MARIA JÚLIA MANSO ALVES

ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS DE
Trypanosoma cruzi (epimastigota)

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

a meus pais

Agradecimentos

Ao Dr. W. Colli pelo apoio, incentivo e confiança. Pelas facilidades proporcionadas para o amadurecimento dessa tese. Pela camaradagem estabelecida.

Ao Dr. Erney P. Camargo pela sugestão inicial do tema e pela boa vontade constantemente demonstrada.

À Dra. Lélia Mennucci e ao Dr. J.C.C. Maia pela iniciação científica.

Ao Dr. J.F. Fernandes e à equipe de seu laboratório pela introdução ao estudo dos tripanossomos.

À Muna C. Andery pela excelente assistência técnica. À D. Carmem M. Pinto pelo auxílio constante.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica que em diferentes oportunidades ofereceram sugestões valiosas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq-FINEP) pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

	PÁG.
RESUMO	1
INTRODUÇÃO	3
Superfície celular de tripanossomos	7
Concanavalina A (con A)	10
Glicoproteínas	14
MATERIAL E MÉTODOS	19
A. Células	19
Obtenção de formas epimastigotas	19
Obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas	20
Obtenção de formas tripomastigotas sanguícolas	20
Determinação do número de células	21
Meios de cultura	21
(a) Meio LIT	21
(b) Meio HIL	22
B. Experimentos com concanavalina A (con A)	23
Aglutinação de células por con A	23
Inibição da aglutinação	24
Incubação das células com tripsina	25
C. Isolamento e caracterização parcial do complexo glicoproteico	25
Cromatografia em papel dos açúcares	25
Determinação quantitativa dos açúcares por densitometria	27
Análise de aminoácidos	29
Extração do complexo glicoproteico	30
Cromatografia em coluna de DEAE-celulose	31
Filtração em gel	32
Eletroforese em gel de poliacrilamida	32
(a) Eletroforese na ausência de SDS	33
(b) Eletroforese na presença de SDS	34
(c) Densitometria do gel de poliacrilamida	34
Determinação de peso molecular	35
Dosagens	35

	PÁG.
D. Reagentes	36
RESULTADOS	39
A. Efeito de con A sobre <u>T. cruzi</u>	39
Efeito de con A sobre formas epimastigotas	39
Efeito de con A sobre formas tripomastigotas metacíclicas	41
Efeito de con A sobre formas tripomastigotas sanguícolas	42
B. Isolamento e caracterização parcial de um complexo glicoproteico extraído de formas epimastigotas de <u>T. cruzi</u>	43
Isolamento e purificação parcial	43
(a) Isolamento	43
(b) Purificação parcial por cromatografia	43
Experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida	46
(a) Eletroforese na ausência de SDS	47
(b) Eletroforese na presença de SDS	47
(c) Tratamento da fração aquosa com pronase	50
Cromatografia da fração aquosa em coluna de Bio-Gel P-150 em presença de SDS	51
Determinação do peso molecular	52
Composição do complexo glicoproteico	55
(a) Caracterização dos monossacarídeos	55
(b) Caracterização dos aminoácidos	58
Efeito do complexo glicoproteico na aglutinação das células por con A	58
DISCUSSÃO	136
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146

RESUMO

Formas epimastigotas de T. cruzi são aglutinadas especificamente por baixas concentrações de concanavalina A. A aglutinação é linear com o tempo até aproximadamente 10 minutos, para um número de células maior que 1×10^8 células/ml. Nessas condições a aglutinação é dependente da concentração de con A. As formas tripomastigotas sanguícolas e metacíclicas não são aglutináveis por con A.

O complexo glicoproteico isolado de formas epimastigotas de T. cruzi por tratamento fenólico do extrato celular, apresenta na sua composição ácido siálico, glicosamina, galactose, glicose e manose, além de xilose em algumas frações. Os aminoácidos constituintes são principalmente lisina, ácido aspártico (e/ou asparagina), alanina, treonina, ácido glutâmico (e/ou glutamina), serina, prolina e glicina. Esse complexo pode ser separado em três componentes em colunas de DEAE-celulose. Dois desses componentes, selecionados para estudo, inibem a reação de aglutinação por con A das formas epimastigotas, assim como a fração não cromatografada. Essas frações isoladas fornecem quatro componentes glicoproteicos por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.

INTRODUÇÃO

Trypanosoma cruzi (CHAGAS, 1909), um flagelado parasita digenético, apresenta durante o seu ciclo evolutivo diferentes formas, cujo aparecimento obedece a uma determinada sequência, correspondente a um ambiente específico no hospedeiro.

No hospedeiro vertebrado, a multiplicação dos tripanossomos se dá por divisão binária das formas amastigotas (intracelulares). Ainda intracelularmente, há a formação de tripomastigotas sanguícolas, que alcançando a corrente circulatória, invadem outras células, com o aparecimento de novas formas amastigotas. As formas sanguícolas, passando para o trato digestivo de um invertebrado (triatomídeo) originam as formas epimastigotas, que também se multiplicam por divisão binária. Na região posterior do trato digestivo, há o aparecimento de formas tripomastigotas metacíclicas, incapazes de divisão, que através das fezes do triatomídeo, deixadas sobre o vertebrado, infestam esse hospedeiro, transformando-se dentro da célula novamente em amastigotas, reiniciando o ciclo. No entanto, esse ciclo ainda não está totalmente esclarecido, não sendo tão simples quanto o exposto. Por exemplo, entre a diferenciação das formas amastigotas para tripomastigotas sanguícolas, talvez ocorram formas epimastigotas intermediárias (in HOARE, 1972). Deve-se ressaltar ainda a variação morfológica existente nas formas tripomastigotas sanguícolas, provavelmente associa-

das com diferenças fisiológicas (BRENER, 1973). Também no hospedeiro invertebrado, segundo BRACK (1968), as formas tripomastigotas sanguíneas dariam origem a esferomastigotas, que se dividiriam, dando origem a tripomastigotas metacíclicas e epimastigotas. Uma outra sugestão, igualmente possível é que as formas tripomastigotas sejam provenientes diretamente das epimastigotas, com a migração gradual do cinetoplasto, como sugerido por CAMARGO (1964). Uma discussão detalhada da biologia e do ciclo evolutivo do T. cruzi pode ser encontrada nos artigos de BRENER (1973), HOARE (1972), COSGROVE (1971), DEANE (1969) e DEANE (1968) e SILVA & CAMARGO (1968).

A possibilidade de reproduzir o ciclo do T. cruzi no laboratório, torna-o, juntamente com outras espécies de tripanossomos um sistema interessante para utilização em estudos de diferenciação celular. Foram relatados alguns sistemas que permitem a interconversão de diferentes formas celulares desse protozoário (in NEWTON, CROSS & BAKER, 1973). Entretanto, de todas as transformações descritas a diferenciação em cultura de formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas é ainda o sistema mais fácil de ser controlado. Algumas vantagens desse sistema seriam a fácil distinção morfológica entre as duas formas acima referidas, a possibilidade de separá-las fisicamente e o fato de que essa transformação ocorre em meio líquido e isento de outras células. No entanto, há uma série de dificuldades amplamente conhecidas e discutidas, mas de difícil solução. As mais evidentes podem ser resumidas em:

a) complexidade dos meios de cultura utilizados, dificultando o estudo de fatores externos envolvidos na morfogênese das células. O meio simplificado de YOSHIDA (1974) parece oferecer resultados promissores nesse aspecto;

b) restrições na obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas, que atingem, na maioria das vezes, uma porcentagem máxima de 30%, dificilmente obtendo-se porcentagens mais elevadas dessas formas na cultura. Para agravar ainda mais esse problema, a separação dos tripomastigotas das formas epimastigotas existentes na cultura, apresenta um rendimento bastante baixo, em torno de 30% (GOLDBERG, 1974) para a separação em colunas de troca iônica (AL-ABBASSY, SEED & KREIER, 1972);

c) ausência de sinais conhecidos para a diferenciação. Como foi ressaltado, esse item se relaciona intimamente com o primeiro. Embora sejam conhecidos alguns sinais externos para algumas etapas de transformação morfogenética em alguns tripanossomos, como temperatura para T. conorhini (DEANE & KIRCHNER, 1963) e T. theileri (RISTIC & TRAGER, 1958), composição de aminoácidos do meio de cultura em L. donovani (SIMPSON, 1968) e de uréia para T. mega (STEINERT, 1958), muito pouco ainda se conhece a esse respeito. No caso de T. mega, cuja cepa foi isolada em 1956, parece não haver mais resposta adequada do protozoário ao tratamento com uréia (in NEWTON, CROSS & BAKER, 1973). Essa variabilidade de resposta obtida com culturas estabelecidas sugere que, além das respostas específicas do protozoário aos fatores externos, há a influência de outros, internos, que somados, podem induzir

a obtenção de resultados conflitantes. No caso de T. cruzi também foi descrita a influência da temperatura em formas de cultura de tecido (NEVA, MALONE & MYERS, 1961; TREJOS et al, 1963); a influência do pH na diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (CASTELLANI, RIBEIRO & FERNANDES, 1967) e de restrição de fatores nutricionais (CAMARGO, 1964).

O trabalho contido nessa tese faz parte de um projeto mais amplo, que se caracteriza pelo estudo da superfície celular de diferentes formas de T. cruzi e seu possível relacionamento com a diferenciação celular, uma vez que a superfície celular, estando em contato direto com o ambiente, pode ter papel importante na diferenciação, bem como nas relações hospedeiro-parasita. Nessa primeira etapa procurou-se caracterizar diferenças no conteúdo de carboidratos na superfície celular de algumas formas de T. cruzi (epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas e tripomastigotas sanguícolas) pela ação de concanavalina A (que interage com determinados monossacarídeos), além de se isolar e caracterizar parcialmente um complexo glicoproteico extraído de formas epimastigotas. Essas formas podem ser obtidas facilmente e na ausência de qualquer outra forma do protozoário. A correlação entre a interação das células com concanavalina A e o complexo glicoproteico foi sugerida por evidências circunstanciais.

Com o intuito de localizar os temas abordados nesse trabalho num contexto mais geral, essa introdução será

subdividida em tópicos (superfície celular de tripanossomos, concanavalina A e glicoproteínas).

Superfície celular de tripanossomos

Muito pouco se sabe sobre a superfície celular dos tripanossomos, com exceção dos chamados tripanossomos africanos, o mesmo acontecendo com as glicoproteínas, uma das macromoléculas constituintes de membranas celulares. Nesses tripanossomos as glicoproteínas foram relacionadas com antigenicidade e interação hospedeiro-parasita.

A variação antigênica das formas tripomastigotas sanguícolas, no decorrer de seu ciclo no hospedeiro vertebrado, descrita para alguns tripanossomos, é bastante conhecida para T. brucei (MILLER, 1965; GRAY, 1965). Em T. brucei essa variação foi bem caracterizada por diferenças imunológicas apresentadas por populações de formas tripomastigotas sanguícolas isoladas em diferentes fases de uma infecção crônica. É interessante notar que essas formas, após reinfestação do hospedeiro invertebrado, dão origem a formas tripomastigotas metacíclicas que possuem sempre o mesmo antígeno básico. Essa mesma sequência de variações ocorre - ria de maneira semelhante em novas infecções (GRAY, 1965), sugerindo um sistema de controle no aparecimento dos antígenos de superfície. Através de experimentos com ferritina conjugada (VICKERMAN & LUCKINS, 1969), esses antígenos variáveis foram relacionados com a existência de uma película observada ao microscópio eletrônico ("surface coat") para

os tripanossomos africanos (T. brucei, T. vivax, T. congolense). Essa camada, existente nas formas tripomastigotas sanguíneas, está ausente nas formas correspondentes ao ciclo do inseto, com exceção das formas tripomastigotas metacíclicas, onde reaparece, numa pré-adaptação ao hospedeiro vertebrado (VICKERMAN, 1969). Esses antígenos parecem pertencer ao grupo de antígenos previamente descritos (WEITZ, 1960; ALLSOPP, NJOGU & HUMPHRIES; 1971). A análise citoquímica dessa película evidenciou a existência de glicoproteínas na sua composição (WRIGHT & HALES, 1970), confirmada pelo seu isolamento (CROSS, 1972). Essas glicoproteínas, com pequenas diferenças de mobilidade eletroforética, composição de açúcares e aminoácidos foram relacionadas com o fenômeno de variação antigênica observada. Um material antigênico, pertencente à superfície celular, constituído de glicoproteínas heterogêneas, contendo manose e galactose também foi descrito (NJOGU & HUMPHRIES, 1972). Aparentemente esse material é constituído de duas glicoproteínas, formadas de duas subunidades separáveis por eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS (NJOGU et al, 1974). Sabe-se ainda da não existência de ácido siálico, grupos carboxila ou sulfatados ácidos (WRIGHT & HALES, 1970) nesses tripanossomos.

Apesar do conhecimento acumulado sobre essa superfície celular, há uma série de questões ainda não respondidas no momento, principalmente em relação ao controle do aparecimento desses antígenos. A possibilidade mais remota de que essa película não seja sintetizada pelo protozoário, refletindo uma adsorção de material do meio ambiente à

superfície do tripanossomo não foi afastada. A maioria dos autores admite que essa película seja de formação endógena, chegando-se a sugerir a contribuição do complexo de Golgi na sua formação (STEIGER, 1971).

A superfície celular do T. cruzi e sua composição glicoproteica é bem menos explorada que no caso dos tripanossomos africanos, relatada anteriormente.

A película celular, descrita para algumas formas dos tripanossomos africanos, não foi detectada em T. cruzi, mas tão somente uma franja rala (MILDER, 1971), como a descrita para T. lewisi por VICKERMAN (1969). Isso no entanto nada deve significar com relação à variação antigênica ou à existência de glicoproteínas na superfície celular ou mesmo quanto à capacidade do T. cruzi resistir às defesas imunitárias do hospedeiro, como sugerido por VICKERMAN. Talvez não se possa afastar também a hipótese dessa película ter sido retirada no processo de preparação do protozoário para a microscopia eletrônica.

A maioria das macromoléculas contendo açúcar descritas em T. cruzi estão relacionadas com propriedades imunológicas, não tendo sido dada grande importância à sua caracterização química. Assim foi descrito um polissacarídeo complexo com propriedades imunológicas por MUNIZ & FREITAS (1944), um polissacarídeo caracterizado pela presença de galactose por von BRAND et al (1959), uma fração polissacarídica antigênica por FIFE & KENT (1960), e um exoantígeno composto de carboidrato e proteína (na proporção

de 1:2 a 1:2,5) por TARRANT, FIFE & ANDERSON (1965). Mais recentemente foi descrito um material contendo açúcar, aparentemente de reserva, por CÁCERES (1973). Uma exceção nesse contexto é o trabalho descrito por GONÇALVES & YAMAHA (1969) onde se descreve um complexo carboidrato-proteína, imunologicamente ativo, composto por glicose, glicosamina, xilose, manose e galactose (na proporção molar 1:2:4:5:9), além de 11 aminoácidos. A localização desse componente e a pureza das formas epimastigotas empregadas não foram mencionadas pelos autores.

Também se verificou a existência de um polímero de manose em extratos celulares de C. fasciculata (GOTTLIEB, LANZETTA, BERECH, 1972), e de manose (23,5%), glicose (43,5%), galactose (24,5%) e xilose (6%) em membranas isoladas de Leptosomas collosoma (HUNT & ELLAR, 1974).

Concanavalina A (con A)

As lectinas têm sido grandemente utilizadas para evidenciar diferenças na composição química das membranas celulares (BURGER, 1973; LIS & SHARON, 1973; SHARON & LIS, 1972). Entre as lectinas, uma das mais empregadas tem sido a con A isolada de Canavalia ensiformes. Essa proteína se combina especificamente com α -D-glucopiranosídeo (ou seu derivado 2-acetamido), α -D-manopiranosídeo, β -D-frutofuranosídeo ou α -D-arabinofuranosídeo e estruturas estericamente relacionadas, além de se complexar com uma série de substâncias que contenham esses açúcares (GOLDSTEIN,

HOLLERMAN & MERRICK, 1965; GOLDSTEIN, HOLLERMAN & SMITH, 1965; GOLDSTEIN & YER, 1966; SO & GOLDSTEIN, 1968; PORETZ & GOLDSTEIN, 1970). A molécula de concanavalina A é formada por quatro protômeros (acima de pH 5,6), sendo que cada protômero se liga a Mn^{2+} e Ca^{2+} antes da ligação com um resíduo de açúcar (YARIV, KALB & LEVITZKI, 1968). Os locais de ligação na molécula da lectina já estão estabelecidos na sua estrutura tridimensional (EDELMAN et al, 1972).

A ligação das lectinas com moléculas contendo açúcar tem sido empregada, entre outros, para estudos de interação entre carboidratos e proteínas, isolamento e purificação de polissacarídeos e glicoproteínas, estudos de composição de superfície celular e de mitogênese (SHARON & LIS, 1972). Mas o maior interesse, e portanto uma maior concentração de trabalhos empregando con A e outras lectinas (principalmente aglutinina de germe de trigo, WGA), surgiu a partir da verificação de uma aglutinação preferencial de células transformadas em relação a linhagens de células normais. As células normais são pouco aglutináveis por lectinas, comportando-se, em relação à aglutinação, como células transformadas após breve tratamento com tripsina (INBAR & SACHS, 1969 a; INBAR & SACHS, 1969 b; BURGER, 1969; BURGER & NOONAN, 1970; ECKHART, DULBECCO & BURGER, 1971).

Há no entanto células que são normalmente aglutinadas por con A, como células embrionárias (MOSCONA, 1971; KLEINSCHUSTER & MOSCONA, 1972; OPPENHEIMER & ODENCRANTZ,

1972; WEISER, 1972), espermatozoides (EDELMAN & MILLETTE, 1971) e eritrócitos (SUMNER & HOWELL, 1936).

A maioria dos trabalhos realizados inicialmente foram feitos com células de mamíferos, sabendo-se muito pouco, comparativamente, da ação das lectinas em outras células eucarióticas. Surgiram alguns trabalhos com fungos (TKACZ, CYBULKA & LAMPEN, 1971; TKACZ & LAMPEN, 1972; WEEKS, 1973) e com Entamoeba hystolitica, mostrando uma aglutinação seletiva entre linhagens patogênicas e não patogênicas desse protozoário (MARTINEZ-PALOMO, GONZALEZ-ROBLES & de la TORRE, 1973). Recentemente (DWYER, 1974) mostrou a aglutinação de formas promastigotas de Leishmania donovani com con A e fitohemaglutinina A.

Embora a aglutinação das células seja um fato bem estabelecido, o mesmo não acontece quanto ao mecanismo de como se dá essa aglutinação. A primeira teoria admitia que os sítios receptores das lectinas nas células normais estavam em criptas, sendo expostos após o tratamento com proteases (BURGER, 1969). A partir dessa primeira hipótese surgiram uma série de outras, como a ligação quantitativa diferencial, abandonada após a demonstração de que o número de moléculas de lectinas ligadas às células normais é aproximadamente o mesmo que nas transformadas (CLINE & LIVINGSTON, 1971; OZANNE & SAMBROOK, 1971; INBAR, BEN-BASSAT & SACHS, 1971). No entanto parece haver um número de receptores por unidade de área diferente nas células normais e transformadas, uma vez que a superfície das células transformadas é

menor (NOONAN et al, 1973). Foi sugerida também a existência de sítios receptores responsáveis pela ligação com con A, que seriam diferentes dos sítios responsáveis pela aglutinação (INBAR, BEN-BASSAT & SACHS, 1971), alterados nas células transformadas. Na mesma época foi proposto que a diferença na aglutinação seria devida a uma condensação dos sítios receptores de con A num local da célula, possibilitando a existência de múltiplas pontes de lectina com a célula vizinha (NICOLSON, 1971; NICOLSON, 1972). Essa localização topográfica, possibilitada pela fluidez da membrana celular, não ocorreria nas células normais. No entanto essa relação topográfica-aglutinação não foi verificada por alguns autores, sendo dependente da concentração da lectina empregada (EDELMAN, 1974). De acordo com NICOLSON (1974), há uma série de fatores influenciando a aglutinação de células (como número de moléculas de lectina, mobilidade no interior da membrana, natureza das moléculas, carga, etc.). Seda que a distribuição topográfica teria importância secundária. A aglutinação ocorreria quando as forças de repulsão entre as células são sobrepujadas pelas de atração. Recentemente foi sugerida a participação direta da enzima galactosil-transferase na aglutinação de células (PODOLSKY et al, 1974). As células não aglutináveis teriam uma enzima galactosil-transferase diferente das aglutináveis (diferentes nas suas características de pH ótimo, requisição de metais, substrato aceptor, etc.).

A natureza química dos receptores celulares da lectina foi bastante explorada, tendo sido relacionada com moléculas de glicoproteína existentes na superfície

celular (ALLAN, AUGER & CRUMPTON, 1972; JANSONS & BURGER, 1973; KUBÁNEK, ENTLICHER & KOCOUREK, 1973) embora também os glicolipídios possam estar implicados na aglutinação (HAKOMORI & MURAKAMI, 1968).

As lectinas passaram a se constituir em importantes instrumentos de análise de superfície celular. Entretanto, uma série de correlações que foram feitas entre a interpretação dos resultados provenientes de sua utilização e fenômenos ligados ao crescimento de células de mamíferos em cultura parece não ter maior significado biológico (cf. HOLLEY, 1974; ARMELIN, 1974).

Glicoproteínas

Glicoproteínas são, no sentido mais geral, biopolímeros contendo resíduos de aminoácidos e monossacarídeos, ligados covalentemente. As glicoproteínas têm distribuição ampla na natureza, tendo sido encontradas em todas as formas de vida, exercendo um número variado de funções: enzimática, de reserva, estrutural, de transporte, de lubrificação, entre outras. As glicoproteínas de invertebrados foram objeto de revisão recente (HUNT, 1970).

A porção de carboidratos varia bastante entre as glicoproteínas, podendo-se encontrar moléculas com menos de 1% a mais de 80% de carboidratos em peso de glicoproteína. Nessa porcentagem encontram-se de 2 a 7 tipos de monossacarídeos, incluindo D-galactose, D-manose, L-fucose, N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido

siânico, D-glicose, D-xilose, e L-arabinose, além dos ácidos urônicos, constituintes dos chamados mucopolissacarídeos. A porção proteica apresenta uma predominância de aminoácidos alifáticos e poucos aminoácidos aromáticos, básicos ou contendo enxofre. À medida que a proporção de carboidratos na molécula diminui, a composição de aminoácidos se aproxima da composição usual das proteínas.

A ligação entre o carboidrato e a porção proteica ocorre segundo alguns padrões, envolvendo o carbono 1 do açúcar com um grupo lateral da cadeia peptídica. Foram descritas como ligações mais frequentes: as N-glicosídicas (entre N-acetil-D-glicosamina e o grupo amida da asparagina) e as O-glicosídicas (envolvendo N-acetil-D-galactosamina e serina ou treonina; galactose e serina ou treonina; xilose e serina; galactose e hidroxilisina; arabinose e hidroxiprolina). O número de ligações covalentes entre carboidratos e proteínas varia bastante entre as glicoproteínas, sendo encontrados de um a vários grupos de carboidratos, que podem ser iguais ou diferentes, ramificados ou não. É interessante observar que no caso do maior componente glicoproteico isolado de eritrócitos humanos, os vários grupos de carboidratos se localizam a partir da metade N-terminal da cadeia polipeptídica. Essa cadeia contém também uma região hidrofóbica, distante do aminoácido carboxi-terminal (MARCHESI et al, 1973).

Outro aspecto que deve ser ressaltado nas glicoproteínas, diz respeito à chamada microheterogeneidade das moléculas. É comum encontrar nas glicoproteínas, unidades de

carbohidrato ligeiramente modificadas, aparentemente em diferentes estágios de acabamento ou de degradação. Essa microheterogeneidade pode levar a resultados bastante dessemelhantes, como no caso da ovalbumina, composta de um só grupo de carbohidratos (manose e N-acetil-D-glicosamina) por unidade proteica. A relação entre os dois monossacarídeos componentes, manose e hexosamina, varia de 6:5 a 5:2 (CUNNINGHAM in SPIRO, 1970). Além dessa heterogeneidade traduzida em quantidade de monossacarídeos presentes, foi descrita também uma heterogeneidade na ligação dos açúcares. Na glicoproteína ácida α_1 , isolada de soro, composta de 6 a 7 grupos de carbohidrato na molécula, demonstrou-se a ligação de ácido siálico no carbono 3, 4 ou 6 da galactose (JEANLOZ, 1966).

Esses aspectos têm sido objeto de inúmeras revisões, onde foram tratados com detalhes (HEATH, 1971; SPIRO, 1970; MONTGOMERY, 1970; GOTTSCHALK, 1972).

Um dos aspectos interessantes e ainda não resolvido das glicoproteínas é o que leva uma proteína a ser glicosilada. Embora tenham sido levantadas hipóteses, como a diferença de localização (as proteínas excretadas na célula seriam glicosiladas) ou diferenças de local de síntese (as glicosiladas seriam sintetizadas nos ribossomos ligados à membrana) surgiram sempre evidências em contrário. Atualmente está se dando grande importância à sequência dos aminoácidos em torno da ligação entre o carbohidrato e a proteína. No caso mais estudado, da ligação de N-acetil-D-glicosa

mina com a asparagina, X-Asn-Y-Thr/Ser, onde X e Y, aminoácidos predominantemente de cadeia lateral curta, têm papel relevante na glicosilação da proteína. Também nesse caso já se encontraram proteínas não glicosiladas com uma sequência em que se poderia esperar glicosilação. Esse aspecto das glicoproteínas está bem discutido em WINTERBURN & PHELPS (1972) e em HUGHES (1973).

As glicoproteínas são constituintes de membranas desde vírus e bactérias até células de mamíferos. São encontradas não só na membrana plasmática, como também nas membranas intracelulares. A maior parte dos trabalhos relativos às membranas intracelulares foram feitos com células em cultura ou in vivo, por incorporação de açúcares radioativos ou pela análise química das membranas isoladas. Atualmente também têm sido empregadas lectinas para a detecção de material açúcar-positivo nessas membranas. Qualitativamente, os monossacarídeos encontrados são os mesmos discriminados anteriormente: hexosaminas, glicose, galactose, manose, fucose e ácido siálico. Foram descritas glicoproteínas no retículo endoplasmático (WINQVIST, ERIKSSON & DALLNER, 1974; MIYAJIMA et al, 1969; LI, LI & SHETLAR, 1968; AUTUORI, SVENSSON & DALLNER, 1974), na mitocôndria, tanto na membrana interna como na externa (BOSMANN & MARTIN, 1969; de BERNARD et al, 1971; SOTTOCASA et al, 1971; MORELIS & LOUISOT, 1973) e no núcleo (KASHING & KASPER, 1969; NICOLSON, LACORBIÈRE & DELMONTE, 1972; KEENAN, FRANKE & KARTENBECK, 1974).

O grande número de trabalhos recentes sobre glicoproteínas relacionam-se com o fato dessas moléculas

estarem envolvidas com uma série de importantes processos mediados pela membrana celular, como ligação específica de hormônios (HOLLENBERG & CUATRECASAS, 1974), de vírus (CARRAWAY et al, 1974; HUGHES, 1973), agregação celular (MOSCONA, 1973; ROSEN et al, 1973), transporte de cálcio (LEJOHN & STEVENSON, 1973; LEJOHN & CAMERON, 1973) e envelhecimento celular (BALDUINI, BALDUINI & ASCARI, 1974; WOODRUF, BERTRAM & GESNER, 1969; CURTOIS & HUGHES, 1974).

MATERIAL E MÉTODOS

A. Células

As células utilizadas neste trabalho são formas de Trypanosoma cruzi, cepa Y, isolada por SILVA & NUSSENZWEIG (1953). Para a obtenção de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, as células são cultivadas em meio líquido, contendo penicilina ou ampicilina (50 µg/ml).

Obtenção de formas epimastigotas

As células são cultivadas em meio LIT, idealizado por YAGGER (in CAMARGO, 1964 e FERNANDES & CASTELLANI, 1966).

De acordo com as necessidades experimentais, as células são cultivadas desde volumes de 1-2 ml por tubo de ensaio (1,3 x 16 cm) até 400 ml por frasco de erlenmeyer de 2 litros. A cultura é mantida a 28°C, em incubador com agitação contínua a 120 rpm. As células são cultivadas até a fase exponencial tardia, quando atingem uma densidade de 80-120 x 10⁶ células/ml (39-49 dia), a partir de um inóculo inicial de 20 x 10⁶ células/ml (Figura 1), a não ser quando especificado. O inóculo sempre é proveniente de culturas no mesmo estágio. Nas condições de crescimento descritas são se encontram, por observação ao microscópio óptico, formas epimastigotas.

Quando as células atingem a densidade desejada, são centrifugadas a baixa rotação (1500 xg) e lavadas três vezes com solução de NaCl 0,9%. Dependendo do experimento a ser realizado, as células são suspensas em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,2 em NaCl 0,9% (para os experimentos com con A) ou imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C (para a extração do material glicoproteico).

Obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas

Essas formas são obtidas pelo inóculo de formas epimastigotas (15×10^8 células/ml), previamente lavadas, em meio HIL, pH 6,7, nas condições descritas por CASTELLANI, RIBEIRO & FERNANDES (1967), com incubação prévia das células a 21°C por 48 horas, sem agitação. A seguir são mantidas a 28°C, nas mesmas condições descritas para as formas epimastigotas. O aparecimento das formas tripomastigotas metacíclicas é acompanhado ao microscópio óptico (o que ocorre, em geral, a partir do 29-39 dia de incubação a 28°C). O inóculo de formas epimastigotas em meio HIL, pH 7,2, que não permite a diferenciação de uma forma para outra, segundo os mesmos autores, é utilizado como controle.

Obtenção de formas tripomastigotas sanguíneas

Essas formas são obtidas de camundongos com alta parasitemia provocada por infecção com a cepa Y. Essa

cepa tem sido mantida em camundongos desde o seu isolamento.* O sangue dos camundongos infectados é centrifugado a baixa rotação à temperatura ambiente e deixado em repouso por 30 minutos. A seguir o sobrenadante contendo as formas sanguíneas é retirado, centrifugado e lavado três vezes com uma solução de NaCl 0,9% e finalmente as células são suspensas em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,2 em NaCl 0,9%.

Determinação do número de células

O número de células é determinado por contagem em câmara de Neubauer ou por dosagem de proteína, pois verifica-se uma estreita relação linear entre quantidade total de proteína e número de células até a densidade de 2×10^7 células/ml. Este método só é empregado com extratos de células submetidas à oscilação sônica e utilizados para a extração de material glicoproteico.

Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para crescimento (LIT) e para diferenciação de formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas (HIL, pH 6,7), já mencionados, têm sua composição relacionada abaixo.

(a) Meio LIT (Liver Infusion and Tryptose) - Formação de NaCl 0,4%, KCl 0,04%, Na_2HPO_4 0,8%, triptose 0,5%,

* Agradeço ao pessoal do laboratório do Dr. J.F. Fernandes pelo fornecimento do sangue de camundongo infectado.

glicose 0,2% e infusão de fígado 0,5%, em água bidestilada. As porcentagens são em peso/volume. Essa mistura é enriquecida com 10% de soro bovino (v/v), o pH é ajustado para 7,2 e a seguir a solução é incubada a 68°C, por 1 hora.

Após resfriamento à temperatura ambiente adiciona-se uma solução de hemoglobina bovina para uma concentração final de 2% (v/v). Essa solução de hemoglobina é preparada pela suspensão de uma papa de hemácias em um volume de H₂O destilada, seguida de centrifugação para remoção de membranas. Ao sobrenadante adicionam-se três volumes de H₂O. O meio, enriquecido com hemoglobina, é então filtrado em papel de filtro comum para remover agregados em suspensão que eventualmente se formam durante a incubação a 68°C. A esterilização do meio é feita através de filtração em filtro "Seitz" (tipo "EKS") sob pressão negativa. Após a esterilização, o meio é distribuído em frascos e incubado a 34°C por 48 horas para afastar a possibilidade de contaminação após o que é mantido a 4°C até o momento do uso.

(b) Meio HIL (Heart Infusion and Lactalbumin hydrolysate) - Constituído de NaCl 0,4%, KCl 0,04%, Na₂HPO₄ 0,8%, glicose 0,2% e hidrolisado de lactalbumina 0,5%, em água bidestilada. As porcentagens são em peso/volume. Após a adição de 10% de soro bovino (v/v), o pH do meio é ajustado para 6,7 ou 7,2, conforme o desejado, e incubado a 68°C por 1 hora. Depois de esfriado para a temperatura ambiente, adiciona-se 2% (v/v) de hemoglobina, preparada da forma descrita acima. Os demais passos são idênticos aos descritos para

o meio anterior. A infusão de coração de cão, um dos componentes desse meio, é preparada separadamente. A preparação dessa infusão é feita homogeneizando-se coração de cão em solução salina para um final de 20% (peso/volume), após a retirada de excesso de gordura que o envolve. Essa mistura é colocada num recipiente sobre água fervente por 30 minutos e depois de esfriada, filtrada sobre várias camadas de gaze. A seguir é filtrada em filtro "Seitz" da maneira descrita anteriormente. Essa infusão de coração é adicionada ao restante do meio em quantidades variáveis de preparação para preparação. Essa concentração é estabelecida pela adição de diferentes volumes de infusão a uma quantidade fixa do restante do meio, determinando-se qual a concentração que permite maior diferenciação de formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas. Essa concentração pode variar de 5 a 20%. Em alguns casos utilizou-se infusão de coração adquirida da Maknur Laboratories.

B. Experimentos com concanavalina A (con A)

Aglutinação de células por con A

A aglutinação é medida pela diminuição da turbidez de suspensões de células na presença de con A. As leituras foram feitas num espectrofotômetro a 660 nm, onde se observa uma diferença máxima na absorbância, proporcional à concentração de células. Nessas condições há uma relação linear entre a absorbância e o número de células, até $1,2 \times 10^8$ (Figura 2). A solução de con A (3 mg/ml) é mantida por

várias semanas em NaCl 1 M, a 4°C, sem alteração de suas propriedades. No momento do uso fazem-se as diluições desejadas no mesmo tampão utilizado no ensaio.

Os tubos de ensaio contêm com A e tampão fosfato 0,01 M, pH 7,2 + NaCl 0,9%. Adicionam-se as células, mantidas no mesmo tampão, até um volume final de 2 ml, agitam-se os tubos e faz-se a leitura no tempo zero. Os experimentos são feitos à temperatura ambiente (em torno de 23°C). Em cada experimento é feito um controle, sem con A cuja absorbância é verificada nos mesmos tempos que os tubos contendo con A. Qualquer diminuição verificada no tubo controle (que em nenhum experimento ultrapassou 7-10% da leitura no tempo zero) é descontada das leituras experimentais, nos tempos correspondentes. A porcentagem de aglutinação foi calculada pela expressão $(X - Y/X) 100$, onde X é a absorbância no tempo zero e Y a absorbância em determinado tempo.

Inibição da aglutinação

Os experimentos de inibição são realizados pela adição ao tubo de ensaio de: inibidor (ou qualquer substância cujo efeito na aglutinação se queira verificar), tampão, con A e por último a suspensão de células para o volume final de 2 ml. Do mesmo modo, após a adição das células se faz uma leitura (tempo zero). A porcentagem de inibição da aglutinação é calculada após 10 minutos de incubação pela expressão: $[1 - (A' - B') / (A - B)] 100$, onde A e A'

são, respectivamente, a absorbância no tempo zero na presença e na ausência de inibidor, e B e B' as respectivas leituras de absorbância após 10 minutos. As curvas de inibição por monossacarídeos são construídas com os valores de porcentagem de inibição calculados e o logaritmo da concentração milimolar do monossacarídeo adicionado.

Incubação das células com tripsina

Efeito da tripsina na aglutinação dos tripanossomos por con A é verificado pela pré-incubação das células com diferentes concentrações da enzima, a 30 ou 37°C, e em tempos variáveis. A seguir as células são lavadas três vezes com solução de NaCl 0,9% e verifica-se a aglutinação por con A da maneira descrita anteriormente. O controle do experimento é feito com células tratadas da mesma maneira, omitindo-se a tripsina. A atividade da tripsina foi verificada utilizando-se azocaseína como substrato (CHARNEY & TOMARELLI, 1947).

C. Isolamento e caracterização parcial do complexo glicoproteico

Cromatografia em papel dos açúcares

Para a cromatografia em papel, a amostra é submetida a hidrólise ácida, em HCl 2 N, por duas horas, a 100°C, a não ser quando especificado. Para tanto, a amostra, em concentração menor que 0,1% (NEUBERGER & MARSHALL,

1966), determinada pelo método de fenol-ácido sulfúrico, é misturada com HCl e colocada com o auxílio de uma microse - ringa, em tubos capilares (aproximadamente 1 mm de diâme - tro), segundo técnica de C. P. DIETRICH (comunicação pes - soal). Os tubos são selados numa das extremidades e centri - fugados a baixa rotação após colocação da amostra. Após a centrifugação os capilares são selados na outra extremida - de e colocados em tubos de ensaio vedados com gaze. Após hi - drólise, o material é retirado, seco sob vácuo em desseca - dor contendo ácido sulfúrico concentrado e NaOH, à tempera - tura de 4°C (GOTTSCHALK, in NEUBERGER & MARSHALL, 1966), suspenso em água e novamente seco nas mesmas condições. Es - se processo é repetido quatro vezes. Finalmente o resí - duo é suspenso em pequeno volume de água (em torno de 40 µl) e submetido à cromatografia descendente na temperatu - ra ambiente em papel Whatman nº 1 ou 3MM (esse último para cromatografias de 92 horas de duração). O papel de cromato - grafia é previamente lavado com etanol. Para a cromatogra - fia dos açúcares empregam-se os seguintes sistemas de solven - tes, nos tempos abaixo relacionados: butanol-ácido acético - água (4:1:1), 19 horas (WHEAT, 1966); acetato de etila-piri - dina-H₂O (2:1:2), 19 horas (JERMYN & ISHERWOOD, 1949); buta - nol-etanol-água (10:1:2), 92 horas (SPIRO, 1966); butanol - piridina-água (3:1:1), 30 horas (HOUGH, JONES & WADMAN, 1950) e butanol-piridina-HCl 0,1 N (5:3:2), 17 horas (BOURRILLON, MICHON & GOT, 1959). Em determinações rotineiras emprega - se o sistema butanol-piridina-água (3:1:1). Toda a identi - ficação dos monossacarídeos da amostra é feita em relação

a padrões colocados em cada cromatograma.

O cromatograma é rotineiramente revelado com nitrato de prata (MENZIES & SEAKINS, 1969). Para a obtenção de uma cor de fundo de papel mais clara, o cromatograma é lavado em uma solução de tiosulfato de sódio 5%, logo após a secagem do último reagente. O papel torna-se extremamente frágil, rasgando-se facilmente, sendo necessário lavá-lo com água logo a seguir. Dependendo da finalidade, o cromatograma é revelado com o corante de Morgan-Elson ou com o reagente de naftoresorcinol (PARTRIDGE, 1948). Algumas vezes utilizou-se ftalato de anilina (PARTRIDGE, 1948) em substituição ao nitrato de prata.

Determinação quantitativa dos açúcares por densitometria

A análise quantitativa dos açúcares é determinada pela técnica de densitometria após revelação dos cromatogramas. A amostra e o papel Whatman nº 1 são preparados da maneira descrita para a análise qualitativa dos açúcares. A amostra, aplicada em etapas de 20 µl por vez, é submetida à cromatografia descendente em butanol-piridina-água (3:1:1), durante 30 horas. O sistema de solventes é evaporado na ausência de correntes de ar e depois de seco, o papel é lavado, numa cuba contendo butanol, para a retirada de piridina remanescente. Após secagem, o cromatograma revelado com nitrato de prata é submetido à densitometria, realizada logo após a secagem do papel. O perfil

densitométrico é feito por leitura transversal (isto é, perpendicular ao sentido da corrida cromatográfica). Essa recomendação, assim como o tamanho da área da aplicação da amostra no cromatograma e a lavagem com butanol, após a evaporação do sistema de solventes empregado é feita por MENZIES (1973) para a densitometria de açúcares em papel.

A resposta densitométrica à concentração de açúcares, varia bastante de cromatograma para cromatograma, sendo necessário, para cada caso, usar diferentes concentrações de cada padrão, dentro de um intervalo de resposta linear do referido padrão. É necessário aplicar também, pelo mesmo motivo, várias concentrações da amostra a ser determinada. No caso particular, o intervalo varia de 1 a 15 μg , dependendo do padrão (determinado previamente) e várias concentrações da mesma amostra (de 10 a 90 μg). Para cada cromatograma, além da determinação do intervalo de resposta linear para cada padrão, a existência de várias concentrações da amostra torna possível que, pelo menos numa das concentrações empregadas, um monossacarídeo em particular, esteja contido dentro da faixa de linearidade determinada.

A quantidade de cada monossacarídeo presente na amostra é determinada comparando-se as áreas obtidas por densitometria desse monossacarídeo com seu padrão correspondente, os dois se encontrando dentro da faixa de linearidade de resposta. Esse resultado, para certa quantidade de amostra colocada (em μg de açúcar) é extrapolado,

em cada caso, para 100 μ g de amostra. Quando possível, é feita uma média dos resultados obtidos. A seguir determina-se a porcentagem de cada monossacarídeo em relação ao total (isto é, à soma das quantidades em μ g de cada açúcar, relativas a 100 μ g de amostra. Nesse caso, também se considerou a quantidade de ácido siálico, determinado por método colorimétrico e extrapolado, também, para 100 μ g de amostra.

Análise de aminoácidos

Para a análise de aminoácidos, procede-se à retirada prévia dos açúcares constituintes da molécula. Para tanto, seguiram-se as recomendações de HSU, HOFFMAN & MASHBURN, 1974). 1 mg da amostra em 0,75 ml de água, na presença de 2 g de resina catiônica (AG 50W-X8, H^+ , 200-400 mesh) e HCl 0,1 M é submetida a vácuo, selada nessas condições e mantida a 100°C por 18 horas. Após a hidrólise, o material é filtrado em colunas da mesma resina (6 x 10 mm) inicialmente com água (5 x 0,3 ml) e a seguir com HCl 4 M (5 x 0,5 ml). Os eluatos ácidos, contendo os aminoácidos, são reunidos, liofilizados e novamente submetidos a hidrólise ácida (2 ml de HCl 6 M, 100°C, 22 horas), também em ampolas seladas, sob vácuo.

A análise dos aminoácidos* foi feita em instrumento Beckman modelo 120 B. A análise dos aminoácidos

* Agradeço a todo o pessoal do laboratório do Dr. A. C. M. Paiva, e em particular ao Gilberto Goissis, pela análise de aminoácidos.

básicos é feita em colunas de 5 x 0,9 cm, contendo a resina PA-35, enquanto que os ácidos e os neutros são separados em colunas de AA-35, com as dimensões de 55 x 0,9 cm. Os tampões utilizados são citrato de sódio 0,2 M, pH 3,28 e 4,25 (para os aminoácidos ácidos e neutros) e citrato de sódio 0,35 M, pH 5,28 para os básicos. Utilizou-se o injetor manual com capacidade de 0,25 ml; temperatura utilizada: 55°C. O procedimento para a determinação dos aminoácidos segue as instruções contidas no manual do aparelho.

Extração do complexo glicoproteico

O material glicoproteico é extraído com solução aquosa de fenol, baseado no método original de WESTPHAL, LÜDERITZ & BISTER (1952). As células epimastigotas são suspensas em água a 4°C e submetidas a ultra-som. Aplicaram-se pulsos rápidos (1 minuto) de intensidade média (metade da capacidade máxima do aparelho da Branson Sonic Power Co., Mod. W 185 D) por quatro vezes, observando-se um intervalo de 2 minutos entre cada um. Toda essa manipulação é feita a 4°C. Nas condições descritas, a integridade morfológica das células é destruída, o que se pode comprovar por observação ao microscópio. O extrato de células é imediatamente agitado com igual volume de fenol 88% (peso/volume) por 30 minutos, à temperatura ambiente. A seguir é centrifugado a 14000 xg por 40 minutos. A fase aquosa é separada, enquanto que as demais frações (interface, fenólica, e um resíduo insolúvel) são misturadas e novamente submetidas à extração fenólica, após a adição de água em um volume igual

ao retirado da fase aquosa. As fases aquosas das duas extrações são misturadas e agitadas com éter por três vezes, desprezando-se a interface formada. Dependendo do volume da fase aquosa, procede-se a uma redução de volume por liofilização antes do tratamento com éter. Em seguida, o material solúvel em água é precipitado com 4 volumes de etanol frio e mantido durante aproximadamente 16 horas em congelador (-20°C). O precipitado coletado por centrifugação (8000 xg, 10 minutos) é seco sob vácuo e finalmente suspenso em água. Esse material (fração aquosa) contém o complexo glicoproteico de formas epimastigotas de T. cruzi.

Cromatografia em coluna de DEAE-celulose

A DEAE-celulose é tratada segundo PETERSON (1970).

A coluna de DEAE-celulose (1,6 x 26 cm) adicionam-se 14 mg de açúcar (dosado pelo método de fenol-ácido sulfúrico) da fração aquosa. O material é eluído por fluxo gravitacional à temperatura ambiente, inicialmente com água (em torno de 130 ml) e a seguir com um gradiente linear de NaCl em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5. O gradiente salino é obtido com 200 ml de NaCl 0,01 M e 200 ml de NaCl 2 M. O fluxo da coluna é mantido em torno de 60 ml/hora e o volume coletado é de 2 a 2,5 ml/tubo. A inclinação do gradiente é verificada por refratometria, sendo os dados obtidos transformados em molaridade pela relação $M = r_i - 133,32$, onde r_i corresponde ao índice de

refração. Quando a quantidade de material a ser cromatografado é maior, a coluna e o gradiente são proporcionalmente aumentados. O material é coletado em um coletor de frações com registrador acoplado.

Filtração em gel

O material cromatografado em Sefadex G-25 (200-400 mesh) ou Bio-Gel P-6 (100-200 mesh) em colunas de 1,3 x 80 cm, é eluído com água, à temperatura ambiente, à razão de 80-100 ml/hora.

A cromatografia em Bio-Gel P-150 (200-400 mesh) é feita a 24°C, em colunas de 1,3 x 80 cm. O material é eluído com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, na presença de SDS 0,1% em um fluxo de 3 ml/hora. A amostra suspensa no mesmo tampão, além de 2-mercaptoetanol 0,14 M é fervida por 2 minutos, antes da cromatografia. A eluição do material é acompanhada pela absorbância a 260 e 280 nm e pela dosagem de açúcar pelo método de fenol-ácido sulfúrico.

O volume vazio de cada coluna é determinado com 1 ml de azul de dextrana (1 mg/ml). Quando necessário, a eluição de sal é acompanhada por refratometria.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida é feita em tubos de 6 x 10 mm, em diferentes concentrações de gel na presença ou na ausência de SDS. Na maioria das vezes a

polimerização do gel no tubo é preparada de véspera e submetida a um pré-eletroforese, nas mesmas condições a serem empregadas para a amostra, durante uma hora. A amostra é aplicada no gel na presença de azul de bromofenol e glicerol. Após a eletroforese, o gel é retirado do tubo, e a posição do corante marcada com um fio de cobre antes da fixação e coloração do gel. Para a revelação do material açúcar-positivo, o gel é fixado em TCA 12% e corado com o reagente de Schiff, segundo as condições descritas por KORN & WRIGHT (1973). A proteína é revelada com negro de amido 0,1% em ácido acético 7,5%. Após 2 horas de coloração, o excesso de corante é retirado com ácido acético 7,5%. Para a demonstração de açúcar e proteína no mesmo gel (FAIRBANKS, STECK e WALLACH, 1971) o material é corado inicialmente com o reagente de Schiff da maneira usual, e após a retirada do excesso de corante, tratado com negro de amido, da maneira descrita. Esse processo será usualmente referido como coloração dupla.

(a) Eletroforese na ausência de SDS - A eletroforese é feita em gel contendo acrilamida 5%; N,N'-metilenobisacrilamida 0,13%, N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED) 0,05% (v/v) e persulfato de amônio 0,015% em Tris-HCl 0,33 M, pH 8,9 num volume de 2 ml (camada inferior). A camada superior, sobre a qual é colocada a amostra, é formada por acrilamida 2,5%, N,N'-metilenobisacrilamida 0,63%, TEMED 0,3% e persulfato de amônio 0,035% em tampão Tris-H₃PO₄ 0,03 M, pH 6,9, num volume de 0,3 ml. A amostra é aplicada no gel em

100 μ l (40-80 μ g de açúcar) de uma solução contendo: 2-mercaptoetanol 0,01 M, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,0005%, em tampão Tris- H_3PO_4 0,006 M, pH 6,9. A eletroforese é realizada em tampão contendo Tris-HCl 0,01 M e glicina 0,08 M, pH 8,3, por 2-3 horas a 4°C, com uma corrente de 3 mA/gel. As condições empregadas são baseadas no trabalho de DAVIS (1964).

(b) Eletroforese na presença de SDS - As condições utilizadas são as mesmas descritas no trabalho de WEBER & OSBORN (1969), utilizando tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e SDS 0,1% (MAIZEL, 1966), tanto no gel, como no tampão de corrida. O gel utilizado contém acrilamida 10%, N,N'-metilenobisacrilamida 0,27%, TEMED 0,075% e persulfato de amônio 0,075%. A amostra (100 μ l, contendo 40-80 μ g de açúcar) em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,2, SDS 0,1%, 2-mercaptoetanol 0,14 M, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,002%, é aquecida a 100°C por 2 minutos, antes de sua aplicação no gel. As condições utilizadas são 8 mA/gel e 6 horas de eletroforese a 24°C.

(c) Densitometria do gel de poliacrilamida - A densitometria é feita a 560 nm (ou 525 nm), quando o gel foi corado somente com o reagente de Schiff e a 620 nm para a proteína, após coloração dupla (FAIRBANKS, STECK & WALLACH, 1971). Quando necessário, a área de cada pico é determinada por planimetria.

Determinação de peso molecular

A determinação do peso molecular é feita segundo SEGREST & JACKSON (1972) por eletroforese em gel de poli-acrilamida. As concentrações de acrilamida empregadas são 5; 7,5; 10 e 15%. A relação acrilamida/N,N'-metilenobisacrilamida é mantida constante e igual a N/25 (onde N corresponde à porcentagem de gel desejada). A concentração de TEMED utilizada é de 0,05% e a de persulfato de amônio 0,075%. A amostra é aplicada da maneira descrita anteriormente para a eletroforese na presença de SDS, exceto para os padrões de proteína, onde se omite o aquecimento a 100°C. O tampão de eletroforese utilizado também é fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e SDS 0,1%. Para cada concentração de gel, a amostra do material glicoproteico e os padrões de peso molecular são submetidos à mesma corrida eletroforética, embora por razões técnicas, em diferentes tubos. Os padrões empregados são albumina de soro bovino (68000); albumina de ovo (43000); quimotripsinogênio A (25700); mioglobina de baleia (17200) e citocromo c (11700). A relação de peso molecular foi extraída de WEBER & OSBORN (1969).

Dosagens

Proteína foi dosada pelo método de Lowry modificado (HARTREE, 1972), utilizando-se albumina bovina como padrão. Os açúcares foram determinados pelo método de Antrona (SPIRO, 1966) para hexoses neutras e fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al, 1956) para os açúcares totais.

Nos dois casos, glicose serviu como referência. Ribose foi dosada pelo método do orcinol (DISCHE, 1955) e desoxirribose pelo método da difenilamina (GILES & MYERS, 1965). Ácido siálico foi determinado pelo método do ácido tiobarbitúrico (WARREN, 1959), utilizando-se ácido N-acetil neuramínico como padrão e ácidos urônicos pelo método do carbazol (GALAMBOS, 1967), utilizando-se ácido glicurônico como padrão. Em todos os casos foi feita uma curva para a determinação da linearidade de cada método.

D. Reagentes

Azocaseína, ácido N-acetil neuramínico, ácido glicurônico, desoxirribose, ribose, albumina de soro bovino, ovalbumina, quimotripsinogênio A, mioglobina de baleia, citocromo c, SDS, DEAE-celulose (grau médio, 0,89 meq/g), Sefadex G-25 (medium) foram obtidos da Sigma; orcinol e pronase, da Calbiochem; acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, TEMED, persulfato de amônia da BDH; Bio-Gel P-6 e Bio-Gel P-150 da Bio-Rad Laboratories; tripsina da Worthington; ácido tiobarbitúrico da Theodor Schuchardt; infusão de fígado da Oxoid; os demais reagentes são de procedência Merck, como no caso dos corantes empregados (antrona, nitrato de prata, naftoresorcinol, fucsina básica, difenilamina) ou de grau analítico. Na maioria dos experimentos utilizou-se concanavalina A gentilmente cedida pelo Dr. T. Benjamin, do Public Health Research Institute. Nos demais, a con A utilizada foi adquirida da Calbiochem.

FIGURA 1 - Crescimento de formas epimastigotas. As células ($20 \times 10^6/\text{ml}$) foram inoculadas em meio LIT (dia 0) e cultivadas a 28°C com agitação contínua. Para a determinação do número de células, por contagem em câmara de Neubauer, retiraram-se pequenas amostras em diferentes dias, provenientes, nesse caso, de culturas mantidas em frascos de erlenmeyer de 2 litros, contendo 400 ml de cultura.

FIGURA 2 - Relação entre absorbância a 660 nm e número de células em cultura. Esse gráfico foi construído pela determinação do número de células existentes numa amostra de formas epimastigotas de T. cruzi por contagem em câmara de Neubauer e a absorbância a 660 nm de diferentes diluições dessa amostra.

RESULTADOS

A. Efeito de con A sobre T. cruzi

Efeito de con A sobre formas epimastigotas

As formas epimastigotas de T. cruzi são aglutinadas por baixas concentrações de con A, de 0,5 a 1,5 µg/ml (Figura 3)*. A porcentagem de aglutinação é linear por 10-15 minutos (Figura 4). A velocidade da reação é dependente do número inicial de células, observando-se um tempo de latência variável na resposta à lectina, quando a densidade celular inicial encontra-se abaixo de $5 \times 10^7 - 10^8$ células/ml (Figura 5). A velocidade da aglutinação depende da concentração de con A utilizada (Figura 6). A reação se completa quando 70 a 80% das células estão aglutinadas, o que ocorre nos primeiros 15-20 minutos de reação com concentrações de con A acima de 0,8 µg/ml (Figura 7). A adição de mais con A (até 10 µg/ml) não altera significativamente essa proporção.

Os experimentos de aglutinação são feitos com células de 3-4 dias de cultura em LIT, isto é, células em fase final de crescimento exponencial ou no início de fase estacionária. Não se observam diferenças significativas em

* Agradeço à Dra. Glaucia Machado Santelli pelos trabalhos fotográficos.

experimentos com células em fase exponencial de crescimento (Figura 8).

A possibilidade de que as células não aglutinadas por con A estejam refletindo uma heterogeneidade da população quanto à resposta à lectina é verificada por dois experimentos: a) as células não aglutinadas são retiradas, centrifugadas, lavadas com NaCl 0,9% (três vezes), ressuspensas no tampão de reação (para uma densidade de 1×10^8 células/ml) e novamente tratadas com con A; b) as células são tratadas com con A em condições de assepsia sendo as células não aglutinadas inoculadas em meio de crescimento (LIT). Após 4 dias de cultivo, o experimento de aglutinação por con A é repetido. Nos dois casos os resultados obtidos são semelhantes aos da Figura 4.

A especificidade da reação de aglutinação das células por con A é verificada pela inibição da reação de aglutinação por monossacarídeos, cuja interação com a lectina foi bem estudada (GOLDSTEIN, HOLLERMAN & SMITH, 1965). São utilizados nesse caso como inibidores da reação metil- α -D-manose, α -D-manose, α -D-glicose e N-acetil-D-glicosamina (que produzem uma inibição de 50% em concentrações de 0,25; 3; 10 e 10 mM, respectivamente). Monossacarídeos não inibidores, como glicosamina, produzem uma inibição abaixo de 10% numa concentração de 20 mM. Esses resultados estão apresentados na Figura 9. Fucose, galactose e xilose, também considerados não inibidores, não têm qualquer efeito na aglutinação (mesmo em concentrações em torno de 100 mM).

Uma vez que as células normais de mamíferos são passíveis de aglutinação por con A somente após tratamento com tripsina, procurou-se verificar o efeito dessa enzima nas células do protozoário e sua possível consequência na reação de aglutinação. Para tanto, as células são incubadas com tripsina em concentrações que variam de 0,001 a 0,01%, com tempos de incubação de 2 a 60 minutos, a 30 e 37°C, não se observando mudanças na porcentagem de aglutinação (Figura 10), exceto quando o tempo de incubação e/ou a quantidade de tripsina são empregados nos limites máximos apresentados, ocasião em que se observa uma inibição variável da aglutinação.

A presença de enzimas proteolíticas no meio de cultura poderia ser um fator determinante na aglutinabilidade das células. Para se verificar essa hipótese, o meio LIT (concentrado 10 vezes), que fora utilizado para o crescimento de células durante 4 dias, é incubado com azocaseína, não apresentando atividade proteolítica.

Efeito de con A sobre formas tripomastigotas metacíclicas

A diferenciação em cultura, de formas epimastigotas em tripomastigotas, além de errática, nunca é completa. Portanto, numa cultura onde ocorreu diferenciação, coexistem as duas formas. Quando essas formas são tratadas com con A e observadas ao microscópio óptico, não se encontram aglomerados de formas tripomastigotas metacíclicas, em

bora estes sejam encontrados nos aglomerados de formas epimastigotas. Células provenientes de uma cultura contendo 28% de formas metacíclicas são pouco aglutináveis por con A (Figura 11). Esse fato sugere a possibilidade de que formas metacíclicas (ou comprometidas com a diferenciação) não sejam suscetíveis à aglutinação por con A. Uma tentativa de demonstrar parcialmente essa hipótese está descrita na Tabela I. Culturas com diferentes porcentagens de formas metacíclicas são submetidas à aglutinação por con A (1,5 µg/ml). Após 30-60 minutos de incubação à temperatura ambiente, as células que não aglutinam são examinadas ao microscópio, estabelecendo-se a porcentagem de formas tripomastigotas remanescentes. Verifica-se uma recuperação variável de formas tripomastigotas, alcançando-se um enriquecimento máximo de cinco vezes em relação à cultura original.

Efeito de con A sobre formas tripomastigotas sanguícolas

As formas sanguícolas de T. cruzi, preparadas da maneira descrita, são submetidas a tratamento com concanavalina A, da maneira usual. Em diversas concentrações de lectina (1; 7,5 e 75 µg/ml) e numa densidade de células até 2×10^8 células/ml, não se nota qualquer aglutinação (Figura 12). No único experimento realizado, também não se observou aglutinação das células com con A após tratamento das formas sanguícolas com tripsina (0,001%, 2 minutos a 37°).

B. Isolamento e caracterização parcial de um complexo glicoproteico extraído de formas epimastigotas de T. cruzi

Isolamento e purificação parcial

(a) Isolamento

Utilizam-se células epimastigotas em fase final de crescimento exponencial ou início de fase estacionária (células de 3-4 dias de cultura em LIT, segundo condições descritas em Material e Métodos). Em quatro amostras do extrato bruto dessas células verifica-se uma variação em torno de 14% para o açúcar total, 6% para o conteúdo de hexoses e 2,5% para o de ribose (Tabela II). Os extratos de células tratados com fenol 44% fornecem uma fase aquosa que, após tratamento com éter e precipitação com etanol, é suspensa em água. Quando esse material é centrifugado a baixa rotação separa-se uma fração solúvel (fração aquosa) e uma insolúvel. A recuperação em carboidratos na fração aquosa é de aproximadamente 10% em hexoses e de 0,23% em proteína, sendo praticamente desprezível a quantidade dessas duas espécies moleculares na fração insolúvel (Tabela III).

(b) Purificação parcial por cromatografia

A fração aquosa é cromatografada em coluna de DEAE-celulose, fornecendo três picos contendo açúcar (Figura 13). O pico 1 é obtido pela eluição da coluna com água,

enquanto que os picos 2 e 3 são obtidos através de um gradiente linear de NaCl (0,01 - 2,0 M) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5.

Embora o perfil cromatográfico seja constante no que se refere ao carboidrato, nas diferentes colunas realizadas, a proporção relativa de um pico para outro varia bastante de coluna para coluna, chegando, por exemplo em alguns casos, a ocorrer praticamente uma inversão na proporção existente entre os picos 2 e 3. O perfil obtido pela leitura das frações a 260 e 280 nm é um tanto variável, encontrando-se na maioria das vezes formado por dois picos, um coincidente com o pico 1 e o outro com o pico 3, embora superpondo-se em parte com o pico 2.

Em virtude da pequena quantidade de material do pico 1, é impossível seguir nesse caso, as etapas de caracterização estabelecidas para os picos 2 e 3.

Desprezando-se a região de maior embricamento existente entre os picos 2 e 3, os tubos correspondentes a cada pico são reunidos e concentrados por liofilização. A seguir efetua-se uma dessalificação do material por filtração em coluna de Sefadex G-25 ou Bio-Gel P-6, conforme descrito anteriormente. Os resultados obtidos são os mesmos no caso das duas resinas.

Cerca de 60% do material contendo açúcar do pico 2 é eluído com água no volume vazio da coluna (Figura 14). Esse material (pico 2a) é reunido e concentrado por

liofilização. Nessa coluna também ocorre a separação de outro pico açúcar-positivo (pico 2b), além de um material eluído juntamente com NaCl e que além de conter açúcar, se destaca por sua maior absorbância a 260 nm, quando comparado com os demais componentes dessa coluna. Em outros experimentos o pico 2b é mais pronunciado, enquanto que o material açúcar-positivo eluído juntamente com o NaCl é menos nítido. O experimento representado na Figura 14 foi escolhido pelo fato de que nele são medidos todos os parâmetros julgados necessários.

Na cromatografia do pico 3, praticamente 100% do material contendo açúcar é eluído com água no volume vazio da coluna (Figura 15). Também neste caso o material açúcar-positivo foi reunido e concentrado (pico 3a).

A recuperação e a composição em proteína e carboidratos da fração aquosa, picos 2a e 3a são apresentados na Tabela IV. A recuperação, considerando-se os picos 2a e 3a é de aproximadamente 36% de açúcar total, 26% de hexoses, 3,6% de ribose e 1,5% de proteína, em relação à fração aquosa. Essa mesma recuperação em relação ao extrato bruto passa a ser de 1,9% para o açúcar total; 2,8% para hexoses; 1,3% para ribose e 0,046% para a proteína. A contaminação por ácidos nucleicos, co-purificados no processo descrito, deve, na prática, se resumir ao RNA (dosado como ribose), uma vez que não é possível detectar a presença de desoxirribose na fração aquosa, mesmo utilizando 200 µg de açúcar dessa fração. Deve-se ressaltar que o método empregado

detecta pequenas quantidades de DNA (a partir de 5 μ g). A proporção, relativa à proteína existente, de hexoses, açúcar total e ribose aumenta no pico 2a e 3a, quando comparada com a fração aquosa. No entanto, entre os dois picos, essas relações são praticamente iguais, mostrando que em termos gerais, essas frações pouco diferem, inclusive na contaminação por RNA que varia em torno de 10% (em relação ao açúcar total) nos dois casos.

Os dados de extração e purificação do material glicoproteico apresentados referem-se a um único experimento, uma vez que, como foi notado anteriormente, a proporção de material açúcar-positivo entre os picos varia. No entanto, considerando-se a recuperação total, isto é, o pico 2a somado com o pico 3a, os resultados passam a ser representativos das muitas extrações e purificações realizadas.

Tanto o pico 2a, como o 3a são constituídos principalmente de carboidratos, que perfazem 75% do total, enquanto que a proteína contribui com 25%, considerando-se a dosagem pelo método de antrona (Tabela V). Essa relação passaria a 85 e 15%, respectivamente, levando-se em conta os dados obtidos pela dosagem com o método de fenol-ácido sulfúrico.

Experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida é utilizada nesse trabalho para se verificar o

caráter glicoproteico do material isolado, além de outras possíveis informações sobre composição e estrutura desse material. Para tanto, são feitas eletroforeses na presença e na ausência de SDS.

(a) Eletroforese na ausência de SDS - A eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, pH 8,7, revela a presença de uma única banda Schiff-positiva, de pouca penetração no gel, para a fração aquosa, pico 2a e pico 3a (Figura 16). Quando cada gel, previamente corado com o reagente de Schiff, é recorado com negro de amido (coloração dupla), não se revela a presença de qualquer material proteico fora das regiões Schiff-positivas para a fração aquosa e picos 2a e 3a, nas quantidades de material empregadas (até 80 µg de açúcar).

(b) Eletroforese na presença de SDS - Quando a eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, pH 7,2 foi realizada na presença de SDS 0,1%, obtiveram-se quatro bandas Schiff-positivas (A, B, C e D) tanto para a fração aquosa, como para os picos 2a e 3a (Figura 17). A proporção de cada banda, calculada por densitometria, é aproximadamente a mesma nos três materiais analisados (Tabela VI), assim como a migração relativa de cada banda na eletroforese (Tabela VII). A coloração posterior de cada gel com negro de amido sugere que todas as bandas contêm açúcar e aminoácidos na sua composição e que não se encontram proteínas isentas de açúcar, nas condições empregadas. Os traçados densitomêtri

cos da eletroforese em gel de poliacrilamida da fração aquosa, pico 2a e pico 3a se encontram nas Figuras 18, 19 e 20, respectivamente. Essas figuras representam o perfil densitométrico do material Schiff-positivo antes da coloração com negro de amido e o perfil obtido nesse mesmo material após tratamento com o corante de proteínas. Embora exista uma pequena interferência do complexo glicoproteína-reagente de Schiff na absorbância de 620 nm utilizado para a localização do material proteico, não se fez qualquer correção no perfil densitométrico nas figuras apresentadas.

Deve-se ressaltar que o tratamento da fração aquosa com uréia 8 M, além de SDS 0,1% e a amostra aplicada na ausência de 2-mercaptoetanol não altera o padrão das bandas obtido.

Embora as quatro bandas possuam aminoácidos e carboidratos na sua composição, nota-se uma diferença na banda D quanto ao comportamento frente aos corantes utilizados, o que se evidencia, de imediato, pela cor obtida após coloração dupla. Enquanto as bandas A, B e C se tornam bem escuras após coloração com o reagente para proteína, a banda D tem sua cor pouco alterada, sendo essa diferença diminuída com o tempo. Essas diferenças podem ser observadas pela comparação das áreas de cada banda antes e depois de coloração dupla (Tabela VIII). O fato da banda D se complexar com menor quantidade de corante para proteína, sugere uma diferença de composição em relação às demais bandas.

Os resultados da Tabela VIII não podem ser utilizados para um cálculo preciso da composição relativa de carboidratos e proteínas em cada uma das bandas por não existir um estudo detalhado das relações entre as respostas colorimétricas aos dois corantes, quando usados concomitantemente, e as quantidades relativas daquelas duas substâncias. Entretanto, as relações de área mostradas na última coluna da Tabela VIII, autorizam a suposição, comparando-se resultados de um mesmo experimento, de que a banda D seja relativamente mais rica em carboidratos do que as bandas A, B, e C, o que vem reforçar a sugestão acima discutida de que aquela banda possua uma representação proteica relativamente menor que as outras três. Essa suposição evidentemente não está levando em consideração possíveis complexações diferentes dos corantes em cada banda como consequência de diferenças na estrutura molecular.

A suposição feita acima fica reforçada quando se consideram os resultados obtidos no seguinte experimento controle. Amido foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 5% (na ausência de SDS) nas mesmas condições do experimento descrito acima. Após a eletroforese o gel foi exposto à mesma sequência de coloração. A área correspondente à banda de amido, calculada a partir da densitometria do gel a 620 nm é a mesma quando corada com o reagente de Schiff ou após coloração sobreposta de negro de amido (3,4 e 3,7 cm², respectivamente). Da mesma forma não há alteração da área correspondente ao açúcar, antes e após a dupla coloração. Esses resultados indicam que a

coloração basal pelo método de Schiff não se altera pela so
breposição de negro de amido na ausência de proteína, o que
vem demonstrar a especificidade de complexação do negro de
amido com proteína, mesmo na presença da coloração desenvoll
vida pelo reagente de Schiff.

A proporcionalidade das áreas de sobreposi
ção quando melhor estudada através de padrões de composi
ção conhecida poderá fornecer um método bastante simples
para a determinação das quantidades absolutas de proteínas
e carboidratos em mistura heterogênea de glicoproteínas.

Os experimentos, aqui descritos, de eletrofo
rese em gel de poliacrilamida na presença de SDS apresen-
tando uma co-migração de substâncias contendo carboidra
tô e proteína sugerem fortemente que essas substân
cias seja glicoproteínas onde a parte proteica e a parte
glicídica estão ligadas por ligação covalente.

Em experimentos independentes de eletroforese
(não apresentados), em que os cilindros de gel foram co-
rados com azul de Coomassie, desenvolveu-se uma cor azul tí
pica nas quatro bandas, reforçando a sugestão de que as
quatro frações do gel contêm proteína e que não existe ne-
num outro contaminante significativo na preparação.

(c) Tratamento da fração aquosa com pronase - Pa-
ra a obtenção de mais uma evidência da natureza glicoprote
ica do material isolado, tratou-se uma alíquota da fra-
ção aquosa com pronase. Após eletroforese em gel de

poliacrilamida, na presença de SDS, o material foi tratado com o reagente de Schiff. O resultado é mostrado na Figura 21. Nessa mesma figura está representado um gel em que a amostra aplicada, na mesma concentração que a tratada com pronase, foi submetida ao mesmo tratamento, omitindo-se a enzima proteolítica (fração aquosa sem pronase). Pronase, na mesma concentração empregada para o tratamento da fração aquosa (4 mg), submetida às mesmas condições de incubação e eletroforese das amostras anteriores, não revelou a presença de qualquer banda Schiff-positiva. Os resultados densitométricos desse experimento após coloração com o reagente de Schiff são mostrados na Figura 22. A área de cada banda e a respectiva porcentagem em relação à área total das amostras tratadas e não tratadas com pronase é apresentada na Tabela IX, mostrando uma diminuição bem evidente nas bandas A e B, além de um pequeno aumento da banda D.

Cromatografia da fração aquosa em coluna de Bio-Gel P-150 em presença de SDS

Com base nos dados de eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, tentou-se isolar as bandas por cromatografia em coluna, também na presença de SDS. O perfil cromatográfico da fração aquosa em coluna de Bio-Gel P-150 e eluída com tampão fosfato de sódio 0,1 M, em presença de SDS 0,1%, é mostrado na Figura 23. Para se verificar a composição dos três picos açúcar-positivos (I, II e III) isolados nessa cromatografia, fez-se

uma eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, na presença de SDS. Para tanto a amostra retirada do tubo contendo maior concentração de açúcar, em cada pico, é aplicada, sem qualquer outro tratamento, no gel de poliacrilamida. O gel correspondente a cada pico é mostrado na Figura 24, enquanto que os perfis densitométricos são mostrados nas Figuras 25, 26 e 27. A separação entre as bandas não foi completa, como se pode observar nos resultados condensados na Tabela X, excetuando-se a banda D, eluída 88% no pico III. No caso das bandas A e C, houve um relativo enriquecimento na porcentagem de cada banda nos picos I e II, respectivamente. Nesse experimento, embora haja uma certa assimetria principalmente da banda C, não foi possível delimitar a banda B. Num experimento semelhante, a fração aquosa foi cromatografada em coluna de Sefadex G-75, na presença de SDS, sendo que todo o material Schiff-positivo foi eluído no volume vazio da coluna. Nesse material, submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, também não foi possível detectar a banda B, embora as demais (A, C e D) estivessem presentes dentro do padrão de distribuição conhecido.

Determinação do peso molecular

A técnica de determinação do peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida tem sido bastante utilizada em virtude de sua relativa simplicidade. No entanto a mobilidade eletroforética só é dependente do peso molecular, quando: a) a carga por unidade de massa é

aproximadamente constante e b) as propriedades hidrodinâmicas são função somente do peso molecular (REYNOLDS & TANFORD, 1970). O comportamento anômalo de algumas proteínas e glicoproteínas na eletroforese em gel de poliacrilamida, em virtude do não cumprimento de um ou dos dois requisitos mencionados, ocasiona um erro na determinação do peso molecular. De um modo empírico SEGREST & JACKSON (1972) propuseram um método capaz de estimar o peso molecular das glicoproteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida, em diferentes concentrações de gel e na presença de SDS. Esse método, aplicado para a determinação do peso molecular de cada banda do material aquoso é mostrado na Figura 28, onde se evidencia a variação do peso molecular calculada nas diferentes concentrações de gel, para as bandas A, B e C, ao contrário da banda D, que apresenta um peso molecular constante. O peso molecular estimado pelo ponto mínimo da curva assintótica e pelo desconto de 1000 daltons para cada 10% de carboidrato na molécula é de 28000; 24000; 20000 e 5000 para as bandas A, B, C e D. O desconto foi efetuado porque proteínas contendo mais de 10% de carboidratos na molécula têm a sua mobilidade acelerada. É necessário ressaltar também que o método de SEGREST & JACKSON (1972) somente pode ser utilizado para glicoproteínas contendo ácido siálico. A existência desse açúcar foi comprovada por determinação química da fração aquosa total. Entretanto, permanece a possibilidade de que algumas das frações obtidas no gel não contenham ácido siálico, dificultando, nesse caso, a determinação do peso molecular real.

Deve-se ressaltar também que a banda D foi a única que nas quatro concentrações de gel utilizadas não variou o seu comportamento, indicando sempre um peso molecular de 12000. Em situação semelhante, KOCHERT & YATES (1974), trabalhando com uma glicoproteína que contém 45% de carboidratos, não aplicaram o desconto no cálculo do peso molecular.

Uma das maneiras preconizadas por BANKER & COTMAN (1972) como método de tornar válido o cálculo de peso molecular, também se refere ao uso de várias concentrações de gel de poliacrilamida (até 8%). Colocando num gráfico o logaritmo da mobilidade eletroforética e a concentração de T (isto é, a concentração de acrilamida mais N,N'-metilenobisacrilamida), obtém-se o gráfico conhecido como "Ferguson plot" (FERGUSON, 1964). Extrapolando-se a mobilidade eletroforética para a concentração de 0% de T, obtém-se a mobilidade eletroforética livre (M_0), que independe do peso molecular, e que, calculado para diferentes proteínas, revelou-se praticamente constante (BANKER & COTMAN, 1972; SHIRAHAMA, TSUJII & TAKAGI, 1974). Esse tipo de gráfico aplicado para as bandas da fração aquosa é mostrado na Figura 29 (b). Na mesma figura, gráfico a, está descrito o comportamento das proteínas utilizadas como padrão de peso molecular, nas mesmas condições usadas para a fração aquosa. Nesse caso, o peso molecular é dependente da inclinação da reta e com base no trabalho de BANKER & COTMAN, o peso molecular foi calculado em 26400; 18200; 16800 e 12800 para as bandas A, B, C e D, respectivamente.

Deve-se ressaltar, que não houve mudança no método utilizado, mas tão somente de cálculo, mantendo-se portanto, todos os erros inerentes ao método e ao comportamento de cada banda na poliacrilamida. Além disso, pelo gráfico apresentado, é perceptível o comportamento diferente da banda D, com um M_0 significativamente diferente das demais bandas, em virtude, provavelmente, de uma ligação de SDS/grama de material quantitativamente diferente.

Levando-se em conta a discussão anterior, pode-se sugerir um peso molecular entre 26400 - 28000 para a banda A; 18200 - 24000 para a B; 16800 - 20000 para a banda C e 5000 - 12800 para a banda D.

Composição do complexo glicoproteico

A composição das diferentes frações isoladas é determinada pela análise dos monossacarídeos e dos aminoácidos existentes.

(a) Caracterização dos monossacarídeos

Para a caracterização dos açúcares o material foi submetido à hidrólise ácida. As condições de hidrólise foram estabelecidas pelo tratamento de diversas amostras com HCl em diferentes concentrações (de 2 a 4 N) e diferentes tempos de hidrólise (de 1 a 5 horas), a 100°C, nas condições descritas em Material e Métodos. O cromatograma dessas amostras é apresentado na Figura 30. A densitometria desse cromatograma mostrou uma destruição máxima de

manose (47%) nas condições mais drásticas empregadas (4 N, 5 horas), enquanto que a ribose foi quase que totalmente destruída (94%) nas mesmas condições. Os demais açúcares não são visivelmente afetados nas condições empregadas. Com base nos resultados desse experimento, utilizam-se rotineiramente as seguintes condições de hidrólise: HCl 2 N, 2 horas a 100°C.

A identificação dos açúcares componentes da fração aquosa foi estabelecida em diferentes sistemas de solventes, já relacionados em Material e Métodos, sendo constituída de uma hexosamina, galactose, glicose, manose e xilose (Figura 31).

A presença de hexosamina foi confirmada pelo corante de Morgan-Elson. Provavelmente não é galactosamina pois no sistema de solventes empregados galactosamina e glicosamina têm R_f diferentes e a mancha Morgan-Elson positiva apresenta a mesma migração da glicosamina padrão. Além disso a análise de aminoácidos só revelou a presença de glicosamina. A possibilidade de que o açúcar aminado seja manosamina é remota, já que manosamina parece não ser um componente usual de glicoproteínas.

Manose, que apresenta a mesma migração da frutose nos vários sistemas de solventes utilizados, foi identificada pela coloração com naftoresorcinol. No mesmo cromatograma esse corante desenvolve uma cor vermelha típica para a frutose padrão e não apresenta cor alguma com manose padrão. Esse resultado, embora por prova negativa,

mostra que a mancha experimental é manose pois também nesse caso não há desenvolvimento de cor com naftoresorcinol.

Qualitativamente os açúcares são os mesmos para a fração aquosa (Figura 31), fração 2a (Figura 32) e fração 3a (Figura 33) com exceção de xilose, não detectada na fração 2a. Embora para essas figuras tenham sido selecionados trechos de cromatogramas com altas concentrações da amostra no sentido de evidenciar a xilose, não se pode afirmar que a fração 2a não contenha esse açúcar, que poderia estar presente em quantidades aquém da sensibilidade do método. A presença de ribose, nos vários experimentos realizados é errática e nem sempre confirmada. Entretanto, deve-se salientar que as amostras utilizadas apresentam uma contaminação variável de ácidos nucleicos (5 a 10%), como pode ser evidenciado pela absorbância a 260 nm.

Não foi possível detectar a presença de ácidos urônicos na fração aquosa, mesmo utilizando-se grandes quantidades de material (até 200 µg de açúcar), pelo método do carbazol que é sensível a partir de 5 µg de ácido glicurônico. A determinação quantitativa dos açúcares foi feita por densitometria dos cromatogramas, segundo descrito em Material e Métodos, com exceção do ácido siálico, dosado colorimetricamente pelo método do ácido tiobarbitúrico. Os resultados dessa quantificação em porcentagem de açúcar estão representados na Tabela XI, onde se pode observar uma diferença de composição entre os picos 2a e 3a, no que diz respeito ao seu conteúdo em glicosamina, galactose e xilose,

além de uma alteração na proporção de alguns monossacarídeos nos dois picos, quando comparados com a fração aquosa.

(b) Caracterização dos aminoácidos

Os resultados da análise de aminoácidos das frações aquosa, 2a e 3a se encontram na Tabela XII. Alguns aminoácidos se encontram em baixa concentração, não tendo sido possível obter sua análise quantitativa, sendo somente indicados. Não foi possível também quantificar o aminoácido de histidina presente, devido ao excesso de lisina. Aparentemente a fenilalanina está pouco representada nas frações, embora nas condições utilizadas seja eluída praticamente junto com a glicosamina. A análise revelou dois componentes ninhidrina-positivos não identificados um deles eluído antes da lisina (não sendo ornitina) e o outro após a prolina (não sendo hidroxiprolina).

Por razões de ordem técnica, não foi possível determinar os aminoácidos básicos nos picos 2a e 3a. Entretanto deve-se ressaltar que na fração aquosa há uma maior representação evidente de aminoácidos ácidos e básicos.

Efeito do complexo glicoproteico na aglutinação das células por con A

Verificou-se o efeito do complexo glicoproteico isolado de formas epimastigotas na reação de aglutinação dessas células por con A. Como se pode verificar na Tabela XIII, tanto a fração aquosa, como os picos 2a e 3a

inibem a reação em concentrações bastante baixas de carboidrato (em torno de 10 µg). Como controle desse experimento, uma vez que polieletrólitos também inibem a reação de aglutinação, verificou-se o efeito de RNA isolado de B. subtilis* nessa reação. Para tanto empregaram-se diferentes quantidades de RNA por ensaio (1,1; 2,2 e 44 µg). Embora se observe, na concentração máxima empregada, uma inibição de até 60%, essa inibição é totalmente aleatória no correr do tempo da reação. Esse controle foi realizado para afastar a possibilidade de que pequenas quantidades de RNA contaminantes da preparação pudessem ser responsáveis pela inibição da aglutinação.

* Gentilmente cedido por Bianca S.Z. Oller do Nascimento

TABELA I - Recuperação de formas tripomastigotas metacíclicas após tratamento de suspensões contendo porcentagens variáveis dessa forma por aglutinação diferencial com con A.

Tripomastigotas ¹ na cultura (%)	Recuperação de tripomastigotas (%)	Enriquecimento
11	39	1,7
11	30	2,4
11	19	3,4
11	25	3,6
11	33	4,7
11	11	1,8
14	68	5,2
14	85	4,6
14	58	4,8
14	52	5,2
16	42	2,1
16	44	2,7

¹ O número total de células (epimastigotas e tripomastigotas) foi determinado por contagem em câmara de Neubauer.

TABELA II - Conteúdo de açúcar em diferentes extratos de formas epimastigotas.

Amostra	Açúcar total ¹ (%)	Hexoses ² (%)	Ribose ³ (%)
1	14,58	6,05	2,68
2	13,41	5,97	2,89
3	12,51	5,77	2,02
4	16,21	6,69	2,70
Média	14,18	6,12	2,57

¹ Determinado pelo método de fenol-H₂SO₄ (em equivalentes de glicose)

² Determinado pelo método de antrona (em equivalentes de glicose)

³ Determinado pelo método de orcinol (em equivalentes de ribose)

As porcentagens são referidas à quantidade de proteína, considerada como 100%. Os dados apresentados correspondem à média de 2 a 4 determinações. O extrato de células foi obtido pelo tratamento com ultra-som de suspensões aquosas de formas epimastigotas, como descrito em Material e Métodos.

TABELA III - Recuperação em açúcar e proteína após extração fenólica do extrato de células epimastigotas

	Proteína		Açúcar total ²		Hexoses ³		Ribose ⁴	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Extrato ¹	6634,66	100	957,60	100	340,70	100	152,86	100
Solúvel								
(fração aquosa)	15,46	0,23	50,00	5,22	36,46	10,70	5,60	3,66
Insolúvel	0,63	0,01	4,59	0,48	1,94	0,57	-	-

¹ A partir de $1,3 \times 10^{12}$ células

² Determinado pelo método de $\text{Fenol-H}_2\text{SO}_4$ (equivalentes de glicose)

³ Determinado pelo método de antrona (equivalentes de glicose)

⁴ Determinado pelo método do orcinol (equivalentes de ribose)

Os dados apresentados correspondem à média de 4 - 8 determinações.

TABELA IV - Composição e recuperação de diferentes frações isoladas de formas epimastigotas por cromatografia da fração aquosa em DEAE-celulose.

Frações	Proteína		Açúcar total ¹		Hexoses ²		Ribose ³	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Aquosa	7,421	100	24,000	100	17,500	100	2,688	100
2a	0,271	3,6	1,426	5,95	0,875	5,00	0,174	6,47
3a	1,215	16,38	7,249	30,20	3,743	21,39	0,790	29,39

- 63 -

¹ Determinado pelo método de fenol-ácido sulfúrico (em equivalentes de glicose)

² Determinado pelo método de antrona (em equivalentes de glicose)

³ Determinado pelo método do orcinol (em equivalentes de ribose)

Os dados referem-se a média de 2 - 8 determinações. As frações 2a e 3a, derivadas da fração aquosa por cromatografia em DEAE-celulose, foram dessalificadas por filtração em Sefadex G-25 ou Bio-Gel P-6 antes das determinações.

TABELA V - Conteúdo relativo de carboidratos e proteína nas diferentes frações isoladas.

Frações	Proteína	Carboidrato	Proteína
	+		
	Hexoses		
	(mg)	(%)	(%)
Aquosa	24,90	70	30
2a	1,15	76	24
3a	4,96	75	25

Para a construção desta tabela utilizaram-se os dados obtidos na Tabela IV. A porcentagem foi estabelecida em relação ao total (proteína + carboidrato).

TABELA VI - Proporção das diferentes bandas Schiff positivas para as frações aquosa, 2a e 3a.

Bandas	Aquoso solúvel (%)	Pico 2a (%)	Pico 3a (%)
A	22	23	24
B	12	10	17
C	28	24	19
D	38	43	42

As bandas foram separadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida 10%, pH 7,2, na presença de 0,1% de SDS. As bandas açúcar-positivas reveladas pelo reagente de Schiff foram submetidas à densitometria (560 nm), sendo a área de cada banda calculada por planimetria. Os resultados da tabela são apresentados em relação a área total das quatro bandas, considerada como 100%. As bandas são numeradas de acordo com sua mobilidade no gel. A está mais próxima do polo negativo (menor mobilidade) e D mais próxima do polo positivo (maior mobilidade).

TABELA VII - Mobilidade relativa das bandas Schiff-positivas nas frações aquosa, 2a e 3a.

Bandas	Aquosa	Rm	
		2a	3a
A	0,26	0,23	0,20
B	0,33	0,31	0,28
C	0,39	0,36	0,33
D	0,84	0,82	0,78

O material foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, na presença de SDS 0,1%, pH 7,2. Após coloração com o reagente de Schiff, calculou-se a mobilidade de cada banda a partir da migração de azul de bromofenol, usado como indicador (Rm).

TABELA VIII - Composição relativa de carboidrato e proteí
na nas frações resultantes da eletroforese da
fração aquosa em gel de poliacrilamida.

Bandas	Área (cm ²)			
	Schiff ¹	Coloração ² dupla	Negro de ³ amido	Schiff/negro de amido
A	6,1	10,5	4,1	1,49
B ⁴	4,8	11,3	3,7	1,30
C	8,4	14,5	5,6	1,50
D	14,8	13,2	3,2	4,63

As áreas foram determinadas pelo perfil densitométrico a:

¹ 525 nm após coloração com o reagente de Schiff

² 525 nm após coloração dupla

³ 620 nm após coloração dupla, descontando-se a área obtida
a 620 nm com o reagente de Schiff

⁴ A área dessa banda é de difícil determinação em virtude da
superposição das bandas A e C

A fração aquosa (80 µg) foi submetida a eletroforese em gel
de poliacrilamida 10%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH
7,2 na presença de SDS 0,1%.

TABELA IX - Alteração da proporção nas bandas da fração aquosa após tratamento com pronase.

Bandas	Sem pronase		Com pronase	
	(área cm ²)	%	(área cm ²)	%
A	5,03	19,3	14,75	6,3
B	5,03	19,3	0,00	0,00
C	5,25	20,0	4,43	18,8
X	0,00	0,0	2,30	9,8
Y	0,00	0,0	3,38	14,3
D	10,85	41,7	12,00	50,8
Área Total	23,58	100,0	26,11	100,0

Os dados da tabela foram obtidos pela planimetria do perfil densitométrico a 560 nm do material da Fig. 22.

TABELA X - Proporção das bandas A, C e D nos picos obtidos por cromatografia da fração aquosa em coluna de Bio-Gel P-150, na presença de SDS.

Bandas	Picos		
	I	II	III
	(%)	(%)	(%)
A	48,8	35,9	5,1
B	-	-	-
C	44,1	59,8	7,0
D	7,1	4,3	87,9

Os dados apresentados na tabela foram obtidos pela eletrofo_{re}se em gel de poliacrilamida 10% em tampão fosfato de Na 0,1 M, pH 7,2 e SDS 0,1% de amostras dos picos I, II e III (67, 60 e 40 µg de açúcar, respectivamente). O material foi corado com o reagente de Schiff e a área de cada pico calculada após densitometria. Os resultados foram obtidos por comparação com a área total, em cada gel.

TABELA XI - Composição em carboidratos das frações aquosa, 2a e 3a.

Açúcares	Fração Aquosa (%)	Pico 2a (%)	Pico 3a (%)
Glicosamina ^a	19,95 (2)	5,29 (3)	19,62 (2)
Galactose ^a	48,04 (2)	25,90 (1)	10,90 (3)
Glicose ^a	0,31 (1)	3,46 (3)	3,70 (3)
Manose ^a	24,59 (2)	60,61 (3)	59,03 (2)
Xilose ^a	5,79 (1)	-	2,30 (1)
Ácido siálico ^b	1,32 (2)	4,74 (1)	4,45 (1)

^a Determinação quantitativa a partir de densitometria

^b Dosado pelo método de ácido tiobarbitúrico

() Número de determinações

Os dados da tabela são fornecidos em porcentagem de cada monossacarídeo em relação ao total de açúcar, em µg (incluindo o ácido siálico). A quantitatização de cada açúcar por densitometria foi extrapolada para 100 µg de amostra colocada no cromatograma. A cromatografia descendente foi feita em butanol-piridina-água (3:1:1) e corada com AgNO₃.

TABELA XII - Composição em aminoácidos das frações aquosa, 2a e 3a.

Aminoácidos	Frações		
	Aquosa	2a	3a
ASX ¹	3,11	2,00	2,22
THR	2,26	2,31	2,22
SER	1,37	0,77	0,89
GLX ¹	1,37	1,23	0,56
PRO	1,00	1,00	1,00
GLY	0,84	0,42	1,33
ALA	2,37	0,25	1,48
VAL	0,40	0,28	0,44
MET	0,06	0,15	-
ILU	0,11	0,18	+
LEU	0,14	0,20	+
TYR	+	+	-
PHE	+	+	-
LYS	4,68	ND	ND
HIS	+	ND	ND
ARG	0,74	ND	ND

¹ Ácido aspártico e/ou asparagina; ácido glutâmico e/ou glutamina

- não detectado

+ pouco representado

ND Não Determinado

As determinações foram feitas em analisador de aminoácidos, sendo apresentadas em relação ao aminoácido prolina, arbitrariamente escolhido como unitário.

TABELA XIII - Efeito de diferentes frações glicoproteicas na reação de aglutinação das células por con A.

Fração	Açúcar total ¹ (μ g)	Ribose ² (μ g)	Proteína (μ g)	% de Inibição
Aquosa	4,00	0,45	1,24	100
	10,00	1,12	3,09	91
	40,00	4,48	12,37	100
	80,00	8,96	24,74	100
2a	5,80	-	1,10	77
	11,50	-	2,19	89
	23,00	-	4,37	86
3a	10,25	-	1,72	92
	20,50	-	3,44	92

¹ Determinado pelo método de fenol-H₂SO₄ (em equivalentes de glicose)

² Determinado pelo método de orcinol (em equivalentes de ribose)

O experimento e a porcentagem de inibição seguem o descrito em Material e Métodos (inibidores da reação de aglutinação). Esta tabela é resultante da composição de experimentos separados, todos, no entanto, efetuados em condições bastante semelhantes.

FIGURAS

FIGURA 3 - Aglutinação de formas epimastigotas de T. cruzi.
As formas epimastigotas (2×10^8 células/ml) foram aglutina-
das com 0,7 µg/ml de con A (em cima). Abaixo veem-se for-
mas epimastigotas não aglutinadas.

FIGURA 4 - Porcentagem de aglutinação de formas epimastigotas em função do tempo. A porcentagem de aglutinação foi determinada segundo Material e Métodos. Células: $1,0 \times 10^8$ células/ml; con A: 1,5 µg/ml.

FIGURA 5 - Porcentagem de aglutinação das formas epimastigotas em função da concentração inicial de células. Esse gráfico foi obtido pela aglutinação de células provenientes de uma mesma cultura, a partir de diferentes concentrações de células, a saber (em número de células/ml): $1,2 \times 10^8$ (O); $0,9 \times 10^8$ (Δ); $0,7 \times 10^8$ ($\bullet$) e $0,4 \times 10^8$ ($\blacktriangle$).

FIGURA 6 - Porcentagem de aglutinação de formas epimastigotas, em função da concentração de con A. A concentração de con A utilizada é indicada pelos números em cima de cada curva. Células: 10^8 células/ml.

FIGURA 7 - Porcentagem de aglutinação de formas epimastigotas em diferentes tempos, em função da concentração de con A. A porcentagem de aglutinação foi calculada após 10 minutos ($\blacktriangle$), 20 minutos ($\bullet$) e 30 minutos (O) de reação, na presença de diferentes concentrações de con A. Células: 10^8 células/ml.

FIGURA 8 - Porcentagem de aglutinação das formas epimastigotas em função da idade da cultura. As células, nesse experimento, foram obtidas após três dias de crescimento a partir de inóculos diferentes provenientes de uma mesma cultura. O mesmo resultado foi obtido inoculando-se o mesmo número de células em diferentes dias, a partir de uma mesma cultura inicial. As células utilizadas no experimento foram provenientes de frascos contendo 3×10^6 células/ml (O), 60×10^6 células/ml (●) e 92×10^6 células/ml (Δ). com A utilizada: 1,5 µg/ml; células: $1,2 \times 10^8$ células/ml.

FIGURA 9 - Inibição da porcentagem de aglutinação das formas epimastigotas por monossacarídeos. A porcentagem de inibição foi calculada a partir de um tubo sem a adição de açúcares. α-metil-D-manose (O), D-manose (Δ), D-glicose (■), N-acetil-D-glicosamina (▲) e D-glicosamina (●). con A: 1,5 µg/ml; células: $1,0 \times 10^8$ células/ml.

FIGURA 10 - Porcentagem de aglutinação das células após tratamento com tripsina. As células foram incubadas com tripsina 0,001% por dois minutos (O) na presença de tampão Tris 0,01 M, pH 7,2 em NaCl 0,9%. Como controle, estão representadas na figura, células incubadas nas mesmas condições, na ausência de tripsina (▲) e células não incubadas (●). Concentração de con A: 1,5 µg/ml; número de células no experimento: 10^6 células/ml.

FIGURA 11 - Variação da aglutinação das células com a porcentagem de formas tripomastigotas metacíclicas na cultura. As células foram cultivadas em diferentes condições, obtendo-se diferentes densidades de tripomastigotas metacíclicas: 0% em meio LIT (O); 0% em meio HIL, pH 7,2 (●); 1,7% em meio HIL, pH 6,7 (▲) e 28% em meio HIL, pH 6,7 (Δ). com A: 0,75 µg/ml; células: $1,2 \times 10^8$ células/ml.

FIGURA -12 - Formas tripomastigotas sanguícolas na presença de con A. As formas sanguícolas (2×10^8 células/ml) foram tratadas com 75 $\mu\text{g/ml}$ de con A.

FIGURA 13 - Cromatografia da fração aquosa em coluna de DEAE-celulose. No caso específico, 3 mg da fração aquosa foram cromatografadas em coluna de DEAE-celulose (1,6 x 26 cm) e eluídas por fluxo gravitacional inicialmente com água e a seguir com um gradiente linear de NaCl (0,01 M a 2 M) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5. O fluxo da coluna foi de 60 ml/hora e o volume coletado de 2 ml/fração. A inclinação do gradiente, instalado a partir da fração 50, foi acompanhada por refratometria. Esse gráfico foi escolhido por conter um maior número de informações, condensadas no mesmo experimento. No gráfico estão representadas a quantidade total por fração de cada parâmetro medido: açúcar, dosado pelo método do fenol-ácido sulfúrico (●), ribose pelo método de orcinol (Δ) e absorbância a 260 nm (○). Não se apresentou a absorbância a 280 nm, que segue o perfil da absorbância a 260 nm, embora sempre menor.

FIGURA 14 - Cromatografia do pico 2 em coluna de Sefadex G-25. 1,5 mg do pico 2 foram submetidos a cromatografia em coluna de Sefadex G-25 (1,3 x 80 cm), por fluxo gravitacional, usando-se água como eluente, à razão de 80 ml/hora. O volume coletado foi de 2,5 ml/fração. O volume vazio da coluna, correspondente à fração 17, foi determinado com azul de dextrana (1 mg em 1 ml). A eluição do sal foi acompanhada por refratometria; o material açúcar-positivo foi verificado pelo método de fenol-ácido sulfúrico (●), enquanto a absorbância das frações foi verificada a 260 nm (O) e a 280 nm (Δ). Os resultados são apresentados em quantidade total por fração, para cada um dos parâmetros medidos.

FIGURA 15 - Cromatografia do pico 3 em coluna de Bio-Gel P-6. 2 mg de açúcar do pico 3 foram cromatografadas em coluna de Bio-Gel P-6 (1,3 x 80 cm), por fluxo gravitacional, utilizando-se água como eluente, à razão de 90 ml/hora. O volume coletado foi de 2,1 ml por tubo. O volume vazio da coluna, correspondente à fração 16, foi determinado com azul de dextrana (1 mg em 1 ml de água). A eluição do sal foi acompanhada por refratometria e o açúcar por dosagem pelo método do fenol-ácido sulfúrico (●). A absorbância das frações foi acompanhada a 260 nm (O) e a 280 nm (Δ). No gráfico estão representadas quantidades totais por fração.

FIGURA 16 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações aquosa, 2a e 3a. A eletroforese em gel de poliacrilamida 5% foi realizada em tampão Tris-Glicina, pH 8,7, por 3 horas a 4°C, na ausência de SDS. Cada gel, contendo 80 µg de uma dada fração, foi corado com o reagente de Schiff, segundo Material e Métodos. A migração é do topo do gel (polo negativo) para o fundo (polo positivo). A posição do azul de bromofenol, utilizado como marcador, está determinada pelo fio de cobre no gel (mais próximo do polo positivo). Estão representadas na figura: fração aquosa (a); pico 2a (b) e pico 3a (c).

-101-

FIGURA 17 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das frações aquosa, picos 2a e 3a. A eletroforese em gel de poliacrilamida 10% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e SDS 0,1%, foi realizada segundo Material e Métodos. Cada gel, contendo de 80-85 µg de açúcar da fração aquosa, pico 2a ou 3a foi corado com o reagente de Schiff. A migração é do topo do gel (polo negativo) para o fundo (polo positivo). Como na figura anterior, a posição do corante azul de bromofenol está marcada com um fio de cobre. Na figura são mostrados: fração aquosa (a), pico 2a (b) e pico 3a (c).

FIGURA 18 - Perfil densitométrico da fração aquosa. A fração aquosa (85 μ g de açúcar) foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e SDS 0,1%, segundo Material e Métodos. O gel foi submetido a densitometria após coloração com o reagente de Schiff, e após coloração dupla (isto é, após coloração do mesmo gel com negro de amido). As condições, de densitometria empregadas foram: escala relativa de absorbância: entre 0 - 1,0; fenda do aparelho: 0,05; velocidade do papel: 5,08 cm/minuto; velocidade do gel: 1 cm/minuto. O gráfico apresentado corresponde à densitometria no sentido do topo (polo negativo) para o fundo do gel (polo positivo) a 560 nm (—) após coloração com o reagente de Schiff e a 620 nm (---) após coloração dupla.

FIGURA 19 - Perfil densitométrico da fração 2a. A legenda é a mesma da figura anterior, exceto pela aplicação, nesse caso, de 80 µg de açúcar no gel. A absorbância do gel, por densitometria no sentido do topo para o fundo do gel, foi verificada a 560 nm (—) e a 620 nm (---).

FIGURA 20 - Perfil densitométrico da fração 3a. A legenda é a mesma da figura 18. A absorbância do gel (no sentido do topo para o fundo do gel) foi verificada a 560 nm (—) e a 620 nm (---).

FIGURA 21 - Fração aquosa tratada com pronase. A fração aquosa (80 μ g de açúcar) foi tratada com pronase (4 mg/ml durante 36 horas a 37°C, em tampão fosfato 5 mM, pH 7,5, na presença de clorofórmio). A enzima pronase (10 mg/ml), no mesmo tampão, foi previamente incubada por 15 minutos, entre 75 - 80°C. O resíduo formado foi retirado por centrifugação. Depois do tratamento enzimático o material foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, na presença de SDS 0,1% e corado com o reagente de Schiff. Uma amostra da fração aquosa (80 μ g) submetida ao mesmo tratamento, na ausência de pronase, é apresentada para comparação. Fração tratada com pronase (a); fração não tratada (b).

-111-

FIGURA 22 - Perfil densitométrico da fração aquosa tratada com pronase. Esse perfil foi obtido pela densitometria de cada gel da figura anterior. As condições de densitometria utilizadas foram: escala relativa de absorbância: 0 - 1,5; fenda - 0,05; velocidade do papel - 5,08 cm/min; velocidade do gel - 1 cm/minuto. Essa figura foi composta pelo perfil densitométrico a 560 nm da fração aquosa tratada com pronase (—) e da fração não incubada com a enzima (---).

FIGURA 23 - Cromatografia da fração aquosa em coluna de Bio-Gel P-150 na presença de SDS. A fração aquosa (4 mg em açúcar) em 1,5 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, na presença de SDS 0,1% e 2-mercaptoetanol 0,14 M, foi aquecida a 100°C por 2 minutos, antes de cromatografada em coluna de Bio-Gel P-150 (2 x 80 cm), na presença do mesmo tampão e SDS 0,1%. O volume vazio (correspondente à fração número 16) foi determinado com azul de dextrana. O volume coletado foi de 2,3 ml/fração; o fluxo da coluna foi de 3 ml/hora, a 24°C. Após a eluição da fração aquosa, submeteu-se citocromo c às mesmas condições cromatográficas, sendo recuperado, em concentração máxima, na fração 23. A eluição do material da coluna foi acompanhado por dosagem de açúcar pelo método de fenol-ácido sulfúrico (●), além da absorbância a 260 nm (O) e 280 nm (Δ), apresentados no gráfico em quantidade total/fração.

FIGURA 24 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações obtidas por cromatografia em coluna de Bio-Gel P-150 da fração aquosa, na presença de SDS. As frações (I, II e III) da figura anterior foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% e submetidas à eletroforese em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, na presença de SDS 0,1%. A seguir foram coradas com o reagente de Schiff. A migração é do topo do gel (polo negativo) para o fundo (polo positivo). Também nesse caso a migração eletroforética do corante azul de bromofenol é evidenciada por um fio de cobre.

-117-

FIGURA 25 - Perfil densitométrico do pico I. 50 µg do pico I foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida nas condições da figura 24. As condições utilizadas para a obtenção desse perfil foram as mesmas das outras densitometrias, exceto pela escala de absorbância relativa do aparelho, selecionada entre 0 - 2,0 e da absorbância do material Schiff-positivo ser acompanhada a 525 nm, ao invés de 560, usualmente empregado. A absorbância a 525 nm (—), após coloração com o reagente de Schiff e a 620 nm (---), após coloração dupla foi verificada pela densitometria do gel no sentido do polo negativo para o positivo.

FIGURA 26 - Perfil densitométrico do pico II. A legenda é a mesma da figura anterior, exceto pela quantidade de material açúcar-positivo empregado, que nesse caso foi de 45 μ g. Foi medida a absorbância a 525 nm (—) e a 620 nm (---), no sentido do topo (polo negativo) para o fundo do gel (polo positivo).

FIGURA 27 - Perfil densitométrico do pico III. A legenda é a mesma da figura 25, exceto pela quantidade de açúcar empregada, que no caso foi de 36 μg . Foi medida a absorbância do gel a 525 nm (—) e a 620 nm (---), também no sentido do polo negativo para o positivo.

FIGURA 28 - Determinação do peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida das bandas da fração aquosa. A eletroforese da fração aquosa em diferentes concentrações de acrilamida (5; 7,5; 10 e 15%) foi realizada na presença de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e SDS 0,1% e corada com o reagente de Schiff, nas condições usuais. Paralelamente, submeteram-se várias proteínas de peso molecular conhecido às mesmas condições (segundo Material e Métodos). O peso molecular de cada banda, para dada concentração de gel, foi calculada a partir da curva obtida pela migração dessas proteínas. Banda A (O); B (●); C (Δ) e D (□).

FIGURA 29 - Variação da mobilidade eletroforética com a concentração de gel de poliacrilamida. Nessa figura são apresentadas as variações da mobilidade eletroforética (M) com a concentração de gel, representada por T (acrilamida + N,N'-metilenobisacrilamida) para proteínas padrão, de peso molecular conhecido (parte a da figura) e para as bandas da fração aquosa (parte b). Os dados utilizados para a construção dessa figura são os mesmos do experimento da figura anterior. A mobilidade eletroforética foi medida em relação ao corante azul de bromofenol, considerado como unitário. Parte a da figura: albumina do ovo ($\square$); quimo tripsinogênio A (O); mioglobina (Δ); citocromo c ($\bullet$). Parte b: banda A (O); banda B ($\bullet$); banda C ($\square$); banda D ($\blacksquare$).

FIGURA 30 - Cromatografia em papel dos açúcares constituintes da fração aquosa. A fração aquosa foi hidrolisada em diferentes condições de tempo e concentração de HCl, a 100°C. O material foi cromatografado em butanol-piridina-água (3:1:1), por 30 horas e revelado com nitrato de prata. Na figura, os açúcares mais próximos dos números correspondem aos de maior migração nesse sistema de solventes, aparecendo em sequência (de maior para menor migração): ribose, manose, glicose, galactose e glicosamina. A mancha de Rf menor que a glicosamina que aparece na figura não apareceu em inúmeros cromatogramas realizados nas mesmas condições. É de se notar também que essa mancha não apresentou diferenças quantitativas, nas diversas condições de hidrólise do experimento. Por isso ela foi considerada um contaminante não identificado dessa preparação particular. Os números apresentados no topo da figura correspondem às seguintes condições de hidrólise: HCl 2 N, 1 hora (1); HCl 2 N, 3 horas (2); HCl 4 N, 3 horas (3); HCl 4 N, 4 horas (4); HCl 4 N, 5 horas (5).

FIGURA 31 - Cromatografia em papel dos açúcares componentes da fração aquosa. A fração aquosa foi hidrolisada em HCl 2 N, por 2 horas, a 100°C e submetida a cromatografia descendente em butanol-piridina-água (3:1:1) por 30 horas. A seguir foi corada com nitrato de prata. Na figura, a origem do cromatograma é delimitada com um traço. Foram colocados no cromatograma padrões de monossacarídeos (P) e diferentes concentrações da amostra (dosada pelo método de fenol-ácido sulfúrico): 20 µg (a); 40 µg (b) e 60 µg (c). Os padrões correspondem a: glicosamina (1); galactose (2); glicose (3); manose (4); xilose (5) e ribose (6).

P

a

b

c

6

5

4

3

2

1

4

FIGURA 32 - Cromatografia em papel dos açúcares componentes do pico 2a. A legenda é a mesma da figura anterior, exceto pela quantidade de amostra colocada: 40 μ g (a); 60 μ g (b) e 90 μ g (c). Os padrões (P) utilizados são: glicosamina (1); galactose (2); glicose (3); manose (4); xilose (5) e ribose (6).

a

b

c

P

FIGURA 33 - Cromatografia em papel dos açúcares componentes do pico 3a. A legenda é a mesma da figura 31, exceto pela quantidade de amostra colocada: 40 μ g (a); 70 μ g (b) e 10 μ g (c). Os padrões (P) utilizados são: glicosamina (1); ga lactose (2); glicose (3); manose (4); xilose (5) e ribose (6).

DISCUSSÃO

Os resultados mostram que as formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi são aglutinadas por baixas concentrações de concanavalina A. Essa aglutinação não ocorre, mesmo em altas concentrações de lectina, com as formas tripomastigotas metacíclicas e sanguícolas. Essa diferença de comportamento sugere fortemente uma diferença na superfície celular das diversas formas de diferenciação dos tripanossomos. Devem ainda ser feitos experimentos com o intuito de se conhecer a natureza dessa diferença, uma vez que as formas tripomastigotas, embora não aglutináveis, também podem se ligar a con A. Nesse sentido, casos semelhantes já foram descritos (ver Introdução). O estudo da interação entre tripanossomos e con A ligada a iodo radioativo ou a fluoresceína poderia resolver essa questão. Convém salientar que as formas epimastigotas são aglutinadas por preparações de fímbrias de E. coli K-12 (resultados não apresentados). Essas fímbrias aglutinam superfícies que apresentam resíduos de manose terminal (SALTON, M.R.J., comunicação pessoal). Con A também interage, além de outros açúcares, com resíduos terminais de manose. Essas observações sugerem de imediato a possibilidade, embora altamente especulativa, de que durante a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas a superfície celular tenha sido modificada em seus resíduos de manose. Esses açúcares da superfície celular geralmente estão

associados a glicoproteínas e a glicolipídios, ambos capazes de interagir com con A, observados os requisitos necessários (ver Introdução). Embora a participação de glicolipídios nesse processo não possa ser afastada, ela é, remota, pois essas moléculas não foram detectadas em Trypanosoma cruzi, L. donovani, C. fasciculata (HACK, YAEGER & McCAFFEY, 1962) e Leptosomas collosoma (HUNT & ELLAR, 1974). Convém salientar que uma diferença na superfície celular entre formas epimastigotas e tripomastigotas já havia sido sugerida pela lise diferencial das células quando em contato com soro de diversos animais (MUNIZ & BORRIELLO, 1945).

A aglutinação de formas epimastigotas com con A nunca é completa, pois como demonstram os experimentos 20-30% das células permanecem no sobrenadante. Os resultados mostram que a resposta à lectina é proporcional ao tempo e à sua concentração, a partir de uma determinada densidade de células. É o que poderia ser esperado se o fenômeno for de natureza cooperativa. Consequentemente a explicação mais simples para a não aglutinação de uma minoria das células de uma população seria a de que após aglutinação da maior parte, as que restaram estão abaixo da concentração crítica para uma aglutinação efetiva. Falam a favor dessa interpretação os resultados obtidos: a) células abaixo da densidade de 10^8 /ml respondem mal à adição de lectina; b) células remanescentes de uma aglutinação efetiva, quando concentradas, passam a aglutinar após a adição de con A. Entretanto não se pode excluir a possibilidade de que algumas das células epimastigotas não aglutinadas por con A

estejam refletindo uma heterogeneidade da população. Essa sub-população, se existir, talvez seja passível de isolamento, como no caso de outros sistemas celulares (GOTTLIEB, SKINNER & KORNFELD, 1974). Além disso outras duas possibilidades poderiam estar ocorrendo: a) a diferença entre aglutinação e não aglutinação poderia ser de caráter transitório em virtude de uma diferença fisiológica momentânea, como já foi demonstrado em fibroblastos, que se aglutinam diferencialmente quando em interfase ou em mitose (SHOHAM & SACHS, 1974); b) essa diferença poderia estar refletindo o aparecimento de células na população que, embora com características morfológicas idênticas às daquelas das formas epimastigotas, já estivessem comprometidas com a diferenciação. Um corolário dessa especulação seria a de que modificações na superfície celular seriam um dos primeiros eventos a se instalar durante a diferenciação. Essas hipóteses deverão ser exploradas no futuro.

As evidências de que o material isolado das formas epimastigotas sejam glicoproteínas são: a) co-purificação de carboidratos e aminoácidos, particularmente demonstrada nos experimentos de eletroforese em gel de poli-acrilamida e filtração em gel de poliacrilamida; b) alteração do padrão eletroforético por tratamento da substância com pronase.

Essas glicoproteínas foram fracionadas em 3 componentes em colunas de DEAE-celulose (Figura 13), sendo que somente o material eluído por gradiente salino, nas

condições utilizadas, foi obtido em quantidade suficiente para uma tentativa de caracterização (picos 2 e 3). Esses picos foram cromatografados em coluna de Sefadex G-25 ou Bio-Gel P-6 e eluídos no volume vazio da coluna (picos 2a e 3a). Nos dois casos o material é eluído juntamente com certa quantidade de RNA (em torno de 10%).

Os dois picos, assim como a fração aquosa, são constituídos de ácido siálico, glicosamina, galactose, glicose e manose, além de xilose, encontrada na fração aquosa e no pico 3a. Embora esse monossacarídeo não tivesse sido detectado no pico 2a, sua presença não pode ser totalmente excluída, pois pode estar presente em quantidades aquém da sensibilidade do método empregado para a sua detecção. Entre os dois picos isolados há uma variação quantitativa na composição de açúcares, encontrando-se aproximadamente duas vezes mais galactose e quatro vezes menos glicosamina no pico 2a em relação ao 3a (Tabela XI). Os açúcares detectados em formas epimastigotas são usualmente encontrados em glicoproteínas isoladas de outras células. Não foi detectada a presença de ácidos urônicos na preparação, indicando a ausência de mucopolissacarídeos contendo esse ácido. É interessante notar que não foi possível, numa das etapas iniciais desse trabalho, determinar a presença de mucopolissacarídeos sulfatados em formas epimastigotas de T. cruzi.*

* Essa fase do trabalho foi feita em colaboração com o Dr. C. P. Dietrich, a quem agradecemos.

A presença de mucopolissacarídeos sulfatados havia sido correlacionada com a iniciação e controle da divisão celular (LIPPMAN, 1965). No entanto a ausência desses mucopolissacarídeos parece não ser fato tão incomum, não tendo sido encontrados na superfície celular de T. brucei (WRIGHT & HALES, 1970).

O estudo da composição de aminoácidos da fração aquosa mostra uma predominância dos aminoácidos lisina, ácido aspártico (e/ou asparagina), alanina, treonina, ácido glutâmico (e/ou glutamina), serina, prolina e glicina (Tabela XII). Embora as frações 2a e 3a tenham praticamente a mesma composição qualitativa nos aminoácidos analisados, observam-se algumas diferenças relativas entre os dois picos, como no ácido glutâmico (e/ou glutamina), duas vezes mais no pico 2a, e na glicina e alanina, três e seis vezes mais, respectivamente, no pico 3a.

Embora a análise quantitativa dos açúcares na da possa dizer quanto ao número de componentes moleculares da fração aquosa ou das frações 2a e 3a, em virtude da microheterogeneidade comum às glicoproteínas, os resultados da quantitatização dos aminoácidos, sugerem uma heterogeneidade do complexo isolado.

De fato, são várias as indicações de que as glicoproteínas isoladas estejam formando complexos. O material migra como banda única de alto peso molecular em eletroforese em gel de poliacrilamida, fornecendo quatro componentes quando a amostra é tratada com SDS. Também

se obtém diminuição da banda única pelo tratamento da amostra, com uréia 8M e Triton X-100, 0,1%, com o aparecimento de novas bandas menores. O tratamento da amostra com 2-mercaptoetanol não produz qualquer alteração no complexo, sob o ponto de vista de migração eletroforética. Esses resultados sugerem que o complexo glicoproteico isolado seja formado de subunidades, sem ligação covalente entre elas. O alto conteúdo de aminoácidos ácidos e básicos existentes na molécula poderia sugerir, além de outras forças, a existência de interações eletrostáticas entre as moléculas. A propriedade de aglutinação das glicoproteínas é um fenômeno bastante conhecido em soluções aquosas (MORAWIECKI, 1964), mesmo na presença de SDS (AZUMA, JANADO & ONODERA, 1973; JANADO, AZUMA & ONODERA, 1973; TUECH & MORRISON, 1974). Esses trabalhos, aliados à observação da existência de precipitação da fração aquosa com o tempo e à variação da proporção obtida entre os picos 2 e 3 em diferentes colunas de DEAE-celulose, sugerem a existência de um processo dinâmico de agregação. Os padrões praticamente idênticos das bandas da fração aquosa, pico 2a e 3a em eletroforese em gel de poliacrilamida parecem reforçar essa idéia. Poderíamos ter então, agregados aleatórios entre espécies diferentes de glicoproteínas que seriam separados pela resina de troca iônica, em virtude da maior ou menor representação de um ou mais componentes.

Mesmo que essa hipótese seja a mais correta, é difícil ainda predizer o número de glicoproteínas existentes. A mobilidade eletroforética obtida pelo "Ferguson

plot", na presença de SDS, praticamente idêntica para os componentes A, B e C (Figura 29) sugeriria uma diferença devida tão somente ao peso molecular e não a uma ligação diferente do SDS (MARTON & GARVIN, 1973; TUECH & MORRISON, 1974). Teríamos então a seguinte situação: o complexo glicoproteico original (fração aquosa) seria formado de um agregado de duas espécies moleculares, bem como as frações 2a e 3a. Uma dessas espécies seria representada pela banda D na eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e a outra espécie estaria formando, nas mesmas condições, sub-agregados que seriam representados pelas bandas A, B e C. Situação análoga a essa existe para dois componentes glicoproteicos isolados de eritrócitos humanos (MARTON & GARVIN, 1973). O intervalo de peso molecular entre as diversas bandas identificadas na presença de SDS é bastante próximo ($A = 26-28 \times 10^3$; $B = 18-24 \times 10^3$; $C = 16-20 \times 10^3$), tornando necessário admitir-se que a molécula fundamental na formação desses hipotéticos sub-agregados tivesse um peso molecular de no máximo 8×10^3 ou menor. Essa hipótese terá que ser verificada tentando-se dissociar ainda mais os possíveis componentes das frações A, B e C. Entretanto, deve-se ter em mente que a determinação do peso molecular de glicoproteínas é bastante difícil (ver Resultados), o que torna a sugestão feita acima sujeita a uma verificação mais precisa. Além disso é necessário considerar a possibilidade de de degradação de moléculas durante a extração, embora tenha-se utilizado um método considerado relativamente

brando. Nesse contexto é preciso ressaltar que formas epimastigotas possuem razoável atividade proteásica endógena (CAMARGO, E.P., comunicação pessoal).

Os problemas acima discutidos poderão ser elucidados, com o isolamento e a caracterização das quatro frações, por cromatografia em coluna de Bio-Gel P-150 na presença de SDS ou de outro agente dissociante. Essa metodologia parece promissora pois, através dela, já foi possível obter a fração D com 88% de pureza em relação às outras frações e, o que é muito importante, eliminar o remanescente da contaminação por ácidos nucleicos. Os resultados da cromatografia em coluna e da eletroforese em gel de poliacrilamida são bastante sugestivos de que essa glicoproteína esteja praticamente pura (Figuras 23 e 27).

Não é possível, no momento, comparar o material isolado com o complexo polissacarídeo-proteína imunologicamente ativo descrito por GONÇALVES & YAMAHA (1969). Embora na análise geral existam diferenças significativas, como a proporção relativa de cada monossacarídeo e na composição qualitativa de aminoácidos (como, por exemplo, a treonina não encontrada pelos autores citados e presente em quantidades apreciáveis nas frações glicoproteicas), o complexo polissacarídeo-proteína descrito pode estar contido numa das frações isoladas neste trabalho. Essa comparação somente poderá ser feita após análise quantitativa de carboidratos e aminoácidos das frações isoladas do complexo.

Também é prematura qualquer tentativa de implicação dessas glicoproteínas isoladas com antígenos da célula, apesar da fração aquosa, mesmo após tratamento com pronase e em baixas concentrações (a partir de 50 µg) ter demonstrado capacidade de fixar complemento.* Esse aspecto não foi suficientemente explorado pois preferimos aguardar a purificação das glicoproteínas para realizar os experimentos imunológicos. Nesse sentido é bom lembrar que a purificação poderá fornecer os componentes individuais do complexo. No entanto, é possível que a atividade biológica, como foi demonstrado em casos anteriores (LAVER & VALENTINE, 1969), esteja associada ao complexo, em vez de residir nos seus componentes individualizados.

Levando-se em consideração que as glicoproteínas foram isoladas a partir de extrato total de células epimastigotas, não é possível no momento, saber-se a sua localização celular. Entretanto, experimentos não relatados neste trabalho sugerem que elas se localizam no sistema particulado da célula. Essa fração particulada, obtida pela centrifugação do extrato celular a 100000 xg, fornece por eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, pelo menos cinco frações contendo carboidratos. Dessas frações quatro delas aparentemente coincidem com as frações isoladas. Além disso, o fato das glicoproteínas da fração aquosa inibirem, em concentrações rela

* A fração aquosa foi entregue ao Dr. M.E. Camargo do Instituto de Medicina Tropical que, muito gentilmente, realizou esses experimentos.

tivamente baixas, a aglutinação das formas epimastigotas por con A, sugere que as glicoproteínas pertençam à superfície celular. É óbvio que essa evidência é circunstancial pois qualquer material contendo monossacarídeos passíveis de ligação à con A seriam capazes de inibir o fenômeno de aglutinação. Esse problema será esclarecido pelo isolamento e caracterização da membrana celular das formas epimastigotas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-ABBASSY, S.N.; SEED, T.M. & KREIER, J.P. (1972) - Isolation of the trypomastigote form of Trypanosoma cruzi from a mixture of the trypomastigote and epimastigote forms of the parasite by use of a DEAE-cellulose column. J. Parasitol. 58, 631-32.
- ALLAN, D.; AUGER, J. & CRUMPTON, M.J. (1972) - Glycoprotein receptors for concanavalin A isolated from pig lymphocyte plasma membrane by affinity chromatography in sodium deoxycholate. Nature New Biol. 236, 23-25.
- ALLSOPP, B.A.; NJOGU, A.R. & HUMPHRIES, K.C. (1971) - Nature and location of Trypanosoma brucei subgroup exo-antigen and its relationship to 4S antigen. Exp. Parasitol. 29, 271-84.
- ARMELIN, H.A. (1974) - Controle do crescimento celular em mamíferos. Células em cultura como modelo experimental. Tese. Universidade de São Paulo.
- AUTUORI, F.; SVENSSON, H. e DALLNER, G. (1974) - Relationship of protein-bound sialic acid to microsomal membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 1023-30.
- AZUMA, J-I; JANADO, M. & ONODERA, K. (1973) - Heterogeneity of a human erythrocyte membrane glycoprotein. J. Biochem. 73, 1127-30.
- BALDUINI, C.; BALDUINI, C.L. & ASCARI, E. (1974) - Membrane glycopeptides from old and young human erythrocytes. Biochem. J. 140, 557-60.

- BANKER, G.A. & COTMAN, C.W. (1972) - Measurement of free electrophoretic mobility and retardation coefficient of protein-sodium dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis. A method to validate molecular weight estimates. J. Biol. Chem. 247, 5856-61.
- de BERNARD, B.; PUGLIARELLO, M.C.; SANDRI, G.; SOTTOCASA, G.L. & VITTUR, F. (1971) - Glycoprotein components, sialic acid and hexosamines, bound to inner and outer mitochondrial membranes. FEBS Lett. 12, 125-28.
- BOSSMANN, H.B. & MARTIN, S.S. (1969) - Mitochondrial autonomy: incorporation of monosaccharides into glycoprotein by isolated mitochondria. Science 164, 190-92.
- BOURRILON, R.; MICHON, J. & GOT, R. (1959) - La copule glucidique de la gonadotropine du sérum de jument gravidе. Bull. Soc. Chim. Biol. 41, 493-502.
- BRACK, C. (1968) - Elektronmikroskopische untersuchungen zum lebenszyklus von Trypanosoma cruzi. Unter besonderer berücksichtigung der entwicklungsformen im überträger Rhodnius prolixus. Acta trop. 25, 289-356.
- von BRAND, T.; McMAHON, P.; TOBIE, E.J.; THOMPSON, M.J. & MOSETTIG, E. (1959) - Chemical composition of the culture form of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasitol 8, 171-81.
- BRENER, Z. (1973) - Biology of Trypanosoma cruzi. Ann. Rev. Microbiol. 27, 347-82.
- BURGER, M.M. (1969) - A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells. Proc. Nat. Acad. Sci., US 62, 994-1001.

- BURGER, M.M. (1973) - Surface changes in transformed cells detected by lectins. Fed. Proc. 32, 91-101.
- BURGER, M.M. & NOONAN, K.D. (1970) - Restoration of normal growth by covering of agglutinin sites on tumour cell surface. Nature 228, 512-15.
- CÁCERES, O. (1973) - Alterações no metabolismo de carboidratos durante o crescimento e diferenciação do Trypanosoma cruzi "in vitro". Tese. Universidade de São Paulo.
- CAMARGO, E.P. (1964) - Growth and differentiation in Trypanosoma cruzi. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 6, 93-100.
- CARRAWAY, K.L.; SHIN, B.C.; HUDSON, B.G. & EBNER, K.E. (1974) - Membrane glycoproteins from the normal lactating mammary gland and the R 3230 AC mammary tumor. Fed.Proc. 33, 1226.
- CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L.V. & FERNANDES, J.F. (1967) - Differentiation of Trypanosoma cruzi in culture. J. Protozool. 14, 447-51.
- CHAGAS, C. (1909) - Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen. n. sp., agente atilológico de nova entidade mórbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1, 159-218.
- CHARNEY, J. & TOMARELLI, R.M. (1947) - A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. J. Biol. Chem. 171, 501-05.
- CLINE, M.J. & LIVINGSTON, D.C. (1971) - Binding of ³H-concanavalin A by normal and transformed cells. Nature New Biol. 232, 155-56.

- COSGROVE, W.B. (1971) - The cell cycle and cell differentiation in trypanosomatids. In: Developmental aspects of the cell cycle. (I.L. Cameron; G.M. Padilla & A.M. Zimmerman, eds.). vol. I Academic Press, New York, London. pp. 1-21.
- CROSS, G.A.M. (1972) - Identification and isolation of surface coat proteins from Trypanosoma brucei. J. Protozool. 19, Supplement, 46.
- CURTOIS, Y. & HUGHES, R.C. (1974) - Glycoproteins of chick embryo fibroblasts in cultures with a finite life span. Eur. J. Biochem. 44, 131-38.
- DAVIS, B.J. (1964) - Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-27.
- DEANE, M.P. (1968) - O agente etiológico. In: Doença de Chagas. (J.R. Cançado, ed.) pp. 22-49. Belo Horizonte.
- DEANE, M.P. (1969) - On the life cycle of trypanosomes of the lewisii group and their relationship to other mammalian trypanosomes. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 11, 34-43.
- DEANE, M.P. & KIRCHNER, E. (1963) - Life-cycle of Trypanosoma conorhini. Influence of temperature and other factors on growth and morphogenesis. J. Protozool. 10, 391-99.
- DISCHE, Z. (1955) - Color reactions of nucleic acids components. In: The Nucleic Acids I. (E. Chargaff & J.N. Davidson, eds.). Academic Press, Inc. Publishers. New York. p. 285.

- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. (1956) - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350-56.
- DWYER, D.M. (1974) - Lectin binding saccharides on a parasitic protozoan. Science 184, 471-73.
- ECKHART, W.; DULBECCO, R. & BURGER, M.M. (1971) - Temperature-dependent surface changes in cells infected or transformed by a thermosensitive mutant of polyoma virus. Proc. Nat. Acad. Sci., US 68, 283-86.
- EDELMAN, G.M. (1974) - Surface alterations and mitogenesis in lymphocytes. In: Control of proliferation in animal cells. (E. Clarkson & R. Baserga, eds.). Vol. I. Spring Harbor Laboratory. New York. pp. 357-77.
- EDELMAN, G.M.; CUNNINGHAM, B.A.; REEKE, Jr. G.N.; BECKER, J.W.; WAXDAL, M.J. & WANG, J.L. (1972) - The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. Proc. Nat. Acad. Sci., US 69, 2580-84.
- EDELMAN, G.M. & MILLETTE, C.F. (1971) - Molecular probes of spermatozoan structures. Proc. Nat. Acad. Sci., US 68, 2436-40.
- FAIRBANKS, G.; STECK, T.L. & WALLACH, D.F.H. (1971) - Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry 10, 2606-16.
- FERGUSON, K.A. (1964) - Starch-gel electrophoresis-application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. Metabolism 13, 985-1002.

- FERNANDES, J.F. & CASTELLANI, O. (1966) - Growth characteristics and chemical composition of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasitol. 18, 195-202.
- FIFE, Jr. E.H. & KENT, J.F. (1960) - Protein and carbohydrate complement fixing antigens of Trypanosoma cruzi. Am. J. Trop. Med. 9, 512-17.
- GALAMBOS, J.T. (1967) - The reaction of carbazole with carbohydrates. II. Effect of borate and sulfamate on the ultraviolet absorption of sugars. Anal. Biochem. 19, 133-43.
- GILES, K.W. & MYERS, A. (1965) - An improved diphenylamine method for the estimation of DNA. Nature 206, 93.
- GOLDBERG, S.S. (1974) - Cinética do transporte de arginina e lisina em formas de cultura das amostras Y₇₇¹¹ e MR₄₄¹¹ do Trypanosoma cruzi. Tese. Universidade Federal de Minas Gerais.
- GOLDSTEIN, I.J.; HOLLERMAN, C.E. & MERRICK, J.M. (1965) - Protein-carbohydrate interaction. I. The interaction of polysaccharides with concanavalin A. Biochim. Biophys. Acta 97, 68-76.
- GOLDSTEIN, I.J.; HOLLERMAN, C.E. & SMITH, E.E. (1965) - Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of concanavalin A with polysaccharides. Biochemistry 4, 876-83.
- GOLDSTEIN, I.J. & IYER, R.N. (1966) - Interaction of concanavalin A, a phytohemagglutinin, with model substrates. Biochim. Biophys. Acta 121, 197-200.

- GONÇALVES, J.M. & YAMAHA, T. (1969) - Immunochemical polysaccharide from Trypanosoma cruzi. J. Trop. Med. Hyg. 72, 39-44.
- GOTTLIEB, M.; LANZETTA, P.A. & BERECH, Jr. J. (1972) - Crithidia fasciculata: characterization of polysaccharide. Exp. Parasitol. 32, 206-10.
- GOTTLIEB, C.; SKINNER, S.A.M. & KORNFELD, S. (1974) - Isolation of a clone of Chinese Hamster ovary cells deficient in plant lectin-binding sites. Proc. Nat. Acad. Sci., US 71, 1078-82.
- GOTTSCHALK, A. (1972) - Glycoproteins. Their composition, structure and function. Elsevier Publishing Company. Amsterdam, London, New York.
- GRAY, A.R. (1965) - Antigenic variation in a strain of Trypanosoma brucei transmitted by Glossina morsitans and G. palpalis. J. gen. Microbiol. 41, 195-214.
- HACK, M.H.; YAEGER, R.G. & McCAFFERY, T.D. (1962) - Comparative lipid biochemistry. II. Lipids of plant and animal flagellates, a non-motile alga, an amoeba and a ciliate. Comp. Biochem. Physiol. 6, 247-52.
- HAKOMORI, S.I. & MURAKAMI, W.T. (1968) - Glycolipids of Hamster fibroblasts and derived malignant-transformed cell lines. Biochemistry 59, 254-61.
- HARTREE, E.F. (1972) - Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Biochem. 48, 422-27.
- HEATH, E.C. (1971) - Complex polysaccharides. Ann. Rev. Biochem. 40, 29-56.

- HOARE, C.A. (1972) - The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications. Oxford, Edinburg.
- HOLLENBERG, M.D. & CUATRECASAS, P. (1974) - Hormone receptors and membrane glycoproteins during in vitro transformation of lymphocytes. In: Control of Proliferation in Animal Cells. (B. Clarkson & R. Baserga, eds.). Vol. I. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. pp. 423-34.
- HOLLEY, R.W. (1974) - Serum factors and growth control. In: Control of proliferation in animal cells. (B. Clarkson & R. Baserga, eds.) Vol. I. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, pp. 13-18.
- HOUGH, L.; JONES, J.K.W. & WADMAN, W.H. (1950) - Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part V. Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatogram. J. Chem. Soc. (1950) 1702-06.
- HSU, D.S.; HOFFMAN, P. & MASHBURN, Jr. T.A. (1974) - Fractionation of chondroitin sulfate and determination of molecular weight by polyacrylamide gel electrophoresis. Biochim. Biophys. Acta 338, 254-64.
- HUGHES, R.C. (1973) - Glycoproteins as components of cellular membranes. Prog. Biophys. Mol. Biol 26, 189-268.
- HUNT, S. (1970) - Glycoproteins. In: Polysaccharide-protein complexes in invertebrates. Academic Press. London, New York. pp. 179-214.

- HUNT, R.C. & ELLAR, D.J. (1974) - Isolation of the plasma membrane of a trypanosomatid flagellate: general characterization and lipid composition. Biochem. Biophys. Acta 339, 173-89.
- INBAR, M.; BEN-BASSAT, H. & SACHS, L. (1971) - A specific metabolic activity on the surface membrane in malignant cell-transformation. Proc. Nat. Acad. Sci., US 68, 2746-51.
- INBAR, M. & SACHS, L. (1969 a) - Structural difference in sites on the surface membrane of normal and transformed cells. Nature 223, 710-12.
- INBAR, M. & SACHS, L. (1969 b) - Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin A with normal and transformed cells. Proc. Nat. Acad. Sci., US 63, 1418-25.
- JANADO, M.; AZUMA, J-I & ONODERA, K. (1973) - Reversible aggregation of a human erythrocyte membrane glycoprotein. J. Biochem. 74, 881-87.
- JANSONS, V.K. & BURGER, M.M. (1973) - Isolation and characterization of agglutinin receptor sites. II. Isolation and partial purification of a surface membrane receptor for wheat germ agglutinin. Biochim. Biophys. Acta 291, 127-35.
- JEANLOZ, R.W. (1966) - α_1 -Acid glycoprotein. In: Glycoproteins. (A. Gottschalk, ed.) Elsevier Publishing Company. Amsterdam, London, New York. pp. 362-94.
- JERMYN, M.A. & ISHERWOOD, F.A. (1949) - Improved separation of sugars on the paper partition chromatogram. Biochem. J. 44, 402-07.

- KASHING, D.M. & KASPER, C.B. (1969) - Isolation, morphology, and composition of the nuclear membrane from rat liver. *J. Biol. Chem.* 244, 3786-92.
- KEENAN, T.W.; FRANKE, W.W. & KARTENBECK, J. (1974) - Concanavalin A binding by isolated plasma membranes and endomembranes from liver and mammary gland. *FEBS Lett.* 44, 274-78.
- KLEINSCHUSTER, S.J. & MOSCONA, A.A. (1972) - Interactions of embryonic and fetal neural retina cells with carbohydrate-binding phytohemagglutinins: cell surface changes with differentiation. *Exptl. Cell Res.* 70, 397-410.
- KOCHERT, G. & YATES, I. (1974) - Purification and partial characterization of a glycoprotein sexual inducer from *Volvox carteri*. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 71, 1211-14.
- KORN, E.D. & WRIGHT, P.L. (1973) - Macromolecular composition of an amoeba plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 248, 439-47.
- KUBÁNEK, J.; ENTLICHER, G. & KOCOUREK, J. (1973) - Studies on phytohemagglutinins. XIII. A phytohemagglutinin receptor from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 304, 93-102.
- LAVER, W.G. & VALENTINE, R.C. (1969) - Morphology of the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of Influenza virus. *Virology* 38, 105-19.
- LEJOHN, H.B. & CAMERON, L.E. (1973) - Cytokinins regulate calcium binding to a glycoprotein from fungal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 1053-60.

- LEJOHN, H.B. & STEVENSON, R.M. (1973) - Cytokinins and magnesium ions may control the flow of metabolites and calcium ions through fungal cell membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 1061-66.
- LI, Y-T; LI, S-C & SHETTLAR, M.M. (1968) - Isolation of glycopeptides from rat liver microsomes involved in the biosynthesis of plasma glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 243, 656-65.
- LIPPMAN, M. (1965) - A proposed role for mucopolysaccharides in the initiation and control of cell division. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 27, 342-60.
- LIS, H. & SHARON, N. (1973) - The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). *Ann. Rev. Biochem.* 42, 541-74.
- MAIZEL, Jr. J.V. (1966) - Acrylamide-gel electrophorograms by mechanical fractionation radioactive adenovirus proteins. *Science* 151, 988-90.
- MARCHESI, V.T.; JACKSON, R.L.; SEGREST, J.P. & KAHANE, I. (1973) - Molecular features of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane. *Fed. Proc.* 32, 1833-37.
- MARTINEZ-PALOMO, A.; GONZALEZ-ROBLES, A. & de la TORRE, M. (1973) - Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced con A. *Nature New Biol.* 245, 186-87.
- MARTON, L.S.G. & GARVIN, J.E. (1973) - Subunit structure of the major human erythrocyte glycoprotein: depolymerization by heating ghosts with sodium dodecyl sulfate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 1457-62.

- MENZIES, I.S. (1973) - Quantitative estimation of sugars in blood and urine by paper chromatography using direct densitometry. *J. Chromatog.* 81, 109-27.
- MENZIES, I.S. & SEAKINS, J.W.T. (1969) - Sugars. In: *Chromatographic and electrophoretic techniques*. vol. 1 (I. Smith, ed.). William Heinemann - Medical Books Ltd., 3a. ed. pp. 310-29.
- MILDER, R.V. (1971) - Contribuição ao conhecimento da ultra-estrutura de tripanossomos. Tese. Universidade de São Paulo.
- MILLER, J.K. (1965) - Variation of the soluble antigens of *Trypanosoma brucei*. *Immunology* 9, 521-28.
- MIYAJIMA, N.; TOMIKAWA, M.; KAWASAKI, T. & YAMASINA, I. (1969) - Chemical composition of membranous fractions of rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 66, 711-31.
- MONTGOMERY, R. (1970) - Glycoproteins. In: *The carbohydrates. Chemistry/Biochemistry*. (W. Pigman & D. Horton, eds.) Vol. IIB. Academic Press Inc. pp. 627-709.
- MORAWIECKI, A. (1964) - Dissociation of M- and N- group mucoproteins into subunits in detergent solutions. *Biochim. Biophys. Acta* 83, 339-47.
- MORELIS, R. & LOUISOT, P. (1973) - Biosynthèse des glycoprotéines dans les mitochondries. 1. Étude de l'activité mannosyl-transférerase mitochondriale. *Biochimie* 55, 671-77.
- MOSCONA, A.A. (1971) - Embryonic and neoplastic cell surfaces: availability of receptors for concanavalin A and wheat germ agglutinin. *Science* 171, 905-07.

- MOSCONA, A.A. (1973) - Cell agregation. In: Cell Biology in Medicine. (E.E. Bittar, ed.) John Wiley & Sons. New York, London, Sydney, Toronto. pp. 571-91.
- MUNIZ, J. & BORRIELLO, A. (1945) - Estudo sobre a ação lítica de diferentes soros sobre as formas de cultura e sanguícolas de "*Schizotrypanum cruzi*". Rev. Bras. Biol. 5, 563-76.
- MUNIZ, J. & FREITAS, G. (1944) - Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. II. Isolamento de seu comportamento nas reações de precipitação, de fixação de complemento e de hipersensibilidade. Os "tests" de floculação (sublimado e formol-gel). Rev. Bras. Biol. 4, 421-38.
- NEUBERGER, A. & MARSHALL, R.D. (1966) - Methods for the qualitative and quantitative analysis of the component sugars. In: Glycoproteins- their composition, structure and function. (A. Gottschalk, ed.) Elsevier Publishing Company. Amsterdam, London, New York. pp. 190-234.
- NEVA, A.F.; MALONE, M.F. & MYERS, B.R. (1961) - Factors influencing the intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in vitro. Am. J. Trop. Med. Hyg. 10, 140-149.
- NEWTON, B.A.; CROSS, G.A.M. & BAKER, J.R. (1973) - Differentiation in trypanosomatidae. In: Microbial differentiation. Published for the Society for General Microbiology at the University Press. pp. 339-73.
- NICOLSON, G.L. (1971) - Difference in the topology of normal and tumor cell membranes as shown by different distributions of ferritin-conjugated concanavalin A on their surfaces. Nature New Biol. 233, 244-46.

- NICOLSON, G.L. (1972) - Topography of membrane concanavalin A sites modified by proteolysis. *Nature New Biol.* 239, 193-97.
- NICOLSON, G.L. (1974) - Factors influencing the dynamic display of lectin binding sites on normal and transformed cell surfaces. In: Control of proliferation in animal cells. (B. Clarkson & R. Baserga, eds.) Vol. I. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. pp. 251-70.
- NICOLSON, G.; LACOREIÈRE, M. & DELMONTE, P. (1972) - Outer membrane terminal saccharides of bovine liver nuclei and mitochondria. *Exptl. Cell Res.* 71, 468-73.
- NJOGU, A.R. & HUMPHRIES, K.C. (1972) - The nature of the 4S antigens of the brucei subgroup trypanosomes. *Exp. Parasitol.* 31, 178-87.
- NJOGU, A.R.; ITAZI, O.K.; ENYARU, J.C. & ABONGA, L. (1974) - Direct evidence that the 4S (surface) antigens are located on the outer surface of the Trypanosoma brucei subgroup cell membrane. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 68, 147-48.
- NOONAN, K.D.; RENGIER, H.C.; BASILICO, C. & BURGER, M.M. (1973) - Surface changes in temperature-sensitive simian virus 40-transformed cells. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 70, 347-49.
- OPPENHEIMER, S.B. & ODENCRANTZ, J. (1972) - A quantitative assay for measuring cell agglutination: agglutination of sea urchin embryo and mouse teratoma cells by concanavalin A. *Exptl. Cell Res.* 73, 475-80.

- OZANNE, B. & SAMBROOK, J. (1971) - Binding of radioactively labelled concanavalin A and wheat germ agglutinin to normal and virus-transformed cells. *Nature New Biol.* 232, 156-60.
- PARTRIDGE, S.M. (1948) - Filter-paper partition chromatography of sugars. 1. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and foetal blood of sheep. *Biochem. J.* 42, 238-50.
- PETERSON, E.A. (1970) - Cellulosic ion exchangers. In: *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. (T.S. Work & E. Work, eds.). Vol. 2 North-Holland Publishing Company. Amsterdam, London. pp. 287-96.
- PODOLSKY, D.K.; WEISER, M.M.; la MONT, J.T. & ISSELBACHER, K.J. (1974) - Galactosyl-transferase and concanavalin A agglutination of cells. *Proc. Nat. Acad. Sci., US* 71, 904-08.
- PORETZ, R.D. & GOLDSTEIN, I.J. (1970) - An examination of the topography of the saccharide binding sites of concanavalin A and of the forces involved in complexation. *Biochemistry* 9, 2890-96.
- REYNOLDS, J.A. & TANFORD, C. (1970) - The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.* 245, 5161-65.
- RISTIC, M. & TRAGER, W. (1958) - Cultivation at 37°C of a trypanosome (*Trypanosoma theileri*) from cows with depressed milk production. *J. Protozool.* 5, 146-48.

- ROSEN, S.D.; KAFKA, J.A.; SIMPSON, D.L. & BARONDES, S. H.
(1973) - Developmentally regulated, carbohydrate-binding protein in Dictiostelium discoideum. Proc. Nat. Acad. Sci., US 70, 2554-57.
- SEGREST, J.P. & JACKSON, R.L. (1972) - Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. In: Methods in Enzymology 28. (V. Ginsburg, ed.). Academic Press. New York, London, pp. 54-63.
- SHARON, N. & LIS, H. (1972) - Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science 177, 949-59.
- SHIRAHAMA, K.; TSUJII, K. & TAKAGI, T. (1974) - Free-boundary electrophoresis of sodium dodecyl sulfate-protein polypeptide complexes with special reference to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biochem. 75, 309-19.
- SHOHAM, J. & SACHS, L. (1974) - Differences in lectin agglutinability of normal and transformed cells in interphase and mitosis. In: Control of proliferation in animal cells. (B. Clarkson & R. Baserga, eds.). Vol. I. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. pp. 297-304.
- SILVA, L.H.P. & CAMARGO, E.P. (1968) - Ciclo evolutivo do Trypanosoma cruzi. In: Doença de Chagas. (J.R. Cançado, ed.). Belo Horizonte. pp. 87-99.
- SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. (1953) - Sobre uma cêpa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin. et Biol. 20, 191-208.

- SIMPSON, L. (1968) - The leishmania-leptomonad transformation of Leishmania donovani: nutritional requirements, respiral changes and antigenic changes. J. Protozool. 15, 201-07.
- SO, L.L. & GOLDSTEIN, I.J. (1968) - Protein-carbohydrate interaction. XIII. The interaction of concanavalin A with α -mannans from a variety of microorganism. J. Biol. Chem. 243, 2003-07.
- SOTTOCASA, G.L.; SANDRI, G.; PANFILI, E. & de BERNARD, B. (1971) - A glycoprotein located in the intermembrane space of rat liver mitochondria. FEBS Lett. 17, 100-05.
- SPIRO, G.S. (1966) - Analysis of sugars found in glycoproteins. In: Mehtods in Enzymology 8. (E.F. Neufeld & V. Ginsburg, eds.). Academic Press. New York, London, pp. 3-26.
- SPIRO, R.G. (1970) - Glycoproteins. Ann. Rev. Biochem. 39, 599-638.
- STEIGER, R. (1971) - Some aspects of the surface coat formation in Trypanosoma brucei. Acta trop. 28, 341-46.
- STEINERT, M. (1958) - Action morphogénétique de l'urée sur le trypanosome. Exp. Cell Res. 15, 431-33.
- SUMNER, J.B. & HOWELL, S.F. (1936) - The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. J. Bacteriol. 32, 227-37.
- TARRANT, C.J.; FIFE, Jr. E.H. & ANDERSON, R.I. (1965) - Serological characteristics and general chemical nature of the in vitro exoantigens of T. cruzi. J. Parasitol. 51, 277-85.

- TKACZ, J.S.; CYBULKA, B.E. & LAMPEN, J.O. (1971) - Specific staining of wall mannan in yeast cells with fluorescein-conjugated concanavalin A. J. Bacteriol. 105, 1-5.
- TKACZ, J.S. & LAMPEN, J.O. (1972) - Wall replication in Saccharomyces species: use of fluorescein-conjugated concanavalin A to reveal the site of mannan insertion. J. gen. Microbiol. 72, 243-47.
- TREJOS, A.; GODOY, G.A.; GREENBLATT, C. & CEDILLOS, R. (1963) - Effects of temperature on morphologic variation of Schizotrypanum cruzi in tissue culture. Exp. Parasitol. 13, 211-18.
- TUECH, J.K. & MORRISON, M. (1974) - Human erythrocyte membrane sialoglycoproteins: a study of interconversion. Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 352-60.
- VICKERMAN, K. (1969) - On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. J. Cell. Sci. 5, 163-93.
- VICKERMAN, K. & LUCKINS, A.G. (1969) - Localization of variable antigens in the surface coat of Trypanosoma brucei using ferritin conjugated antibody. Nature 224, 1125-27.
- WARREN, L. (1959) - The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J. Biol. Chem. 234, 1971-75.
- WEBER, K. & OSBORN, M. (1969) - The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-12.
- WEEKS, G. (1973) - Agglutination of growing and differentiating cells of Dictyostelium discoideum by concanavalin A. Exptl. Cell Res. 76, 467-70.

- WEISER, M.M. (1972) - Concanavalin A agglutination of intestinal cells from the human fetus. *Science* 177, 525-26.
- WEITZ, B.G.F. (1960) - The properties of some antigens of Trypanosoma brucei. *J. gen. Microbiol.* 23, 589-600.
- WESTPHAL, O.; LÜDERITZ, O. & BISTER, F. (1952) - Über die extraktion von bakterien mit phenol/wasser. *Z. Naturforsch.* 7 b, 148-55.
- WHEAT, R.W. (1966) - Analysis of hexosamines in bacterial polysaccharides by chromatographic procedures. In: *Methods in Enzymology* 8. (E.F. Neufeld & V. Ginsburg, eds). Academic Press. New York, London, pp. 60-78.
- WINQVIST, L.; ERIKSSON, L.C. & DALLNER, G. (1974) - Binding of concanavalin A-sepharose to glycoproteins of liver microsomal membranes. *FEBS Lett.* 42, 27-31.
- WINTERBURN, P.J. & PHELPS, C.F. (1972) - The significance of glycosylated proteins. *Nature* 236, 147-51.
- WOODRUFF, J.J.; BERTRAM, M. & GESNER, M.D. (1969) - The effect of neuraminidase on the fate of transfused lymphocytes. *J. Exp. Med.* 129, 551-67.
- WRIGHT, K.A. & HALES, H. (1970) - Cytochemistry of the pellicle of bloodstream forms of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei. *J. Parasitol.* 56, 671-83.
- YARIV, J.; KALB, A.J. & LEVITZKI, A. (1968) - The interaction of concanavalin A with methyl- α -D-glucopyranoside. *Biochim. Biophys. Acta* 165, 303-05.
- YOSHIDA, N. (1974) - Estudos de meios de cultura simplificados para Trypanosoma cruzi. Tese. Universidade Federal de Minas Gerais.

SUMMARY

Epimastigote forms of T. cruzi are agglutinated by low con A concentrations. The agglutinability is linear up to 10 minutes. Under these conditions the agglutination is dependent on the con A concentration providing the cell density is 10^8 /ml or higher. The blood forms and culture trypomastigotes are not agglutinated by con A.

A glycoprotein complex was isolated from epimastigote forms of T. cruzi by aqueous phenol extraction. This complex is composed by sialic acid, glucosamine, galactose, glucose, mannose and xylose. The latter appears only in some fractions of the complex. The amino acids found are lysine, aspartic acid (and/or asparagine), alanine, threonine, glutamic acid (and/or glutamine), serine, proline and glycine. The glycoproteins render three components in DEAE-cellulose columns (peaks 1, 2 and 3). The peaks 2 and 3 are able to inhibit the agglutination of epimastigotes by con A. These fractions are separated in four glycoprotein components by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS.