°C. A porcentagem de células viáveis, foi então determinada periodicamente, pela exclusão por Azul de Trypan e os resultados estão evidenciados na Figura 5. Como podemos observar, as células MN são sensíveis à lise, pelos extratos EBT e EIT, da mesma forma que os eritrocitos. Após duas horas de incubação, cerca de 50% das células, apresentaram-se coradas pelo Azul de Trypan, e muito antes do final da incubação, todas elas já haviam sido lisadas em presença do EBT e do EIT (Figura VI). Por outro lado, a viabilidade das células manteve-se pouco alterada durante 4 horas de incubação com os TV ou com o EST, e após 8 horas, cerca de 65% destas ainda permaneceram íntegras. Somente as células incubadas em HBSS-PMSF, mantiveram a viabilidade dentro dos limites satisfatórios, chegando ao final do experimento com uma porcentagem superior a 80% de células viáveis (Figura 5).

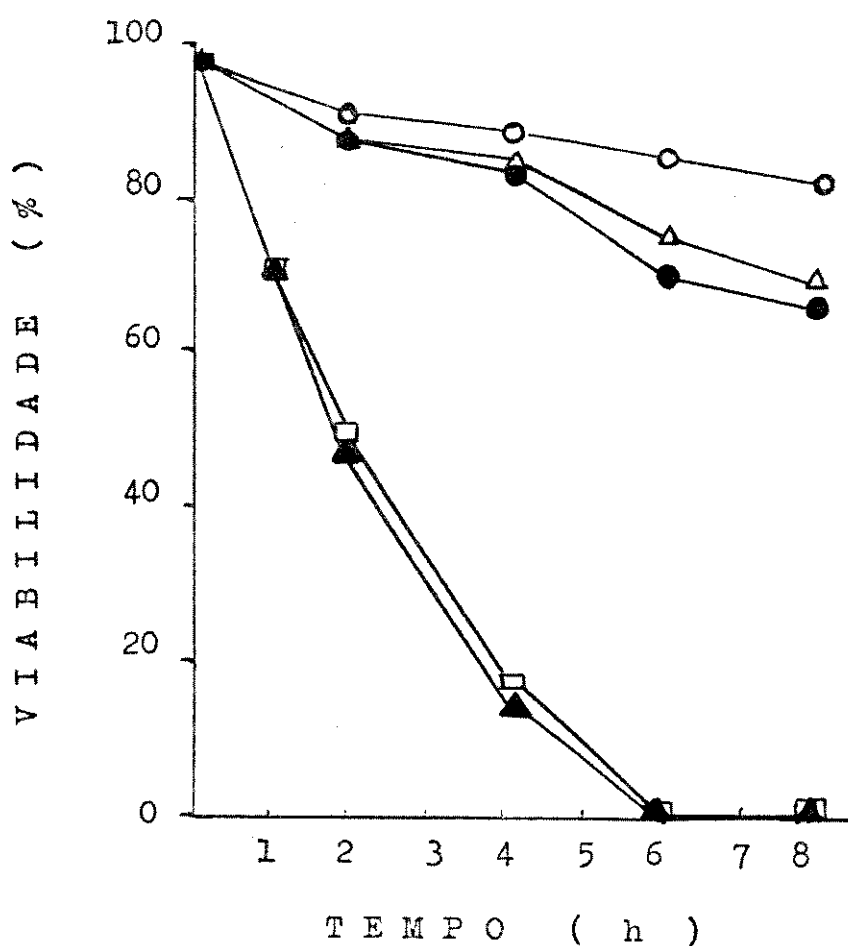


FIGURA 5 - Viabilidade de células mononucleares de Sangue Periférico Humano, durante incubação com tripomastigotas viáveis ou lisados.

As porcentagens de células viáveis foram determinadas pela exclusão por Azul de Trypan, após incubação por vários períodos, a 37°C em presença de : (○) HBSS; (●) TV ; (□) EBT; (△) EST; (▲) EIT (vide texto). Em todas as suspensões adicionou-se PMSF à concentração final de 1mM. Cada ponto representa o valor médio de 4 experimentos, realizados em triplicatas.

Baseando-se nestes dados, os testes de detecção da atividade de neuraminidase, foram realizados apenas com as preparações de TV e de EST, em HBSS-PMSF 1mM. Além das células humanas, utilizou-se células MN de sangue periférico e de baço de camundongos. Entretanto, o período de incubação não ultrapassou as 4 horas, pois à medida que a viabilidade diminuiu, estas células apresentaram forte tendência de se agregar espontaneamente. A determinação dos títulos de aglutinação pela PNA foi realizada por meio da observação microscópica de vários campos, contendo suspensões de células com diferentes concentrações de lectina. A Tabela 9, mostra os resultados obtidos em um destes experimentos, onde pode-se constatar que as células MN, tornaram-se aglutináveis pela PNA depois de um período de 4 horas de incubação com TV e EST. Nenhuma das suspensões de células que foram incubadas com HBSS-PMSF, apresentou sinais consideráveis de aglutinação, mesmo na presença da PNA.

TABELA 9 - Aglutinação de células MN humanas e de camundongos pela PNA após incubação por 4 horas, a 37°C, em presença de tripomastigotas viáveis (TV) ou lisados (EST):

C É L U L A S M N	TÍTULO DE AGLUTINAÇÃO COM P N A APÓS INCUBAÇÃO COM *:		
	H B S S	T V	E S T
SANGUE PERIFÉRICO			
H U M A N O	NEG	1 / 32	1 / 64
SANGUE PERIFÉRICO DE			
C A M U N D O N G O **	NEG	1 / 16	1 / 16
B A Ç O D E			
C A M U N D O N G O **	NEG	1 / 32	1 / 64

* TV e EST preparados a partir de uma suspensão contendo 5×10^7 tripomastigotas/ml em HBSS-PMSF 1 mM. O controle continha o mesmo tampão com inibidor de proteases. Os valores representam a média dos títulos obtidos com 2 amostras de cada tipo de células em triplicatas. ** Camundongos (CBA x C57BL10)F1.

4. DISCUSSÃO

A membrana citoplasmática representa um componente fundamental na organização celular, realizando uma variedade de funções vitais para o organismo. Em virtude de sua estrutura, a membrana constitui uma barreira que separa uma célula de outra e estas de seu próprio ambiente, permitindo a especialização de funções através da seleção de compostos que devem entrar ou sair da célula. A arquitetura básica das membranas celulares consiste de um mosaico de proteínas e lipídeos, que geralmente apresentam cadeias oligossacarídicas ligadas covalentemente (Singer, 1974). Estes sacarídeos estão voltados para o exterior da célula como parte integrante da estrutura de receptores de superfície, participando diretamente da transferência de informações (Ashwell & Morell, 1977).

As cadeias oligossacarídeas de membranas celulares da maioria dos vertebrados são constituídas por apenas nove tipos de monossacárides, de forma que seis deles, são açúcares neutros: glucose, fucose, galactose, manose, arabinose e xilose; dois amino-açúcares que apresentam-se sob a forma N-Acetil: glucosamina e galactosamina; e o mais complexo destes monossacárides, representado pelos vários derivados do ácido Neuramínico, coletivamente denominados de ácidos Siálicos (Spiro, 1963a; Hood e cols, 1978). Este último geralmente, ocupa posições mais distais em relação à cadeia polipeptídica ou lipídica, sendo responsável em grande parte pela carga negativa de superfície das células (Nordling e cols, 1972), além de participar ativamente em vários mecanismos de diferenciação e de interações celulares (Hudgin e cols, 1974; Sharon, 1983; Cooper, 1984).

Moléculas de ácido Siálico podem ser removidas por hidrólise ácida moderada, ou por enzimas específicas denominadas de neuraminidases (sialidases), sem alteração do restante da cadeia oligossacarídica (Corfield & Shauer, 1979). A clivagem enzimática destas moléculas, quando integrantes de glicoproteínas plasmáticas ou de superfícies celulares, em nada interfere também na estrutura das cadeias polipeptídicas, que passam então a ser denominadas de "Asialo-glicoproteínas". Entretanto, a simples ausência de alguns resíduos de ácido Siálico é suficiente para mudar de forma acentuada, o comportamento biológico de moléculas e células (Bocci, 1976; Ashwell & Morell, 1977).

A atividade de neuraminidase sobre determinado substrato, pode ser detectada ou quantificada através da dosagem de ácido Siálico liberado. Os vários métodos de dosagem de ácido Siálico baseiam-se em modificações dos mesmos utilizados para outros carboidratos. Porém estes ensaios fornecem resultados inespecíficos, quando aplicados diretamente na detecção da atividade de neuraminidase sobre materiais biológicos complexos (células ou tecidos), exigindo uma elaboração prévia dos mesmos (Warren, 1959).

Extratos salinos de amendoim (*Arachis hypogaea*) têm sido amplamente utilizados na investigação clínica de fenômenos de poliaglutinação, pela sua característica particular de aglutinar eritrocitos após tratamento com neuraminidase. A poliaglutinação muitas vezes é resultante da presença de microrganismos bacterianos ou virais nas amostras de sangue, provenientes da própria infecção dos pacientes ou da contaminação desse material durante a colheita (Bird & Wingham, 1971; Luther e cols, 1983). O fato mais relevante a ser

destacado no caso dos pacientes, é que a aglutinação dos eritrocitos pelo extrato de amendoim constitui um método sensível de constatação, embora indireta, da presença do agente infeccioso na circulação sanguínea. Depois de descartada a possibilidade de contaminação da amostra, a realização da hemocultura pode resultar no isolamento de microrganismos produtores de neuraminidase (Bird & Wingham, 1971).

A aglutinina existente nestes extratos foi denominada inicialmente de "aglutinina anti-T", em razão de sua reatividade análoga aos anticorpos capazes de reconhecer os antígenos T, os quais determinam os grupos sanguíneos MN na superfície de eritrocitos humanos (Bird, 1964). Posteriormente a estrutura responsável pela aglutinação foi purificada por cromatografia de afinidade, utilizando-se B-D-galactopiranosilamina, acoplada a Sepharose (Lotan e cols, 1975). Esta aglutinina foi caracterizada como sendo uma proteína, de peso molecular igual a 110.000 daltons, capaz de aglutinar eritrocitos humanos tratados com neuraminidase, ou de reagir com asialoglicoproteínas em testes de imunodifusão em gel (Lotan e cols, 1975). A partir de então, esta lectina foi denominada universalmente de PNA ("peanut agglutinin").

Recentemente, desenvolveu-se um método específico e comparativo de medição da atividade de neuraminidase sobre estruturas de superfície de eritrocitos, por meio da marcação radioativa de moléculas de ácido Siálico e da aglutinação destas células pela PNA (Pereira, 1983b). O processo de medição da radioatividade liberada é bastante sensível, mas além de dispendioso, exige também uma elaboração mais complexa durante a marcação. Entretanto, foi possível estabelecer uma correlação direta entre a quantidade de ácido Siálico

liberada e os títulos de aglutinação de eritrocitos pela lectina (Pereira 1983b).

No presente trabalho, um extrato de amendoim foi preparado com objetivo de se estudar a atividade de neuraminidase de *T. cruzi* sobre a superfície de células humanas e de camundongos. De acordo com os resultados das dosagens de proteínas e da determinação dos títulos aglutinantes do extrato salino e das frações precipitadas com Sulfato de Amônio e Acetona, podemos verificar os seguintes fatos (Tabela 1).

1) Qualquer uma das frações foi capaz de aglutinar eritrocitos humanos, somente após o tratamento com neuraminidase (1/6.400 com PNA-I; 1/25.600 com PNA-II e III); 2) Grande parte do material proteico inespecífico do extrato salino, foi removido pela precipitação com Sulfato de Amônio, pois a quantidade inicial de proteínas (25.740 mg), apresentou-se cerca de 8 vezes superior à da fração PNA-II (3.300 mg); 3) A quantidade de lectina determinada pelo título aglutinante, manteve-se inalterada mesmo após nova precipitação com Acetona (1/25.600), apresentando-se apenas concentrada, na mesma proporção em que o volume final foi reduzido ($\pm$ 4 vezes); 4) A precipitação com Acetona (PNA-III), deve ter removido algum material não proteico e instável em solução, não havendo alteração no conteúdo total de proteínas em relação à fração PNA-II (3.300 mg e 3.125 mg respectivamente).

A amostra PNA-III obtida no final, apresentou-se límpida e estável após armazenamento em refrigerador, a -20°C , mantendo o título por tempo indeterminado (> 1 ano).

Outro aspecto importante foi constatado, através dos testes de aglutinação na presença de açúres conhecidos (Tabela 2). Apesar da lectina reagir especificamente com o dissacarídeo D-Gal-B(1-3)-D-GalNAc, esta interação pode ser bloqueada por estruturas ricas em resíduos de D-Galactose (Lotan e cols, 1975; Pereira e cols, 1976). Os dados da Tabela 2, estão em concordância com esta afirmação, pois somente os açúcares Galactose e Lactose, foram capazes de inibir acentuadamente a aglutinação de eritrocitos pela PNA-III (de 1/25.600 para 1/1.600), em concentrações finais de 150 mM.

Para a realização dos experimentos de detecção da atividade de neuraminidase de *T.cruzi*, foram utilizados como fonte de parasitas, os sobrenadantes de culturas de células HeLa infectadas com a cepa Y. Através da centrifugação dos sobrenadantes em gradiente de Ficoll-Hypaque, foram obtidas 4 frações distintas: o sobrenadante, a interfase, a zona abaixo desta e o sedimento. De acordo com a Tabela 3, após a determinação do número de células e parasitas, cada amostra apresentou as seguintes composições. 1) Os sobrenadantes eram livres de células e parasitas; 2) As amostras obtidas da interfase, apresentaram-se enriquecidas de formas tripomastigotas (>90%), apesar da presença de uma pequena porcentagem de amastigotas e de células HeLa; 3) Nas amostras extraídas da zona abaixo da interfase foram encontrados os 3 elementos, havendo a predominância de amastigotas ($\pm$ 60%) e uma pequena porcentagem, porém significativa, de tripomastigotas ($\pm$ 20%); 4) Os sedimentos apresentaram quantidades equivalentes de células HeLa e de formas amastigotas ($\pm$ 50%), com um baixo conteúdo de tripomastigotas (<10%) (Tabela 3).

O processo de fracionamento de suspensões de células em gradientes de densidade, resulta sempre em preparações apenas enriquecidas em um dos componentes. Qualquer tentativa adicional de obtenção de amostras totalmente puras, acaba comprometendo o rendimento no final do processo, obtendo-se muitas vezes, uma quantidade pouco satisfatória de cada componente (Boyum, 1976; Mishell e cols, 1980; Sharon, 1983).

A atividade de neuraminidase sobre eritrócitos humanos foi testada por vários períodos de tempo com cada fração do gradiente, através da aglutinação com a PNA. De acordo com a Tabela 4, foram observados os seguintes resultados: 1) Nenhuma atividade foi detectada nos sobrenadantes, ou seja, na ausência de células ou parasitas; 2) As amostras isoladas da interfase, ricas em tripomastigotas, apresentaram atividade evidente a partir das primeiras horas de incubação (1/32; 6h) e os títulos de aglutinação de eritrócitos pela PNA, aumentaram gradativamente com o tempo (1/64 e 1/128; 8h e 12h, respectivamente); 3) Nas amostras que foram separadas da zona abaixo da interfase, contendo predominantemente formas amastigotas, a atividade foi bem inferior mesmo após 12 horas de incubação (1/4); 4) Os sedimentos contendo praticamente células HeLa e amastigotas, apesar da presença de algumas formas flageladas, apresentaram resultados negativos durante todo o experimento.

Ao analisarmos estes dados, podemos concluir que a atividade de neuraminidase está associada com as formas tripomastigotas. As formas amastigotas, caso apresentem atividade, a quantidade de neuraminidase deve ser muitas vezes inferior à dos tripomastigotas. Mesmo considerando-se o título de 1:4, observado após a incubação dos

eritrocitos com as amostras obtidas da região abaixo da interfase (Tabela 4), a atividade poderia ser atribuída aos tripomastigotas remanescentes. Como podemos notar, à medida que decresce a quantidade de formas tripomastigotas nestas amostras, menores são os títulos de aglutinação dos eritrocitos com a PNA. Em experimentos com quantidades variáveis de tripomastigotas, tal fato pôde ser confirmado (dados não apresentados).

Estes dados estão de acordo com Pereira (1983a) o qual demonstrou que as formas tripomastigotas de cultura, apresentaram a maior atividade específica de neuraminidase sobre diferentes substratos, e que as formas amastigotas não possuíam nenhuma atividade. O mesmo autor concluiu também, que os maiores títulos de aglutinação de eritrocitos pela PNA, foram atingidos após 8 horas de incubação na presença de aproximadamente 10^7 tripomastigotas (Pereira, 1983a).

Em nossos experimentos, as várias amostras enriquecidas de tripomastigotas, foram ajustadas a concentrações entre 10^7 e 10^8 parasitas flagelados por mililitro de PBS, e foram armazenadas a -20°C . No momento de uso, após o descongelamento sempre foi adicionado o inibidor de proteases (PMSF - 1mM), para impedir a auto-degradação do extrato, na tentativa de se manterem íntegras as estruturas liberadas após a lise dos parasitas. Estes extratos foram utilizados sob a forma bruta (EBT) ou desdobrados em 2 frações, solúvel (EST) e insolúvel (EIT), através da centrifugação.

De acordo com a Figura 1, podemos comparar a atividade de tripomastigotas viáveis (TV) com as dos extratos EBT, EST e EIT sobre eritrocitos, por vários períodos de tempo. Nestes experimentos foram

observados os seguintes resultados: 1) Os títulos de aglutinação de eritrocitos após incubação com os TV, foram os mesmos que os obtidos com o EST ao longo de todo o experimento (Figura 1); 2) A atividade do EBT, também foi igual, porém só pôde ser medida durante as primeiras 6 horas de incubação. Depois desse período, uma grande parte dos eritrocitos foi destruída (± 50), impossibilitando a determinação dos títulos de PNA; 3) A atividade do EIT foi bem inferior ($<1/10$), e também por causa da hemólise, não pôde ser medida além de 6 horas de incubação (Figura 1).

O fato da atividade de neuraminidase não ter sido detectada nos sobrenadantes de culturas, após a remoção dos tripomastigotas (dados não apresentados), sugerem que esta poderia estar associada a algum componente estrutural e de superfície dos parasitas, sendo necessário o contato direto destes com os eritrocitos. Entretanto, os experimentos com os extratos de tripomastigotas lisados comprovam que a atividade de neuraminidase, pode ser detectada sob a forma solúvel (Figura 1). No procedimento para obtenção do EBT, nenhum agente solubilizador foi utilizado, adicionando-se apenas o inibidor de proteases, depois da fragmentação dos parasitas por congelamento e descongelamento.

Pereira (1983a) propôs que a neuraminidase seria um componente de membrana de *T. cruzi*, podendo ser detectada mesmo na fração insolúvel, obtida após a lise dos parasitas e lavagens exaustivas do sedimento com água destilada. O autor não menciona a ocorrência de hemólise em nenhum de seus experimentos, apesar de que estes foram realizados na presença de vários inibidores metabólicos e enzimáticos (Pereira 1983a, b).

Em função destas diferenças nos procedimentos de obtenção dos extratos de tripomastigotas, podemos afirmar que a neuraminidase, mesmo sendo um componente de superfície, estaria sendo liberada durante a fragmentação das membranas destes parasitas. A centrifugação do EBT, a 10.000 x g separou nitidamente as duas atividades, recuperando-se no sobrenadante, toda a atividade de neuraminidase, e ficando a hemolítica concentrada na fração insolúvel.

Recentemente, Libby e cols (1986) utilizaram como fonte de neuraminidase, meio de cultura condicionado através da incubação de tripomastigotas à temperatura de 4°C por 48 a 72 horas. Em nossos experimentos, nenhuma atividade foi detectada nos sobrenadantes de culturas a 37°C (dados não demonstrados). Baseando-se neste fato, podemos aceitar que a neuraminidase seja uma estrutura liberada da superfície de tripomastigotas, somente em baixas temperaturas. Entretanto esta afirmação necessita de melhores esclarecimentos.

Em um experimento, foram controladas as atividades hemolíticas de amostras de EBT, EST e EIT sobre eritrocitos humanos, através da determinação das porcentagens de hemoglobina liberada nos sobrenadantes. Na Tabela 5 estão demonstrados os valores obtidos em vários períodos de tempo, e de acordo com os mesmos, podemos verificar que somente as amostras de EBT e EIT apresentaram atividade hemolítica significativa. A porcentagem de lise aumentou gradativamente e no final do experimento, depois de 18 horas de incubação, cerca de 90% dos eritrocitos foram destruídos.

Na presença do EST, a porcentagem de hemólise foi semelhante à dos controles contendo PBS ou neuraminidase de *C. perfringens* (NCp), que não ultrapassaram o valor de 3,5% (Tabela 5).

Através de estudos com o *T. congolense*, Tizard & Holmes (1976), descreveram a ocorrência de um fenômeno semelhante, detectando atividade hemolítica sobre eritrócitos de carneiro, durante o contato "in vitro" com os parasitas. O fato mais importante destes experimentos, foi a constatação de que os elementos responsáveis pelo efeito citotóxico, eram liberados pela auto-degradação do material insolúvel obtido após a lise dos parasitas. Verificou-se posteriormente, que nenhuma hemólise era detectada antes de 8 horas de incubação, sendo assim, desnecessário o contato dos eritrócitos com o material durante este período (Tizard e cols, 1977). Os fatores hemolíticos resultantes da auto-degradação do material insolúvel foram caracterizados como sendo ácidos graxos saturados, liberados durante um longo período de incubação, mas uma vez gerados, eram capazes de lisar totalmente os eritrócitos em poucos minutos após o contato (Tizard & Holmes, 1976; Tizard e cols, 1977).

Ao compararmos estes dados com os obtidos no experimento da Tabela 5, podemos verificar que as atividades hemolíticas dos extratos, tanto de *T. congolense* quanto de *T. cruzi*, só foram detectadas depois de um longo período de incubação. Entretanto nenhuma diferença foi observada, entre extratos de *T. cruzi* adicionados aos eritrócitos imediatamente ou após incubação prévia, por 8 a 12 horas, a 37° C. Mesmo na ausência do inibidor de proteases, a incubação prévia do EST não gerou nenhum componente capaz de lisar a totalidade dos

eritrocitos, antes do período necessário ao mesmo material, quando adicionado imediatamente após a sua preparação (dados não apresentados).

Componentes hemolíticos ou citotóxicos, também podem ser detectados em preparações de neuraminidases derivadas de outros microrganismos patogênicos, tais como *V.cholerae* e *C.perfringens* (Ada e cols, 1961; Kraemer, 1968). Estes contaminantes geralmente estão relacionados com a presença de proteases, lipases e fosfolipases (lecitinases), que podem atuar diretamente sobre a membrana das células, ou gerar componentes citotóxicos através da ação sobre diferentes substratos (Kraemer, 1968; Deuticke e cols, 1981).

A complexidade dos compostos presentes nas preparações de EST e de EIT, ao lado da necessidade de um longo período de incubação com os eritrocitos, são elementos favoráveis ao crescimento de microrganismos contaminantes. Por esta razão, as atividades destes extratos foram testadas em condições estéreis e na presença de NaN₃, EDTA, PMSF e E-ACA, ou após aquecimento dos extratos em banho de água fervente. De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 6, podemos observar os seguintes fatos: 1) A atividade de neuraminidase do EST não foi bloqueada por nenhuma das substâncias adicionadas, apesar de que na ausência destas, mais de 50% dos eritrocitos foram lisados; 2) Na presença das substâncias, a hemólise causada pelo EST foi inibida; 3) O aquecimento aboliu totalmente as atividades de neuraminidase e hemolítica dos 2 extratos (EST e EIT); 4) Nenhuma das substâncias foi capaz de bloquear a atividade hemolítica do EIT, nas concentrações em que foram testadas.

Estes dados comprovam que as atividades dos extratos não são decorrentes de crescimento bacteriano, durante o longo período de incubação. Todavia a possibilidade da contaminação dos materiais em etapas anteriores, mesmo durante o cultivo ou isolamento dos parasitas, não pode ser eliminada. De certa forma, a atividade hemolítica detectada no EST pode ser atribuída aos mesmos elementos presentes no EIT, porém em quantidades bem inferiores. Por esta razão, a hemólise foi bloqueada pelos vários inibidores metabólicos e enzimáticos nas concentrações indicadas, sendo entretanto insuficientes para inibir a mesma atividade do EIT (Tabela 6).

O aquecimento do EST e do EIT, à temperatura de ebulição da água durante 5 minutos, foi suficiente para destruir totalmente a atividade hemolítica. Todavia a atividade de neuraminidase do EST, apesar de persistir na presença das substâncias, também foi destruída durante o tratamento pelo calor (Tabela 6). Estes dados comprovam que o efeito hemolítico, assim como a remoção de ácido Siálico, são provocados por enzimas cujas atividades são destruídas após desnaturação.

Nos estudos de infecções experimentais por tripanosomas, frequentemente são utilizados camundongos, os quais apresentam grandes quantidades de parasitas na circulação durante a fase aguda. Este estado parasitêmico pode ser letal para algumas linhagens isogênicas, enquanto que outras mais resistentes, conseguem sobreviver e passam para a fase crônica da infecção (Kierszenbaum & Howard, 1976; Corsini e cols, 1980, 1982).

Em função da parasitemia, vários componentes do plasma, sejam células ou moléculas, entram em contato direto com os parasitas e seus

produtos, tornando-se susceptíveis a modificações. Desta forma, foram estabelecidos dados comparativos, entre os eritrocitos humanos e de camundongos durante incubações com EST, EIT e NCp. Neste experimento foram utilizados eritrocitos humanos de grupos sanguíneos diferentes e das linhagens de camundongos CBA, C57BL10 e seus híbridos (CBAxC57BL10)F1. As linhagens foram selecionadas, baseando-se na susceptibilidade (CBA) e resistência (C57BL10 e F1) à infecção com a cepa Y de *T.cruzi* (Corsini e cols, 1980).

De acordo com a Tabela 7, podemos verificar que não existem diferenças nos títulos de aglutinação de eritrocitos humanos pela PNA, qualquer que seja o grupo sanguíneo ABO, depois de tratados com a NCp. Da mesma maneira, eritrocitos de camundongos de linhagens distintas, também não apresentaram títulos diferentes entre si. Por outro lado, notamos uma diferença marcante entre os títulos de aglutinação das células humanas e de camundongos, quando tratadas com NCp ou EST sob as mesmas condições. Conforme o esperado, os títulos resultantes das incubações de ambos os tipos de eritrocitos com o EST, foram bem inferiores aos obtidos com a NCp. Entretanto, nenhuma diferença foi constatada também entre as 3 linhagens de camundongos, ou entre os doadores humanos de grupos sanguíneos diferentes (Tabela 7). A incubação dos eritrocitos, tanto humanos quanto de camundongos com o EIT, resultou em hemólise total ao término do experimento, sem nenhuma diferença significativa em relação às observações anteriores (dados não apresentados).

Como podemos verificar, os títulos de aglutinação dos eritrocitos de camundongos com PNA, foram bem inferiores aos dos eritrocitos

humanos depois de incubados, tanto com NCp quanto com EST (Tabela 7). De acordo com alguns autores, o teor de ácido Siálico na superfície de eritrocitos, pode variar nas diversas espécies de mamíferos (Neville & Glossmann, 1971; Durocher e cols, 1975; Corfield & Shauer, 1979). Porém, a reatividade da PNA não está associada apenas a este fato. Na verdade a lectina liga-se a resíduos D-Galactosídicos, que tornam-se acessíveis somente depois da remoção de moléculas de ácido Siálico (Lotan e cols, 1975; Tomita & Marchesi, 1975). Portanto os dados observados na Tabela 7, demonstram que a estrutura oligossacarídica na superfície dos eritrocitos humanos, parece ser relativamente diferente quanto ao conteúdo de resíduos de D-Galactose, em comparação aos eritrocitos de camundongos. Por esta razão, os eritrocitos humanos foram sempre utilizados nos experimentos de detecção e de inibição da atividade de neuraminidase de **T.cruzi**.

Os dados apresentados no momento, comprovam que o contato de eritrocitos "in vitro", com as formas tripomastigotas de **T.cruzi**, ou com produtos derivados da lise dos mesmos, pode causar alterações nas membranas destas células. Tais modificações podem variar desde a simples remoção de moléculas de ácido Siálico de superfície, até a liberação do conteúdo citoplasmático, pela ruptura da membrana do eritrocito. A consequência imediata destes fenômenos, caso estejam ocorrendo "in vivo", seria a constatação da diminuição da quantidade de glóbulos vermelhos no sangue do hospedeiro.

Os sintomas de anemia são muito frequentes nas Tripanosomíases Africanas, sendo detectada precocemente, tanto no homem quanto em animais domésticos, durante a fase aguda destas doenças (ILRAD

reports, 1984). Várias modificações hematológicas foram descritas durante as infecções por **T.congolense** e **T.brucei** (Ikede e cols, 1977), ou por **T.vivax** (Esievo e cols, 1982). Através de experimentos com camundongos infectados por **T.cruzi**, também foi constatada a ocorrência de anemia, leucopenia e trombocitopenia (Cardoso & Brener, 1980; Repka e cols, 1985).

A anemia nestes casos, poderia estar ocorrendo por 3 razões : a) Pela destruição maciça de eritrocitos no próprio compartimento intravascular; b) Através da remoção destas células do sangue, por órgãos que interpõe-se a circulação, como o fígado e o baço; c) Por um distúrbio hematopoiético, com diminuição da reposição dos eritrocitos circulantes. No primeiro caso, a elevação dos níveis de bilirrubina no sangue, seria o achado laboratorial predominante, porém este fato raramente ocorre durante as tripanosomíases (Greenwood, 1974; Cardoso & Brener, 1980). Todavia, a remoção pelo fígado ou pelo baço, necessita de uma modificação prévia na superfície dos eritrocitos, seja estruturalmente (Cattegnó e cols, 1974; Durocher e cols, 1975), ou através da opsonização (Czop e cols, 1978; Jancík e cols, 1978; Braun e cols, 1983). Finalmente, a possibilidade de alterações hematopoiéticas durante as infecções por tripanosomas, apesar de descartada por Assoku (1975) nas tripanosomíases Africanas, ainda necessita de melhores estudos.

Durante os picos de parasitemia, diversos componentes liberados após a lise de tripanosomas na circulação, tais como enzimas, hemolisinas e toxinas, podem ser os responsáveis pela destruição ou sequestro dos eritrocitos, além de outros distúrbios

hematológicos e imunológicos observados na fase aguda da infecção.

A severidade destas alterações, pode variar com a espécie de tripanosoma ou com diferenças genéticas entre hospedeiros, que em alguns casos pode resultar na morte dos mesmos (ILRAD reports, 1984). Entretanto, algumas proteínas que ocorrem naturalmente no plasma, apresentam ampla capacidade de neutralizar muitos destes componentes parasitários. As variações genéticas, em termos quantitativos ou qualitativos destes fatores neutralizantes, é que devem determinar os caracteres de susceptibilidade e resistência, entre linhagens isogênicas de camundongos.

Em um experimento isolado, a atividade hemolítica do EIT sobre eritrocitos humanos, foi bloqueada na presença de soro normal de camundongo. A atividade de neuraminidase permaneceu pouco alterada neste material sob as mesmas condições (dados não apresentados). Entretanto, a atividade de neuraminidase do EST sobre eritrocitos, foi totalmente inibida por vários lotes de soros de camundongos (CBA x C57BL10)F1, colhidos 6 semanas após a infecção com **T.cruzi**.

De acordo com a Tabela 8, podemos verificar um bloqueio total da atividade de neuraminidase do EST, por 4 lotes diferentes de soros de camundongos infectados (SCI). O mesmo efeito não foi conseguido com os 2 lotes de soros normais de camundongos (SNC) e nenhum dos soros normais ou de animais infectados, foram capazes de bloquear a atividade da NCp.

Neste experimento foi impossível a correlação entre a capacidade bloqueadora e os títulos de anticorpos contra tripomastigotas, detectados nos soros através a imunofluorescência indireta (Tabela 8). Por este motivo, as atividades inibitórias de 2 destes SCI (Lotes 2 e 12) e do Lote 1 de SNC, foram analisadas em diferentes diluições. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 2, onde podemos verificar que os lotes de SCI perderam totalmente a capacidade de inibição, depois de diluídos 100 vezes em PBS. Em diluições intermediárias (1/10 e 1/50), ambos inibiram parcialmente a atividade do EST, porém o Lote 12 apresentou-se mais efetivo do que o Lote 2 (Neg;1/32 e 1/2;1/64, respectivamente). O Lote 1 de SNC, que havia bloqueado ligeiramente esta atividade, reduzindo em uma casa o título de aglutinação pela PNA (de 1/256 para 1/128), perdeu totalmente esta propriedade quando diluído 1/10 (Fig.2).

A capacidade inibitória dos SCI, pode ter várias explicações: a) Por competição de muitas glicoproteínas séricas, ricas em ácido Siálico, pelo sítio ativo da neuraminidase; b) Por interação desta com algum bloqueador enzimático específico, cuja concentração aumentou em decorrência da própria infecção dos camundongos por **T.cruzi**; c) Anticorpos inespecíficos, dirigidos para antígenos de superfície dos eritrocitos, poderiam estar competindo com a neuraminidase, pela reação direta com o mesmo sítio de combinação ou com estruturas próximas deste; d) Finalmente, anticorpos específicos para antígenos de tripomastigotas, estariam reagindo diretamente com a neuraminidase, bloqueando totalmente a sua atividade.

A infecção experimental de camundongos por **T.cruzi**, pode causar diversos distúrbios imunológicos, tais como a ativação

policlonal de linfócitos, induzindo o aparecimento de anticorpos reativos a antígenos não relacionados com os parasitas (Brener, 1980; Ortiz-Ortiz e cols, 1980 ; Tanowitz e cols, 1981) . Com a finalidade de se comprovar a existência de anticorpos específicos para tripomastigotas, capazes de inibir a atividade de neuraminidase do EST, foram realizados dois experimentos distintos. Na primeira etapa, os SCI foram absorvidos com preparações contendo separadamente: 1) formas tripomastigotas de culturas; 2) amastigotas e células HeLa infectadas; 3) eritrocitos humanos, obtidos de vários doadores normais. Em seguida, uma mistura de SCI foi passada através de uma coluna de Proteína A-Sepharose (spA), para a separação dos anticorpos da classe IgG. A fração que passou livre pela coluna (não adsorvido) e a fração adsorvida (eluída em pH 2,6) , foram recuperadas e a capacidade inibitória foi testada com ambas.

De acordo com a Figura 3 podemos observar inicialmente, que após absorções dos SCI, não diluídos, com formas tripomastigotas, a capacidade bloqueadora da atividade da neuraminidase do EST foi parcialmente abolida. Entretanto, o efeito inibitório dos dois lotes de SCI em nada foi alterado, mesmo depois de absorvidos com células HeLa e amastigotas, ou com eritrocitos humanos, apresentando resultados negativos, da mesma forma que os controles sem absorções. A medida que os SCI foram diluídos, os títulos de aglutinação de eritrocitos com a PNA aumentaram, porém valores iguais aos dos SNC, só foram atingidos com os soros absorvidos com tripomastigotas. Uma ligeira elevação nos títulos aglutinantes, pouco significativa, foi verificada com o lote 2, absorvido com células HeLa e amastigotas (Fig.3A). Nenhuma diferença foi detectada entre os SCI absorvidos com eritrocitos humanos e os mesmos sem absorções (Figura 3A e B).

Estes dados comprovam que os elementos bloqueadores da atividade de neuraminidase do EST, presentes nos SCI, foram capazes de reagir com a superfície de tripomastigotas, sendo removidos após a centrifugação. Durante o procedimento de absorção foram utilizadas as formas tripomastigotas viáveis, pois a absorção com parasitas fixados por formol 2%, não modificou em nada a capacidade inibidora destes soros (dados não apresentados). Todavia, as absorções com TV, poderiam resultar na contaminação dos soros por algum composto solúvel, em decorrência da lise dos parasitas. Este parâmetro foi controlado e nenhuma atividade de neuraminidase pôde ser detectada nos soros, depois de absorvidos com TV, durante incubação com eritrocitos humanos na ausência de EST (dados não apresentados).

Um volume de 6 ml de mistura de SCI, foi aplicado na coluna de Proteína A-Sepharose. A fração que não ficou adsorvida, foi recuperada sem ter ocorrido uma diluição considerável do material. Por outro lado, a fração adsorvida, foi eluída em 14 alíquotas de 1 ml, ficando portanto diluída mais do que 2 vezes. A Figura 4 demonstra os resultados da aglutinação de eritrocitos com a PNA, obtidos após a incubação com EST, na presença das duas frações que foram separadas pela coluna de SpA e do soro total. De acordo com estes resultados, podemos verificar que as duas frações foram capazes de bloquear, apenas parcialmente a atividade do EST, sendo que a fração adsorvida foi mais potente que a não adsorvida. Entretanto, o soro total foi o mais efetivo quanto à capacidade de bloquear a atividade do EST.

Os resultados das Figuras 3 e 4, quando analisados em conjunto, demonstram que a atividade inibitória dos SCI está associada a presença de anticorpos específicos, apesar de que a possibilidade da

participação de componentes séricos distintos das imunoglobulinas, não deve ser desprezada. Como a passagem de soros em coluna de SpA retém apenas grande parte das Imunoglobulinas de camundongos da classe IgG, outras classes de imunoglobulinas, tais como IgM, poderiam ser as responsáveis pela capacidade inibitória remanescente na fração não adsorvida.

A capacidade bloqueadora da atividade de neuraminidase foi descrita também, para soros de pacientes portadores de infecções virais. Baseado neste fenômeno, foi estabelecido um método de diagnóstico laboratorial, através da inibição da aglutinação de eritrocitos pela PNA (Luther e cols, 1983). No caso dos SCI, estes além de reagirem com formas tripomastigotas em testes de imunofluorescência indireta, foram capazes também, de proteger camundongos da mortalidade causada pela infecção por **T.cruzi**, através da transferência passiva (Repka e cols, 1982). O fato destes soros possuírem a propriedade adicional de inibir a atividade de neuraminidase de **T.cruzi**, poderia estar associado com a capacidade protetora, desde que seja demonstrada a participação da enzima na patogenia da infecção experimental.

Através da aglutinação pela PNA, Pereira (1983a) verificou a ocorrência da atividade de neuraminidase sobre eritrocitos de camundongos, "in vivo", durante a fase aguda da infecção por **T.cruzi**. Entretanto, segundo este autor, os camundongos foram irradiadas antes da inoculação dos parasitas, e o teste de aglutinação com a lectina foi realizado em tampão contendo Etilenoglicol a 30%, com a finalidade de aumentar a sensibilidade do método (Pereira, 1983a).

Um experimento semelhante foi realizado com células de camundongos CBA, susceptíveis à infecção por **T.cruzi**, porém não irradiados, obtidas durante o pico de parasitemia. Nenhuma aglutinação de eritrocitos com a PNA pôde ser detectada, mesmo em presença de Etilenoglicol, BSA ou Dextran, os quais favorecem as interações nos métodos de hemaglutinação (dados não apresentados). Entretanto, a ocorrência da atividade de neuraminidase "in vivo", necessita ainda de estudos mais detalhados.

Assoku (1975) constatou a presença de anemia, causada pela remoção de eritrocitos da circulação pelo SRE (Sistema Mononuclear - Fagocitário), em ratos infectados com **T.evansi**, relacionando com distúrbios imunológicos inespecíficos. Ikede e cols (1977), demonstraram um aumento da destruição de eritrocitos pelo baço, em camundongos infectados por **T.brucei** e **T.congolense**. Cardoso & Brener (1980) e Repka e cols (1985), descreveram a ocorrência de anemia em camundongos, durante a fase aguda da infecção por **T.cruzi**. Esievo e cols (1982), associaram sintomas de anemia, em animais infectados com **T.vivax**, com a diminuição da quantidade de ácido Siálico na superfície dos eritrocitos, e aumento no plasma sob a forma solúvel.

Todos esses dados apoiam a hipótese de que a anemia, ao lado de outros distúrbios mais severos, estaria diretamente associada com a morte de animais susceptíveis, durante a fase aguda das infecções por tripanosomas. A anulação de alguns dos efeitos, como por exemplo, os causadores de anemia, apesar de modificar muito pouco o curso da doença, poderia prolongar o tempo de sobrevivência dos animais. De forma interessante, este fenômeno de aumento da sobrevivência ocorre após a transferência passiva de soros hiperimunes, para camundongos

susceptíveis, antes da inoculação dos parasitas (Repka e cols, 1982; Trischann, 1983). Os anticorpos ou outros fatores específicos presentes nestes soros, poderiam estar bloqueando de forma efetiva, algum componente do parasita com capacidade de modificar estruturalmente ou de agredir diretamente os eritrocitos na circulação.

Estudos comparativos para o estabelecimento de quais sintomas estariam realmente contribuindo com a morte dos hospedeiros, necessitam de uma elaboração mais detalhada, para que possamos constatar quais destes, estariam sendo atenuados ou abolidos totalmente após a transferência passiva de soros imunes.

Grogl & Kuhn (1985), constataram diferenças no padrão de resposta humoral entre camundongos resistentes e susceptíveis à infecção por **T.cruzi**, ao analisarem a reatividade de anti-soros obtidos destes animais, contra diversos componentes antigênicos do parasita. Os autores sugeriram que as diferenças de reatividade observadas com os anti-soros, poderiam estar relacionadas com as variações na susceptibilidade dos camundongos ao **T.cruzi** (Grogl & Kuhn, 1985).

Apesar da resistencia à mortalidade de algumas linhagens de camundongos, durante a fase aguda da infecção, tais hospedeiros podem sobreviver por um período de tempo limitado, devido à instalação do parasita em vários tecidos. Em decorrência deste fato, muitos pesquisadores têm-se empenhado em estudos sobre alterações morfológicas e funcionais de tecidos invadidos por tripanosomas, ou sobre as interações entre estes e células de mamíferos (Ribeiro dos Santos & Hudson, 1980; Andrade, 1983; Nogueira, 1983; Zingales & Colli, 1985).

Recentemente, Libby e cols (1986), demonstraram a atividade de neuraminidase sobre células endoteliais e de miocárdio de ratos, após o contato "in vitro", com formas tripomastigotas de **T.cruzi**, ou com meio condicionado através do cultivo dos parasitas a 4°C. Nestes experimentos descartou-se a possibilidade da presença de alguma atividade proteolítica ou glicolítica, de forma que os únicos componentes liberados da superfície das células foram moléculas de ácido Neuramínico (Libby e cols, 1986).

A remoção de resíduos de ácido Siálico da superfície de células endoteliais ou de miocárdio, pode induzir uma série de fenômenos relacionados com a infecção por **T.cruzi**. O tratamento de células endoteliais com neuraminidase, aumenta a aderência de granulocitos e plaquetas (Hoover e cols, 1978; Gorog e cols, 1982), podendo induzir a formação de trombos e fibrose de miocárdio. Estes sintomas são frequentemente encontrados em camundongos infectados experimentalmente por **T.cruzi** (Rossi e cols, 1984; Factor e cols, 1985). O próprio funcionamento normal das células de miocárdio, pode ser alterado por tratamento com neuraminidase (Frank e cols, 1977; Woods e cols, 1982).

Portanto, os sintomas de anemia observados na fase aguda, e de comprometimento cardíaco na fase crônica, podem estar relacionados com a atividade de neuraminidase de **T.cruzi**, que ao lado de outros fatores seriam responsáveis pela morte dos hospedeiros.

De acordo com a Figura 5 e Tabela 9, podemos verificar que as células imunocompetentes, da mesma forma que os eritrocitos, também são susceptíveis às alterações provocadas por produtos de tripomastigotas. Ao analisarmos a viabilidade de células Mononucleares (MN) humanas, após incubação por vários períodos de tempo em presença

de tripomastigotas (TV) ou dos extratos EBT, EST e EIT, verificamos os seguintes resultados (Figura 5): a) As porcentagens de células viáveis decresceram lentamente, em função do tempo de incubação com os TV e com o EST, permanecendo porém superior a 60%, depois de 8 horas; b) Por outro lado, a viabilidade destas células diminuiu acentuadamente, durante a incubação com as amostras de EBT e EIT, sendo inferior a 20% após 4 horas; mesmo antes de terminado o experimento todas as células foram lisadas (100 % após 6 h); c) Durante a incubação de células MN com HBSS, a viabilidade manteve-se pouco alterada até o final do experimento (> 80%), e após 4 horas a porcentagem de células viáveis foi semelhante às obtidas com TV e EST (Figura 5).

Estes dados comprovam a existência de produtos citotóxicos em grande quantidade, nas amostras de EBT e EIT. Por esta razão, a atividade de neuraminidase sobre as células MN foi estudada apenas com amostras de TV e EST, por um período de 4 horas. A atividade foi constatada sobre células humanas e de camundongos, depois da adição da PNA, através da observação direta ao microscópio comum. Os resultados destes experimento estão demonstrados na Tabela 9, onde podemos observar a ocorrência de aglutinação das células MN, depois do contato com TV e EST, por 4 horas a 37°C. Além desse período, as células apresentaram forte tendência a formar agregados, mesmo na ausência da PNA, em função do decréscimo da viabilidade (dados não apresentados).

As variações nas quantidades de resíduos de ácido Siálico na superfície de linfócitos, determinam estados de maturação ou de diferenciação de subpopulações de células T e B (Nordling e cols,

1972; Despont e cols, 1975; Reisner e cols, 1976; Sharon, 1983) e o padrão de recirculação e colonização das mesmas, nos diversos tecidos linfóides (Woodruff & Gesner, 1968; Samlowski e cols, 1984; Rosen e cols, 1985). Por outro lado, a remoção destes resíduos por tratamento com neuraminidase, pode alterar a antigenicidade (Grothaus e cols, 1971; Rosenberg e cols, 1972; Ray & Simmons, 1973), ou o padrão de respostas, alogênica (Lundgren & Simmons, 1971) e mitogênica (Novogrodsky & Katchalski, 1973a,b; Novogrodsky e cols, 1975, 1980), de linfócitos "in vitro".

Quanto à atividade fagocitária, existe um grande número de publicações a respeito da modulação por resíduos de ácido Siálico e outros sacarídeos, tanto na superfície das "partículas" (Bradfield e cols, 1974; Czop e cols, 1978), quanto das células fagocíticas (Samlowski e cols, 1984), revistas recentemente por Sharon (1984). Através da utilização de várias lectinas de plantas, foram realizados alguns estudos sobre a caracterização de sacarídeos de superfície das diferentes formas evolutivas de **T.cruzi** (Pereira, 1980) e da importância destas estruturas, nas interações com os macrófagos (Araujo-Jorge & Souza, 1986).

A literatura a respeito das alterações da resposta imune durante as tripanosomíasis experimentais é tão vasta, que seria conveniente citar apenas os fenômenos observados mais frequentemente: 1) Aumento dos níveis basais da resposta de anticorpos a diversos tipos de eritrócitos heterólogos, em decorrência de uma ativação policlonal de linfócitos B, constatada através da contagem de células formadoras de placas (PFC), durante a fase inicial da infecção (Corsini e cols, 1977; Kobayakawa e cols, 1979; Ortiz-Ortiz e cols, 1980; Corsini &

Costa, 1981a; O'Daly e cols, 1984); 2) A ativação policlonal pode provocar simultaneamente, uma resposta autoimune (Kobayakawa e cols, 1979), ou 3) induzir um estado de imunodepressão da resposta, a diversos antígenos não-relacionados com os parasitas (Murray e cols, 1974a,b; Ramos e cols, 1978; Corsini e cols, 1980a,b; Corsini & Costa, 1981b); 4) Estes distúrbios podem ser mimetizados também, pela injeção de extratos de tripanosomas (Assoku e cols, 1979; Corsini & Costa, 1981a); 5) A resposta mitogênica "in vitro", de linfócitos de camundongos infectados por **T.cruzi**, apresenta-se suprimida na fase aguda (Kierszenbaum & Hayes, 1980; Hayes & Kierszenbaum, 1981; Lalonde e cols, 1985) e pode ser atribuída a células T-supressoras (Ramos e cols, 1979), a fatores liberados por macrófagos (Kierszenbaum, 1982), ou à ação direta de produtos do parasita (Maleckar & Kierszenbaum, 1983).

Portanto, as atividades de neuraminidase, hemolítica e citotóxica, além de outros fatores derivados de **T.cruzi**, podem resultar em uma série de modificações estruturais e funcionais, diretamente relacionadas com os distúrbios imunohematológicos que são comumente observados durante a infecção. As células atingidas, evidentemente são representadas pelos eritrocitos, linfócitos e macrófagos e os estudos das alterações morfológicas e funcionais destas, podem acrescentar algumas informações importantes no esclarecimento dos fenômenos.

5 . C O N C L U S Õ E S

Neste trabalho ficou comprovada mais uma vez, a importância da utilização da lectina PNA (mesmo sob a forma semi-purificada) como um reagente capaz de discriminar entre superfícies de células normais ou alteradas pela ação da neuraminidase. Esta substância constitui-se atualmente, de um marcador específico de estados de maturação, diferenciação e ativação de células imunocompetentes, em suspensões ou em cortes de tecidos (Butcher e cols, 1982; Sharon, 1983; Hsu & Ree, 1983; Cooper, 1984). Através de sua utilização pôde-se demonstrar a atividade de neuraminidase de **T.cruzi**, sobre eritrocitos e células MN, humanas ou de camundongos, além da inibição da mesma por soros-imunes, de animais portadores de infecção crônica.

A atividade de neuraminidase foi detectada em formas tripomastigotas viáveis ou em extratos solúveis, obtidos após a lise dos parasitas e centrifugação. A porção insolúvel resultante destes lisados, apresentou-se tóxica para eritrocitos e células MN, porém em função de sua composição heterogênea, não foi possível a caracterização deste material. Entretanto, a recuperação da neuraminidase, sob a forma solúvel e com baixo nível de toxicidade, torna bastante promissora a tentativa de sua purificação, a partir de grandes quantidades de sobrenadantes de culturas de tripomastigotas.

Finalmente, a constatação da capacidade bloqueadora da neuraminidase de **T.cruzi**, por soros que possuem também a propriedade protetora de camundongos susceptíveis à infecção, devem aventar a possibilidade de participação desta enzima na patogenia da Doença de Chagas.

6. RESUMO

Eritrocitos humanos quando incubados em presença de formas tripomastigotas (TV) de *T. cruzi*, tornam-se aglutináveis pela lectina de amendoim (PNA). Este fenômeno ocorre devido à atividade de neuraminidase derivada destes parasitas. No presente trabalho foram estudados os seguintes parâmetros: a) Detecção da atividade de neuraminidase em extratos brutos (EBT), solúveis (EST) e insolúveis (EIT) de tripomastigotas, sobre eritrocitos e células mononucleares (MN); b) Inibição desta atividade por soros de camundongos infectados (SCI) por *T. cruzi*, capazes de reagir com tripomastigotas em reações de imunofluorescência indireta.

Utilizaram-se como fonte de parasitas, as formas tripomastigotas de sobrenadantes de culturas de células HeLa infectadas com a cepa Y. A atividade de neuraminidase destes sobre células, foi detectada através da aglutinação com PNA.

Os resultados obtidos demonstraram que: 1) A atividade do EST foi idêntica à dos TV, o mesmo não ocorrendo com o EBT ou com o EIT; 2) A atividade do EST foi bloqueada especificamente pelos SCI, os quais foram incapazes de inibir a atividade de neuraminidase de *C. perfringens*; 3) Resultados semelhantes foram obtidos com a fração IgG, resultante da passagem dos SCI em coluna de Proteína A-Sepharose.

Os dados sugerem que a atividade de neuraminidase de *T. cruzi* pode ser detectada sob a forma solúvel, após a lise dos parasitas e que anticorpos contra os mesmos, foram capazes de bloquear esta atividade. Além de eritrocitos, células MN também são alteradas após a incubação com TV e EST, possibilitando-nos aventar a hipótese de que esta enzima estaria relacionada com distúrbios imunológicos, provocados pelo *T. cruzi*, e que animais menos susceptíveis à infecção, podem produzir anticorpos específicos contra a mesma.

7. BIBLIOGRAFIA

01. ADA, G.L.; FRENCH, E.L. & LIND, P.E. (1961) Purification and properties of neuraminidase from *V.cholerae*. *J.Gen.Microbiol.* 24:409-421.
02. ANDRADE, Z.A. (1983) Mechanisms of myocardial damage in *T.cruzi* infection. In "*Cytopathology of parasitic disease*", Pitman Books, London (Ciba Foundation Symposium 99) pg:214-233.
03. ARAÚJO, F.G. (1984) Resistance to *T.cruzi* induced by immunization with antigens isolated by affinity chromatography. *Brazilian J. Med.Biol.Res.* 17:157-164.
04. ARAÚJO, F.G. & TIGHE, L. (1984) Antigens of *T.cruzi*: Evidence that the 90Kd protective glycoprotein antigen is expressed in blood-form trypomastigotes and may not be functional in dead epimastigotes. *J.Parasit.* 70:185-187.
05. ARAÚJO-JORGE, T.N. & SOUZA, W. (1986) Interaction of *T.cruzi* with macrophages: effect of previous incubation of parasites on the host cells with lectins. *Z.Parasitenkd.* 72:153-171.

06. ASHWELL, G. & MORELL, A.G. (1974) The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulation glycoproteins. *Adv.Enzymol.* 41:99-152.
07. ASSOKU, R.K.G. (1975) Immunological studies of mechanism of anaemia in experimental *Trypanosoma evansi* infection in rats. *International J.Parasit.* 5:137-145.
08. ASSOKU, R.K.G.; TIZARD, I.R. & NIELSEN, K.H. (1977) Free Fatty acids, complement activation, and polyclonal B-cell stimulation as factors in the immunopathogenesis of African trypanosomiasis. *Lancet.* 5:956-958.
09. ASSOKU, R.K.G. & TIZARD, I.R. (1978) Mitogenicity of autolysates of *T.congolense*. *Experientia.* 34:127-129.
10. ASSOKU, R.K.G.; HAZLETT, C.A. & TIZARD, I.R. (1979) Immunosuppression in experimental African trypanosomiasis: Polyclonal B-cell activation and mitogenicity of trypanosome-derived saturated fatty acids. *Int.Archs.Allergy appl.Immunol.* 59:298-307.
11. BANKS, K.L. (1979) "in vitro" binding of *T.congolense* to erythrocytes. *J.Protozoology* 26:103-108.
12. BANKS, K.L. (1980) Injury induced by *Trypanosoma congolense* adhesion to cell membranes. *J.Parasit.* 66:34-37.

13. BARTH, R.F. & SINGLA, O. (1974) Alterations in the immunogenicity and antigenicity of mammalian erythrocytes following treatment with neuraminidase. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 145:168-172.
14. BIRD, G.W.G. (1964) Anti-T in peanuts. *Vox Sang.* 9:748-749.
15. BIRD, G.W.G. & WINGHAM, J. (1971) Rapid elucidation of "in vitro" T-polyagglutination. *Scand.J.Haematol.* 8:307-308.
16. BOCCI, V. (1976) The role of Sialic acid in determining the life-span of circulating cells and glycoproteins. *Experientia* 32:135-268.
17. BONGERTZ, V. & HUNGERER, K.D. (1978) *Trypanosoma cruzi*: Isolation and characterization of a protease. *Exp.Parasitol.* 45:8-18.
18. BOYUM, A. (1976) Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand.J.Immunol.* 5(suppl.5):9-15.
19. BRADFIELD, J.W.B.; SOUHAMI, R.L. & ADDISON, I.E. (1974) The mechanism of adjuvant effect of dextran sulphate. *Immunology* 26:283-392.
20. BRENER, Z. (1962) Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *T.cruzi*. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo* 4:389-396.

21. BRENER, Z. (1980) Immunity to *T.cruzi*. *Adv.Parasitol.* 18:247-292.
22. BROWN, E.J.; JOINER, K.A. & FRANK, M.M. (1983) Interaction of desialated guinea pig erythrocytes with classical and alternative pathways of guinea pig complement "in vitro". *J.Clin.Invest.* 71:1710-1719.
23. BUTCHER, E.C.; ROUSE, R.V.; COFFMAN, R.L.; NOTTENBURG, C.N.; HARDY, R.R. & WEISSMAN, I.L. (1982) Surface phenotype of peyer's patch germinal center cells: implications for the role of germinal centers in B-cell differentiation. *J.Immunol.* 129:2698-2707.
24. CARDOSO, J.E. & BRENER, Z. (1980) Hematological changes in mice experimentally infected with *T.cruzi*. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 75:97-104.
25. CLINTON, B.A.; ORTIZ-ORTIZ, L.; GARCIA, W.; MARTINEZ, T. & CAPIN, R. (1975) *Trypanosoma cruzi*: Early immune responses in infected mice. *Exp.Parasitol.* 37:417-425.
26. COHEN, S. (1983) Survival of parasites in the immunocompetent host in "Immunology of parasitic infections" ed. S.Cohen & K.S.Warren (Blackwell Sci.Publ.) 2nd edition, pg:138-156.

27. COLLI, W.; ANDREWS, N.W. & ZINGALES, B. (1981) Surface determinantes in American trypanosomes. in **"International Cell Biology"** ed. H.G.Schweiger (Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg) pg:401-410.
28. COOPER, H.S. (1984) Lectins as probes in histochemistry and immunohistochemistry: the Peanut (*A.hypogaea*) lectin. **Human Pathology** 15:904-906.
29. CORFIELD, A.P. & SCHAUER, R. (1979) Current aspects of glycoconjugate biosynthesis. **Biol.Cell.** 3:213-226.
30. CORSINI, A.C.; CLAYTON, C.; ASKONAS, B.A. & OGILVIE, B.M. (1977) Suppressor cells and loss of B-cell potential in mice infected with *T.brucei*. **Clin.Exp.Immunol.** 29:122-131.
31. CORSINI, A.C. & COSTA, M.G. (1981a) Immunosuppression in mice infected with *T.cruzi*: I-Evidence of polyclonal activation in experimental infections mimicked by an extract prepared from circulating trypomastigotes. **Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo** 23:114-121.
32. CORSINI, A.C. & COSTA, M.G. (1981b) Immunosuppression in mice infected with *T.cruzi*: II-Trypomastigotes crude extract (TCE) suppress the humoral immune response in mice. **Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo** 23:122-126.

33. CORSINI, A.C.; COSTA, M.G.; OLIVEIRA, O.L.P.; CAMARGO, I.J.B. & STELINI Jr., A. (1980a) Susceptibility of inbred mice to *T.cruzi* strain Y. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo* 22:192-196.
34. CORSINI, A.C.; COSTA, M.G.; OLIVEIRA, O.L.P.; CAMARGO, I.J.B. & RANGEL, H.A. (1980b) A fraction (FAd) from *T.cruzi* epimastigotes depresses the immune response in mice. *Immunology* 40:505-511.
35. CORSINI, A.C. BRAZ, R.; CIAMPI, D.B. & ZUCATO, M.R.L. (1982) Resistance to *T.cruzi* infection in relation to the timing of IgG humoral response. *Z.Parasitenkd.* 68:15-25.
36. CUNNINGHAM, D.S.; KUHN, R.E. & ROWLAND, E.C. (1978) Suppression of humoral response during *T.cruzi* infections in mice. *Infect.Immun.* 22:155-159.
37. CUNNINGHAM, D.S.; BENAVIDES, G.R. & KUHN, R.E. (1980) Suppression of mitogen-induced blastogenesis by the *T.cruzi*-induced suppressor substance. *J.Parasit.* 66:722-729.
38. CUNNINGHAM, D.S. & KUHN, R.E. (1980a) *T.cruzi*-induced suppressor substance: I-Cellular involvement and partial characterization. *J.Immunol.* 124:2122-2129.
39. CUNNINGHAM, D.S. & KUHN, R.E. (1980b) *T.cruzi*-induced suppressor substance: II-Regulatory activity. *Immunogenetics* 10:557-571.

40. CUNNIGHAM, D.S. & KUHN, R.E. (1980c) *T.cruzi*-induced suppressor substance: III-Activation of suppressor cells. *J.Parasit.* 66:881-887.
41. CZOP, J.K. FEARON, D.T. & AUSTEN, K.F. (1978) Membrane Sialic acid on target particles modulates their phagocytosis by a trypsin-sensitive mechanism on human monocytes. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA* 75:3831-3835.
42. DAVID, J.R. (1982) Specific acquired immunity to parasites. in "*Immunology of Parasitic Infections*" ed. S.Cohen & K.S.Warren (Blackwell Sci.Publ.) 2nd edition, pp.74-98.
43. DESPONT, J.P.; ABEL, C.A. & GREY, H.M. (1975) Sialic acids and Sialyltransferases in murine lymphoid cells: Indicators of T-cell maturation. *Cell.Immunol.* 17:487-494.
44. DRESSER, D.W. (1978) Balanced salt solutions. in "*Handbook of experimental immunology*". ed. D.M.Weir (Blackwell Sci.Publ.) 2nd edition, pg:28.1.
45. DUROCHER, J.R.; PAYNE, R.C. & CONRAD, M.E. (1975) Role of Sialic acid in erythrocytes survival. *Blood* 45:11-20.
46. ESIEVO, K.A.N.; SAROR, D.I.; ILEMOBADE, A.A. & HALLAWAY, M.H. (1982) Variation in erythrocyte surface and free serum Sialic acid concentrations during experimental *T.vivax* infection in cattle. *Res.Veterinary Sci.* 32:1-5.

47. FACTOR, S.M.; CHO, S.; WITTNER, M. & TANOWITZ, H. (1985) Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' Disease. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 34:246-253.
48. FEARON, D.T. (1978) Regulation by membrane Sialic acid of BIH-dependent decay-dissociation of amplification C3-convertase of the alternative complement pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 75:1971-1975.
49. FRANK, J.S.; LANGER, G.A.; NUDD, L.M. & SERAYDARIAN, K. (1977) The myocardial cell surface, its histochemistry, and effect of Sialic acid and calcium removal on its structure and cellular ionic exchange. *Cir.Res.* 41:702-714.
50. GATTEGNO, L.; BLADIER, D. & CORNILLOT, P. (1974) The role of Sialic acid in the determination of survival of rabbit erythrocytes in the circulation. *Carbohydr.Res.* 34:3361-369.
51. GLOSSMANN, H. & NEVILLE Jr, D.M. (1971) Glycoproteins of cell surface: A comparative study of three different cell surfaces of the rat. *J.Biol.Chem.* 246:6339-66346.
52. GOROG, P.; SCHAUFSTATTER, I. & BORN, G.V.R. (1982) Effect of removing Sialic acid from endothelium on the adherence of circulating platelets in arteries "in vivo". *Proc.R.Soc. Lond.Biol.Sci.* 214:471-480.

53. GREENWOOD, B.M. (1974) Possible role of a B-cell mitogen in hypergammaglobulinemia in malaria and trypanosomiasis. *Lancet* 16:435-436.
54. GROGL, M. & KUHN, R.E. (1985) Identification of antigens of *T.cruzi* which induce antibodies during experimental Chagas' Disease. *J.Parasit.* 71:183-191.
55. GROTHAUS, E.A.; FLYEE, M.W.; YUNIS, E. & AMOS, D.B. (1971) Human lymphocyte antigen reactivity modified by neuraminidase. *Science* 173:542-544.
56. HAYES, M.M. & KIERSZENBAUM, F. (1981) Experimental Chagas'disease: Kinetics of lymphocyte responses and immunological control of the transition from acute to chronic *T.cruzi* infection. *Infect.Immun.* 31:1117-1124.
57. HOOD, L.E.; WEISSMAN, I.L. & WOOD, W.B. (1978) Molecular interactions at cell surface . in "Immunology". ed. by the Benjamin/Cummings Publishing Co.Inc. (Menlo Park, California,USA); pg: -
58. HOOVER, R.L.; BRIGGS, R.T. & KARNOVSKY, M.J. (1978) Adhesive interaction between polymorphonuclear leukocytes and endothelial cells "in vitro". *Cell.* 14:423-438.

59. HSU, S-M. & REE, H.J. (1983) Histochemical studies on lectin binding in reactive lymphoid tissues. *J.Histochem.Cytochem.* **31**:538-546.
60. HUDGIN, R.L.; PRINCE Jr., W.E. & ASHWELL, G. (1974) The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. *J.Biol.Chem.* **249**:5536-5543.
61. IKEDE, B.O.; LULE, M. & TERRY, R.J. (1977) Anaemia in trypanosomiasis: mechanism of erythrocyte destruction in mice infected with *T.congolense* or *T.brucei*. *Acta Tropica* **34**:53-60.
62. ILRAD reports (1984) Anaemia in trypanosomiasis: haemorrhagic *T.vivax* may provide a clue. Publ. of "Internat.Lab.Res. Animal Diseases" (Nairobi, Kenya), October/1984, pg:1-2.
63. JANCIK, J.M.; SHAUER, R.; ANDRES, K.. & von DURING, M. (1978) Sequestration of neuraminidase-treated erythrocytes: studies on its topographic, morphologic and immunologic aspects. *Cell.Tiss.Res.* **186**:209-226.
64. KIERSZENBAUM, F. & HOWARD, J.G. (1976) Mechanisms of resistance against experimental *T.cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi High and Low responder mice. *J.Immunol.* **116**:1208-1211.

65. KIERSZENBAUM, F. & HAYES, M.M. (1980) Evaluation of lymphocyte responsiveness to polyclonal activators during acute and chronic experimental *T.cruzi* infection. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 29:708-710.
66. KIERSZENBAUM, F. (1982) Immunologic deficiency in experimental Chagas' Disease (*T.cruzi* infection): role of adherent, nonspecific esterase-positive splenic cells. *J.Immunol.* 129:2202-2205.
67. KLERX, J.P.A.M.; MOLENDIJK, A.J.; van DIJK, H.; VLOET, K.P. & WILLERS, J.M.N. (1986) Simple sugars with affinity for the macrophage asialo-glycoprotein receptor are adjuvants for the humoral immune response to neuraminidase-treated sheep erythrocytes. *J.Immunol.* 136:73-75.
68. KOBAYAKAWA, T.; LOUIS, J.; IXUI, S. & LAMBERT, P.H. (1979) Autoimmune response to DNA, red blood cells and thymocyte antigens in association with polyclonal antibody synthesis during experimental African trypanosomiasis. *J.Immunol.* 122:296-301.
69. KRAEMER, P.M. (1968) Citotoxic, hemocytic and phospholipase contaminants in commercial neuraminidases. *Biochim.Biophys.Acta* 167:205-208.
70. KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. (1982) Resistance against *T.cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J.Immunol.* 128:2009-2012.

- KRETTLI, A.U. (1982) Antibodies to *T.cruzi* in experimental and human infections. *Afr.J.Clin.Exp.Immunol.* 3:327-35
- LALONDE, R.G.; ALI-KHAN, Z. & TANOWITZ, H.B. (1985) *Trypanosoma cruzi*: regulation of mitogenic responses during infection in genetically resistant and susceptible inbred mouse strains. *Exp. Parasitol.* 59:33-43.
- LIBBY, P. ALROY, J. & PEREIRA, M.E.A.(1986) A neuraminidase from *T.cruzi* removes Sialic acid from surface of mammalian myocardial and endothelial cells. *J.Clin.Invest.* 77:127-135.
- LOTAN, R.; SKUTELSKY, E.; DANON, D. & SHARON, N. (1975) The purification composition and specificity of the anti-T lectin from peanut (*A.hypogaea*). *J.Biol.Chem.* 250:8518-8523.
- LUNDGREN, G. & SIMMONS, R.L. (1971) Effect of neuraminidase on stimulatory capacity of cells in human mixed lymphocyte cultures. *Clin.Exp.Immunol.* 9:915-926.
- LUTHER, P.; KLETT, G.E.; WEBER, S.; PECHMANN, H.& BERGMANN, K. (1983) The lectin neuraminidase assay of antibodies to neuraminidase. *J.Biol.Standart.* 11:115-121.
- MALECKAR, J.R. & KIERSZENBAUM, F. (1983) Inhibition of mitogen-induced proliferation of mouse T and B lymphocytes by bloodstream forms of *T.cruzi*. *J.Immunol.* 130:908-911.

- B. MAHMAUD, A.A.F. (1983) Non-specific acquired resistance to parasitic infections. in "Immunology of Parasitic Infections" ed. S.Cohen & K.S.Warren (Blackwell Sci.Publ.) 2nd edition pg:99-112.
- B. MAMO, E. & HOLMES, P.H. (1975) The erythrokinetics of Zebu cattle chronically infected with *T.congolense*. *Res.Veterinary Sci.* 18:105-106.
- D. MISHELL, B.B.; SHIIGI, S.M.; HENRY, C.; CHAN, E.L.; NORTH, J.; GALLILY, A.H.; SLOMISH, M.; MILLER, K., MARBROOK, J.; PARKS, D. & GOOD, A.H. (1980) Preparation of mouse cell suspensions. in "Selected methods in cellular immunology" -ed. Mishell & Shiigi (W.H. Freeman & Co. - S. Francisco, USA) pg:1-27.
- MURRAY, P.K.; JENNINGS, F.W.; MURRAY, M. & URQUHART, G.M. (1974a) The nature of immunosuppression in *T.brucei* infections in mice: I-The role of macrophage. *Immunology* 27:815-824.
- MURRAY, P.K.; JENNINGS, F.W.; MURRAY, M. & URQUHART, G.M. (1974b) The nature of immunosuppression in *T.brucei* infections in mice: II-The role of the T and B lymphocytes. *Immunology* 27:825-840.
- NOGUEIRA, N.; CHAPLAN, S. & COHN, Z. (1980) *Trypanosoma cruzi*: Factors modifying ingestion and fate of blood form trypomastigotes. *J.Exp.Med.* 152:447-451.

4. NOGUEIRA, N.; CHAPLAN, S.; TYDINGS J.D.; UNKELESS, J. & COHN, Z.
(1981) *Trypanosoma cruzi*: surface antigens of blood and culture forms. *J.Exp.Med.* **153**:629-639.
5. NOGUEIRA, N.; UNKELESS, J. & COHN, Z. (1982) Specific glycoprotein antigens on the surface of insect and mammalian stages of *T.cruzi*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **79**:1259-1263.
6. NOGUEIRA, N. (1983) Host and parasite factors affecting the invasion of mononuclear phagocytes by *T.cruzi*. in "Cytopathology of parasitic disease", Pitman Books, London (Ciba Foundation symposium 99) pg:52-73.
7. NORDLING, S.; ANDERSSON, L.C. & HAYRY, P. (1972) Thymus-dependent and Thymus-independent lymphocyte separation: relation to exposed Sialic acid on cell surface. *Science* **178**:1001-1002.
8. NOVOGRODSKY, A. & KATCHALSKI, E. (1973a) Induction of lymphocyte transformation by sequential treatment with neuraminidase and galactose oxidase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **70**:1824-1827.
9. NOVOGRODSKY, A. & KATCHALSKY, E. (1973b) Transformation of neuraminidase-treated lymphocytes by Soybean Agglutinin. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* **70**:2515-2518.

0. NOVOGRODSKY, A.; LOTAN, R.; RAVID, A. & SHARON, N. (1975) Peanut agglutinin, a new mitogen that binds to galactosyl sites exposed after neuraminidase treatment. *J.Immunol.* 115:1253-1248.
1. NOVOGRODSKY, A.; SUTHANTHIRAN, M. SALTZ, B.; NEWMAN, D. RUBIN, A.L. & STENZEL, K.H. (1980) Generation of lymphocyte growth factor by treatment of human cells with neuraminidase and galactose oxidase. *J.Exp.Med.* 151:755-760.
2. O'DALY, J.A.; SIMONIS, S.; de ROLO, N. & CABALLERO, H. (1984) Suppression of humoral immunity and lymphocyte responsiveness during experimental *T.cruzi* infections. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo* 26:67-77.
3. ORTIZ-ORTIZ, L.; PARKS, D.E.; RODRIGUEZ, M. & WEIGLE, W.O. (1980) Polyclonal B lymphocyte activation during *T.cruzi* infection. *J.Immunol.* 124:121-124.
4. PEREIRA, M.E.A.; KABAT, E.A.; LOTAN, R. & SHARON, N. (1976) Immunochemical studies on the specificity of the peanut (*A.hypogaea*) agglutinin. *Carbohydr.Res.* 51:107-118.
5. PEREIRA, M.E.A.; LOURES, M.A.; VILLALTA, F. & ANDRADE, A.F.B. (1980) Lectin receptors as markers for *T.cruzi*: Developmental stages and a study of the interaction of wheat germ agglutinin with Sialic acid residues on epimastigote cells. *J.Exp.Med.* 152:1375-1392.

6. PEREIRA, M.E.A. (1983a) A developmentally regulated neuraminidase activity in *T.cruzi*. *Science*:1444-1446.
7. PEREIRA, M.E.A. (1983b) A rapid and sensitive assay for neuraminidase using peanut lectin hemagglutination: application to *V.cholera* and *T.cruzi*. *J.Immunological Meth.* 63:25-34.
8. PRATA, A. (1968) Formas clinicas . em "*Doença de Chagas*" ed. J.R. Cansado (Imprensa Oficial do E. de Minas Gerais-Belo Horizonte) pg:234.
9. RADEMAKER, P.M.; van DIJK, H. & WILLERS, M.N.J. (1981) Involvement of membrane-associated Sialic acids in the resistance of sheep erythrocytes to lysis by mouse complement. *Immunol. letters* 3:221-225.
10. RAMOS, C.; LAMOYI, E.; FEOLI, M.; RODRIGUEZ, M.; PEREZ, M. & ORTIZ-ORTIZ, L. (1978) *Trypanosoma cruzi*: Immunossuppressed response to diferent antigens in the infected mouse. *Exp. Parasitol.* 45:190-199.
11. RAMOS, C.; SCHADTLER-SIWON, I. & ORTIZ-ORTIZ, L. (1979) Suppressor cells present in the spleens of *T.cruzi*-infected mice. *J.Immunol.* 122:1243-1247.
12. RANGEL, H.A.; ARAUJO, P.M.F.; REPKA, D. & COSTA, M.G. (1981a) *Trypanosoma cruzi*: Isolation and characterization of a proteinase. *Exp.Parasitol.* 52:199-209.

03. RANGEL, H.A.; ARAÚJO, P.M.F.; CAMARGO, I.J.B.; BONFITTO, M.; REPKA, D.; SAKURADA, J.K. & ATTA A.M. (1981b) Detection of a proteinase common to epimastigote, trypomastigote and amastigote of different strains of *T.cruzi*. *Tropenmed.Parasit.* 32:87-92.
04. RAY, P.K. & SIMMONS, R.L. (1973) Unmasking of xenogeneic neo-antigens on mouse lymphoid cell surfaces by *V.cholerae* neuraminidase. *Proc.Exp.Biol.Med.* 142:217-221.
05. REISNER, Y.; LINKER-ISRAELI, M.; SHARON, N. (1976) Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cell.Immunol.* 25:129-134.
06. REPKA, D.; RANGEL, H.A.; COSTA, M.G.; BELUCCI, S.B. (1979) Immunochemical study of the lysates of the epimastigote forms of *T.cruzi* (Chagas, 1909). *Rev.Brasil.Biol.* 39:721-733.
07. REPKA, D.; CAMARGO, I.J.B.; SANTANA, E.M.; CUNHA, W.M.; SOUZA, D.C.; SAKURADA, J. & RANGEL, H.A. (1980). Surface antigenic determinant of epimastigote forms common to trypomastigote and amastigote forms of different strains of *T.cruzi*. *Tropenmed.Parasit.* 31:239-246
08. REPKA, D.; GAVINO, V.; ATTA, A.M. & RANGEL, H.A. (1982) Protective antibodies in experimental Chagas Disease. in "IX Reunião anual de pesquisa basica" em Doença de Chagas ". Caxambú, MG-Brasil.pg:74.

9. REPKA, D.; RANGEL, H.A.; ATTA, A.M.; CAVINO, W.A. & Piedra Buena (1985) Experimental Chagas' Disease in mice infected with one LD50 of parasites. *Rev. Brasil. Biol.* **45**:309-316.
10. RIBEIRO dos SANTOS, R. & HUDSON, L. (1980) *Trypanosoma cruzi*: Immunological consequences of parasite modification of host cells. *Clin. Exp. Immunol.* **40**:836-841.
11. ROSEN, S.D.; SINGER, M.S.; YEDNOCK, T.A. & STOOLMAN, L.M. (1985) Involvement of Sialic acid on endothelial cells in organ-specific lymphocyte recirculation. *Science* **228**:1005-1007.
12. ROSENBERG, S.A.; PLOCINIK, B.A. & ROGENTINE, G.N. (1972) Unmasking of human lymphoid cell heteroantigens by neuraminidase treatment. *J. Nat. Cancer Inst.* **48**:1271-1276.
13. ROSSI, M.A.; GONÇALVES, S. & RIBEIRO dos SANTOS, R. (1984) Experimental *T. cruzi* cardiomyopathy in Balb/C mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. *Am. J. Pathol.* **114**:209-216.
14. SAMLOWSKI, W.E.; SPANGRUD, G.J. & DAYNES, R.A. (1984) Studies on the liver sequestration of lymphocytes bearing membrane-associated galactose-terminal glycoconjugates: reversal with agents that effectively compete for the asialoglycoprotein receptor. *Cell. Immunol.* **88**:309-322.

15. SALGADO, A.A. & PELLEGRINO, J. (1968) Distribuição Geografica. em "Doença de Chagas" ed. J.R. Cansado (Imprensa Oficial do E. de Minas Gerais-Belo Horizonte) pg: 128.
16. SCHACTERLE, G.R. & POLLACK, R.L. (1973) A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Analyt. Biochem.* 51:654-655.
17. SCOTT, M.T. & SNARY, D. (1983) American trypanosomiasis (Chagas' Disease) in "Immunology of Parasitic Infection" ed. S. Cohen & K.S. Warren (Blackwell Sci. Publ.) 2nd edition, pp:262-287.
18. SINGER, S.J. (1974) Molecular biology of cellular membranes with applications to immunology. *Adv. Immunol.* 19:1-66.
19. SHARON, N. (1983) Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Adv. Immunol.* 34:213-298.
20. SHARON, N. (1984) Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis. *Immunol. Today* 5: 143-158.
21. SPIRO, R.G. (1963a) Glycoproteins: structure, metabolism and biology. *New England J. Med.* 12:566-572.
22. SPIRO, R.G. (1963b) Glycoproteins: structure, metabolism and biology (Concluded) *New England J. Med.* 19:616-621.

23. TANOWITZ, R.L.; MINATO, N.; LALONDE, R. & WITTNER, M. (1981) *Trypanosoma cruzi*: Correlation of resistance and susceptibility in infected inbred mice with the "in vivo" primary antibody response to sheep red blood cells. *Exp.Parasitol.* 52:233-242.
24. TARLETON, R.L. & KUHN, R.E. (1984) Loss of suppressor activity in the serum of mice infected with *T.cruzi*. *J.Parasit.* 70:253-260
25. TEIXEIRA, A.R.L.; TEIXEIRA, G.; MACEDO, V. & PRATA, A. (1970) Acquired cell mediated immunodepression in acute Chagas' Disease. *J.Clin.Invest.* 62:1132-1141.
27. TITTO, E.; BRAUN, M. & SECURA, E.L. (1982) Density gradient purification of human lymphocytes from contaminating trypomastigotes of *T.cruzi*. *J.Immunological Methods* 50:281-287.
28. TIZARD, I.R. & HOLMES, W.L. (1976) The generation of toxic activity from *T.congolense*. *Experientia* 32:1533-1534.
29. TIZARD, I.R.; HOLMES, W.L.; YORK, D.A. & MELLORS, A. (1977) The generation and identification of the hemolysin *T.congolense*. *Experientia* 33:901-902.
30. TOPOROWICZ, A. & REISNER, y. (1986) Changes in sialyltransferase activity during murine T cell differentiation. *Cell.Immunol.* 100:10-19.

31. TRISCHMANN, T.M. (1983) Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' Disease. *J.Immunol.* 130:1953-1957.
32. VICKERMAN, C. & BARRY, J. (1983) African trypanosomiasis. in "Immunology of Parasitic Infections" ed. S.Cohen & K.S.Warren (Blackwell Sci.Publ.) 2nd edition, pg:290-314.
33. WARREN, L. (1959) The thiobarbituric acid assay of Sialic acids. *J.Biol.Chem.* 234:1971-1975.
34. WOODRUFF, J.J. (1973) Mechanisms involved in anaemia associated with infection and splenomegaly in the tropics. *Trans.Royal Soc.Trop.Med.Hyg.* 67:313-325.
35. WOODRUFF, J.J. & GESNER, B.M. (1968) The effect of neuraminidase on the fate of transfused lymphocytes. *J.Exp.Med.* 129:551-567.
36. WOODS, W.T.; IMAMURA, K. & JAMES, T.N. (1982) Electrophysiological and electron microscopic correlations concerning the effects of neuraminidase on canine heart cells. *Circ.Res.* 50:228-239.

37. ZINGALES, B.; ANDREWS, N.W.; KUWAJIMA, .Y. & COLLI, W. (1982)

Cell surface antigens of *T.cruzi*: Possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. **Mol.**

Biochem.Parasitol. 6:111-124.

38. ZINGALES, B. & Colli, W. (1985) *Trypanosoma cruzi*: Interaction

with host cells. **Curr.Top.Microbiol.Immunol.** 117:129-151.

40. ZUCKERMAN; A. (1964) Autoimmunity and other types of indirect

damage to host cells factors in certain protozoan diseases.

Exp.Parasitol. 15:138-183.