BIANCA SILVANA ZINGALES OLLER DO NASCIMENTO

**ENVOLVIMENTO DA SUPERFÍCIE CELULAR DO
TRYPANOSOMA CRUZI NA INTERAÇÃO
PARASITA - CÉLULA HOSPEDEIRA**

**Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para o Concurso de Livre-Docência no
Departamento de Bioquímica**

**SÃO PAULO
1985**

Para Cesar, Rodrigo e Fernando
com carinho

Para Clara
com amizade

AGRADECIMENTOS

O trabalho descrito nesta tese é fruto da reflexão individual e da criação coletiva de um grupo que cresceu unido em torno de um sujeito - o Trypanosoma cruzi - e de um problema - a superfície do parasita e seu envolvimento no processo de interiorização. Ao espírito de colaboração e criatividade de cada membro deste grupo devo meus agradecimentos.

A Colli, pelo benefício do exemplo de seriedade científica, rigorosa e aberta ao mesmo tempo, e pelo respaldo constante que permitiu definir minhas opções em termos de pesquisa. A ele, Júlia e Marinei, o agradecimento especial por dividirmos a responsabilidade gratificante da formação deste grupo.

A Rosa, por seu entusiasmo e suas lições de química de açúcares; a Alejandro, por ter caracterizado as glicoproteínas e pelo prazer de trabalharmos juntos; a Norma, por ter instalado a linha de cultura de tecidos; a Vera, por estar sempre pronta a ajudar; a Núncio, por manter os camundongos infectados e por repartir comigo as bandas ABCD; a Grace, por sua seriedade e competência; a Clara, pelo bom-humor e apoio; a Marga, por sua serenidade; a Juan, futuro companheiro de clonagem.

A Dona Carmen, Cecília, Dona Lucinda e Clélia, por manter os vidros brilhantes, por preparar os cansativos meios de cultura e pelos infindáveis cafezinhos.

A Monika e Fro, que confiam em mim e que me ensinam a difícil missão de orientar, num diálogo constante de compreensão e de divisão de sucessos e insucessos.

A Carminha, que com muita simpatia e eficiência resolveu os problemas estéticos e gráficos da apresentação desta tese e do memorial.

A meus amigos Erasmo-Clara-Hernan-Carlos, pela riqueza de nossa relação.

À FAPESP, Organização Mundial da Saúde e CNPq/FINEP, pelo apoio financeiro imprescindível para a realização deste trabalho.

ABREVIATURAS

a.e. - atividade específica
Con A - concanavalina A
cpm - contagens por minuto
DEAE - dietilaminoetil
DME - Dulbecco's modified Eagle
dpm - desintegração por minuto
Kd - constante de dissociação
LCA - aglutinina de Lens culinaris
mCi - millicurie
p/v - peso por volume
PHA - fitohemaglutinina A
P.M. - peso molecular
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila
PNA - aglutinina de amendoim
SBA - aglutinina de soja
SDS - dodecilsulfato de sódio
SFB - soro fetal bovino
TCA - ácido tricloroacético
TLCK - N- α -tosil-L-lisilclorometilcetona
Tris - tris-(hidroximetil)-aminometano
v/v - volume por volume
x g - vezes a aceleração da gravidade
WGA - aglutinina de embrião de trigo

ÍNDICE

PÁG.

PREFÁCIO	1
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Ciclo celular e formas do parasita	3
1.2. Diferenças ultraestruturais e bioquímicas da superfície de diferentes estágios do <u>T. cruzi</u>	6
1.2.1. Glicoconjugados da superfície do <u>T. cruzi</u>	6
1.2.2. Suscetibilidade das formas à lise mediada por complemento	13
1.3. Diferenças biológicas e bioquímicas entre cepas de <u>T. cruzi</u>	19
2. INTERAÇÃO DO <u>TRYPANOSOMA CRUZI</u> COM FAGÓCITOS PROFISSIONAIS	32
3. INTERAÇÃO DO <u>TRYPANOSOMA CRUZI</u> COM FAGÓCITOS NÃO PROFISSIONAIS	35
3.1. Interiorização e ciclo intracelular do <u>Trypanosoma cruzi</u>	36
3.2. Papel da célula hospedeira na interiorização do <u>Trypanosoma cruzi</u>	38
3.3. <u>Trypanosoma cruzi</u> e sua interação com a célula hospedeira	40
3.3.1. Caracterização de um sistema de infecção <u>in vitro</u>	41
3.3.2. Análise das proteínas de superfície do <u>T. cruzi</u>	46
3.3.3. Análise das glicoproteínas da superfície do <u>T. cruzi</u>	48
3.3.4. Efeito de antisoros na interiorização de tripomastigotas - Análise de antígenos de superfície	55
3.3.5. Tratamento do tripomastigota com tripsina: efeito na interiorização e nos antígenos de superfície	64

3.3.6. Possível envolvimento de glicoproteínas na interação entre o <u>T. cruzi</u> e a célula hospedeira	69
3.3.7. Ácido siálico: participação na interiorização?	85
4. COMENTÁRIOS FINAIS	87
APÊNDICE - MATERIAL E MÉTODOS	92
1. Parasitas	93
2. Antisoros	93
3. Purificação de glicoconjugados	94
4. Marcação de componentes da superfície	96
5. Marcação metabólica	97
6. Isolamento de glicoproteínas de superfície	98
7. Imunoprecipitação	99
8. Eletroforese em gel	100
9. Interiorização do <u>T. cruzi</u> em células de mamífero	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

PREFÁCIO

Em março de 1983 fui convidada pelo Dr. Leslie Hudson a escrever uma revisão para o "Current Topics in Microbiology and Immunology" (Springer-Verlag) sobre a interação do Trypanosoma cruzi com a célula hospedeira. Aceitei e dividi esse desafio com o Dr. Walter Colli, escrevendo uma revisão que colocava no contexto da literatura mundial os resultados de nosso laboratório nos últimos 5 anos.

O manuscrito ficou pronto no final de 1983 e a primeira versão voltou para as nossas mãos em maio de 1984, ocasião em que adicionamos os resultados mais recentes nossos e de outros grupos.

Em março de 1985, finalmente chegou a prova definitiva para publicação. Nesse meio tempo havíamos feito mais coisas, novos dados deveriam ser adicionados à revisão e no entanto, não havia mais tempo nem espaço. Foi assim que tive a idéia de utilizar o manuscrito como base para escrever este trabalho, acrescentando os últimos resultados e ilustrando-o com figuras de experimentos publicados, por publicar, ou nunca publicados.

Há alguns meses vinha sentindo a necessidade de escrever esta Tese para consolidar uma etapa de minha carreira científica - a caracterização dos antígenos de superfície do Trypanosoma cruzi e para servir de ponto de partida para a inauguração de uma nova fase - a clonagem dos genes do parasita. A idéia de ter de escrever: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão me era extremamente desagradável uma vez que era impossível separar em itens estanques um processo de criação e produção que se estendeu ao longo de vários anos. As idéias, as hipóteses, a execução e os resultados se sucedem de maneira lógica, estando ligados aos dados que surgem na literatura, provenientes de outros laboratórios. Trabalhar sobre a Revisão já escrita, modificando-a, ampliando-a, ilustrando-a, tornando-a enfim mais pessoal e próxima foi a

forma agradável e gratificante que encontrei para escrever a tese na versão que ora apresento.

É óbvio que, para não perder clareza, a descrição da evolução de nossos resultados pessoais está entremeada com a análise de resultados de outros, inclusive de colegas de laboratório cuja participação no processo de criação global foi inestimável. Procurei, para dar o crédito devido e evitar confusões de autoria, citar sempre a contribuição de cada um no trabalho coletivo.

1. INTRODUÇÃO

O protozoário flagelado Trypanosoma cruzi (ordem Kinetoplastida) é o agente causador da Doença de Chagas. A Doença, predominantemente rural, afeta aproximadamente 12 a 15 milhões de pessoas na América Latina, das quais cerca de 8 milhões vivem no Brasil. Estima-se que 100 a 200 milhões de pessoas estão potencialmente expostas ao risco de infecção.

Classicamente o T. cruzi é transmitido por insetos da família Reduviidae (cf. Hoare, 1972), dos quais os gêneros mais representativos são o Panstrongylus, o Triatoma e o Rhodnius. A transfusão de sangue constitui outro mecanismo importante de transmissão da Doença de Chagas, provocando o aparecimento de 10.000 a 20.000 novos casos por ano no Brasil (Brener & Camargo, 1982). Vários relatos de transmissão congênita e via transplantares renais também existem. Em virtude do número crescente de laboratórios envolvidos com a pesquisa em Doença de Chagas, aumentou consideravelmente o número de cientistas que se infectam através da autoinoculação acidental com agulhas contaminadas ou pipetando cepas virulentas do T. cruzi (Brener, 1984).

Os aspectos relacionados com a epidemiologia, a imunidade e a imunopatologia da Doença podem ser encontrados em ótimas revisões (Brener, 1973; Teixeira, 1977; Colli, 1979; Brener, 1980; Brener & Camargo, 1982; De Souza, 1983; Scott & Snary, 1982; Colli et al. 1984).

1.1. Ciclo Celular e Formas do Parasita

Três formas principais dotadas de características morfológicas e biológicas distintas podem ser descritas para o T. cruzi. A característica morfológica utilizada como base para a classificação é a posição do flagelo em relação ao cinetoplasto e seu ponto de emergência no corpo do parasita (Hoare & Wallace, 1966).

1. A forma epimastigota apresenta o cinetoplasto justaposto ao núcleo e a base do flagelo próxima ao cinetoplasto.

flagelo emerge de um lado do corpo do parasita. Esta forma é encontrada no lúmen do tubo intestinal do inseto vetor, onde se multiplica por fissão binária. Os epimastigotas originam-se da diferenciação de tripomastigotas sanguícolas do hospedeiro vertebrado, que foram ingeridos pelo inseto durante a picada. Formas epimastigotas podem ser obtidas em larga escala em meio de cultura axênico indefinido. Em condições especiais (Dusanic, 1980; Chiari, 1981; Sher & Snary, 1982; Sher et al. 1983; Goldenberg et al. 1984) os epimastigotas podem sofrer diferenciação originando tripomastigotas, também chamados "metacíclicos", porém melhor classificados como tripomastigotas de meio axênico.

2. A forma amastigota é desprovida de flagelo externo. Esta é a forma de divisão do parasita encontrada no interior da célula do hospedeiro vertebrado. Após extensa multiplicação os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas, aproximadamente 24 horas antes da ruptura celular que os libera para o meio externo. O tripomastigota liberado é capaz de infectar uma nova célula, onde se diferencia na forma amastigota. Os amastigotas podem ser obtidos a partir do fígado e baço de animais infectados (Gutteridge et al. 1978), ou de certas linhagens celulares que produzem tripomastigotas e amastigotas extracelulares (Hudson et al. 1984) ou ainda em meio axênico (Pan, 1978; Villalta & Kierszenbaum, 1982).

3. A forma tripomastigota apresenta um cinetoplasto pós-nuclear, próximo do qual sai o flagelo. Este emerge de um lado do corpo do parasita, formando uma membrana ondulante. Os tripomastigotas aparecem no lúmen do reto do inseto sendo depositados com as fezes próximo ao local da picada. Como foi dito acima, os tripomastigotas podem originar-se da diferenciação dos epimastigotas (no vetor) ou dos amastigotas (no vertebrado). Em laboratório podem ser obtidos em meios axênicos especiais (tripomastigotas de meio axênico); no sobrenadante de células em cultura (tripomastigotas de cultura de tecidos) ou a partir do sangue de animais infectados (tripomastigotas sanguícolas).

Como dissemos acima, a caracterização de cada estágio evolutivo do parasita é feita basicamente através de seus

aspectos morfológicos, não havendo, no entanto, uma caracterização bioquímica adequada que permita dizer, por exemplo, se o tripomastigota metacíclico proveniente da diferenciação do epimastigota em meio axênico, corresponde ao tripomastigota metacíclico encontrado no tubo digestivo do inseto vetor. Ou ainda, se o tripomastigota sanguícola é igual ao tripomastigota de cultura de tecidos. Nesse sentido, alguns dados existentes na literatura tentam extrapolar conclusões experimentais obtidas com determinado estágio evolutivo para outro estágio, morfológicamente muito semelhante. Tendo este ponto em mente, tentaremos, ao longo deste trabalho, especificar sempre a fonte do parasita utilizada nos experimentos.

O ciclo biológico do T. cruzi é perpetuado por um lado, pela infestação do inseto com tripomastigotas sanguícolas de vertebrado e, por outro lado, pela infecção do vertebrado pelos tripomastigotas liberados pelo inseto vetor. Desta forma, os tripomastigotas incapazes de dividir-se, mas dotados de mecanismos de interiorização na célula do hospedeiro mamífero, constituem os elos genéticos que ligam as duas fases do ciclo celular do parasita.

A superfície da forma tripomastigota do T. cruzi deve desempenhar um papel fundamental na interiorização do parasita na célula hospedeira, evento primordial na infecção do vertebrado. As formas epimastigotas não infectam animais e não são interiorizadas em células de mamífero em cultura, exceção feita para os macrófagos que fagocitam e destroem estas formas. Considerando que as membranas da célula hospedeira e do tripomastigota são as primeiras organelas a interagir antes da interiorização do parasita, deve-se esperar que estas estruturas contenham componentes importantes para o reconhecimento, adesão e posterior interiorização do parasita na célula do mamífero. Além disto, a superfície celular do parasita assume uma importância imunológica fundamental uma vez que contém os antígenos que são reconhecidos logo no início da infecção pelo sistema imune do hospedeiro.

1.2. Diferenças Ultraestruturais e Bioquímicas da Superfície de Diferentes Estágios do T. cruzi

Ao se estudar o processo de interação parasita-célula hospedeira é de importância fundamental a análise das semelhanças e diferenças que os distintos estágios do parasita apresentam ao nível da membrana plasmática.

Estudos ultraestruturais da superfície do T. cruzi (De Souza, 1978) mostraram que: (a) o glicocálix de tripomastigotas sanguícolas apresenta uma espessura três vezes superior à de formas epimastigotas; (b) o número de partículas proteicas intramembranares é significativamente menor em tripomastigotas do que em epimastigotas; e (c) a carga de superfície de tripomastigotas é mais negativa que a de epimastigotas.

Diferenças entre os estágios do parasita foram também observadas frente à reatividade com distintas lectinas (Peireira et al. 1980; Araujo et al. 1980; Katzin & Colli, 1983). Foi demonstrado que formas epimastigotas e tripomastigotas apresentam receptores para Con A na superfície celular (Alves & Colli, 1974; Chiari et al. 1978), no entanto, apenas nas formas tripomastigotas observa-se uma mobilidade lateral destes receptores (Szarfman et al. 1980). Vários outros estudos apontam para uma maior fluidez da membrana da forma tripomastigota, dentre eles, os dados de Kloetzel & Deane (1977); Schmuñis et al. (1978, 1980); González-Cappa et al. (1980) mostram que tripomastigotas, ao contrário de epimastigotas, são capazes de fazer "patching" e "capping" de complexos antígenos de superfície-anticorpos, quando incubados a 37°C.

1.2.1. Glicoconjugados da superfície do T. cruzi

A membrana plasmática de formas epimastigotas contém um complexo de glicoconjugados que podem ser eletroforeticamente separados em quatro substâncias (bandas A, B, C, D) (Alves & Colli, 1975; Lederkremer et al. 1976; Alves et al. 1979). A banda D foi isolada e caracterizada como sendo uma glicofosfo-ceramida complexa, denominada LPPG (Lederkremer et al. 1977). Estas substâncias não foram encontradas em tripomastigotas (san

guícolas e de cultura de tecidos) ou em amastigotas (de baço), apesar de termos empregado diferentes enfoques experimentais para evidenciá-las (Zingales et al. 1982a).

Uma vez que o T. cruzi apresenta a característica de aderir fortemente à sua superfície macromoléculas contidas ou adicionadas ao meio de cultura (cf. Colli et al. 1981) foi imperativo demonstrar que os glicoconjugados do epimastigota eram componentes constitutivos. Em estudos de marcação metabólica com (^{14}C)-glicose mostramos que a LPPG e as bandas A, B, C eram de fato sintetizadas pelo parasita (Fig. 1) e que sua síntese não era afetada por inibidores de síntese proteica (cicloheximida) ou de glicosilação de resíduos de asparagina (tunicamicina) (Zingales et al. 1982a). Estudo análogo realizado com tripomastigotas e amastigotas confirmou a ausência destas substâncias, colocando um problema interessante de diferenciação celular.

A presença de bandas A, B, C na superfície celular do epimastigota foi evidenciada por oxidação de parasitas vivos com galactose oxidase, seguida por redução com borohidreto tritiado. A Fig. 2 mostra, por eletroforese gel de poliacrilamida, o padrão de marcação de epimastigotas totais (Fig. 2b), comparado com o padrão das bandas A, B, C purificadas e marcadas in vitro pela mesma técnica (Fig. 2a). O enriquecimento destas bandas em frações de membrana plasmática isoladas por vesiculação em pH ácido - fração V (Franco da Silveira et al. 1979) e por centrifugação diferencial-fração M (Zingales et al. 1979) pode ser visto na Fig. 2c e Fig. 2d, respectivamente.

A LPPG não se marca por esta técnica em virtude da estrutura furanósica dos resíduos de galactose (Lederkremer et al. 1980). Sua marcação, no entanto, pode ser conseguida (juntamente com a marcação das bandas A, B, C) por oxidação suave de epimastigotas com metaperiodato, seguida por redução com borohidreto tritiado. Na Fig. 3 compara-se a marcação de epimastigotas através desta técnica (Fig. 3a,b) com o perfil obtido por tratamento com galactose oxidase- NaB^3H_4 (Fig. 3c,d). A preincubação dos parasitas por 12 h com 2 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina não altera o padrão dos glicoconjugados de superfície (Fig. 3b,d).

Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (8-15%) de lisados de epimastigotas marcados metabolicamente com (^{14}C)-glucose. Maiores detalhes podem ser encontrados nos itens 5.5 e 8.1 de Material e Métodos.

Figura 2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (8-15%) de amostras marcadas com NaB^3H_4 via galactose oxidase. (a) Bandas A, B, C purificadas, marcação in vitro; (b) lisado de epimastigotas, marcação in vivo; (c) fração V de membrana plasmática, marcação in vitro; (d) fração M de membrana plasmática, marcação in vitro. Detalhes no item 4.2 de Material e Métodos.

Na Fig. 3 além das bandas A, B, C e da LPPG nota-se a presença de um outro componente (banda E) de alta migração e letroforética e fortemente oxidado por metaperiodato. Uma vez que a técnica de marcação utilizada foi originalmente descrita para evidenciar a presença de ácido siálico em glicoconjugados (Liao et al. 1973), passou-se a analisar a natureza da banda E de epimastigotas. Utilizando-se um protocolo descrito para a extração de gangliosídeos, isolou-se esta banda (Fig. 4). A purificação deste composto em colunas de sílica gel levou à obtenção de dois picos, A e B (Fig. 5) que após tratamento com neuraminidase mostraram, respectivamente, uma perda de 30% e 18% da radioatividade total (Confalonieri et al. 1983). Por cromatografia em papel confirmou-se a presença de ácido siálico substituído no material liberado por neuraminidase (Fig. 6).

A presença de ácido siálico em glicolipídios da superfície de epimastigotas corrobora dados de Schauer et al (1983), que demonstram a existência de ácido N-acetil e N-glicolil neuramínico em extratos totais de diferentes cepas (forma epimastigota) do T. cruzi. Além disso, dados anteriores de Pereira et al. (1980) mostram a aglutinação destas formas por lectina de embrião de trigo, que apresenta afinidade por N-acetil glicosamina e ácido siálico. O tratamento de epimastigotas com neuraminidase abole a aglutinação observada. Nesse mesmo trabalho (Pereira et al. 1980) relata-se que formas tripomastigotas sanguíneas e de meio axênico não são aglutinadas pela lectina de embrião de trigo, sendo pouco reativas à lectina de Limulus polyphemus (específica para ácido siálico). Esses dados sugerem uma distribuição diferencial qualitativa e/ou quantitativa de glicolipídios e/ou de glicoproteínas ricas em ácido siálico nos dois estágios de diferenciação do parasita.

Em vários sistemas celulares os sialoglicolipídios estão implicados em fenômenos de reconhecimento. Por esse motivo, passou a ser importante caracterizar melhor esses compostos em T. cruzi. Em trabalho recente (Lederkremer et al. 1985) demonstramos que a forma epimastigota é capaz de incorporar ácido (³H)-palmítico e (³H)-galactose na LPPG e em pelo menos dois glicosfingolipídios. Na Fig. 7 mostra-se, por eletrofo-

Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (8-15%) de epimastigotas marcados in vivo com NaB^3H_4 após oxidação com metaperiodato de sódio (a,b) ou galactose oxidase (c,d). Parasitas controle (a,c); parasitas pré-incubados 12 horas com 2 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina antes da marcação (b,d). Detalhes nos itens 4.2 e 4.3 de Material e Métodos.

Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (8-15%) de epimastigotas marcados com NaB^3H_4 após oxidação com metaperiodato de sódio. (a) lisado de epimastigotas; (b) material insolúvel em C/M (2:1, v/v) (notar as bandas A-D); (c) fase inferior da partição com KCl 0,1 N do extrato C/M (2:1); (d) extrato C/M (2:1) das células liofilizadas; (e) fase superior da partição com KCl 0,1 N do extrato C/M (2:1) (notar a Banda E). Para os detalhes experimentais ver os itens 3.3 e 4.3 de Material e Métodos.

rese em gel de poliacrilamida-SDS, que as bandas A, B, C marcaram-se fortemente com (^3H)-galactose (Fig. 7a,c), enquanto apenas a LPPG e a banda E incorporam ácido (^3H)-palmítico (Fig. 7b,d,e).

A banda E marcada com ácido palmítico foi resolvida em dois componentes por cromatografia bidimensional em camada delgada (Fig. 8), esses componentes contêm esfinganina e esfingenina. Sua sensibilidade à neuraminidase favorece uma estrutura do tipo gangliosídeo (cf. Lederkremer et al. 1985).

Estudos de marcação metabólica com ambos os precursores foram realizados por nós com a forma tripomastigota de cultura de tecidos (cepa Y) (Couto et al. 1985). Também neste caso, observamos a incorporação de ácido palmítico e de galactose em glicolipídios e sua sensibilidade à neuraminidase. Uma análise comparativa das frações de glicolipídios de epimastigotas e tripomastigotas por cromatografia em camada delgada pode ser vista na Fig. 9. Observações preliminares parecem sugerir haver diferenças qualitativas entre os componentes dos dois estágios do parasita. Um estudo mais profundo deverá ser feito para caracterizar quimicamente e para quantificar esses compostos. Além disto, será interessante determinar a topologia desses glicolipídios, para tentar explicar as observações de Pereira et al. (1980) sobre a reatividade diferencial de epimastigotas e tripomastigotas frente a lectinas específicas para ácido siálico.

1.2.2. Suscetibilidade das formas à lise mediada por complemento

Formas epimastigotas são prontamente lisadas por soro normal de hospedeiros naturalmente resistentes ou suscetíveis ao T. cruzi (Muniz & Borriello, 1945). Essa lise é mediada pelo sistema complemento e ocorre pela via alternativa (Nogueira et al. 1975). As formas tripomastigotas são lisadas pelo sistema complemento apenas quando apresentam anticorpos ligados à sua superfície (Krettli et al. 1979). A resistência do tripomastigota à lise por complemento se deve à existência de moléculas reguladoras da ativação desse sistema na sua

Figura 5 - Cromatografia em coluna de sílica gel H do extrato C/M (2:1) de epimastigotas marcados com metaperiodato/ NaB^3H_4 . Dimensão da coluna: 2,5 x 20 cm. Volume de cada fração: 3 ml. Radioatividade total introduzida: 180.000 dpm; radioatividade total coletada no Pico A: 100.000 dpm e no Pico B: 60.000 dpm. As setas indicam a proporção de clorofórmio:metanol utilizada para a eluição. Detalhes experimentais no item 3.4 de Material e Métodos.

Figura 6 - Cromatografia em papel da fase superior da extração C/M (2:1, v/v) do Pico A (painel superior) e do Pico B (painel inferior) tratados com neuraminidase. Os Picos A e B foram obtidos conforme descrito na legenda da Fig. 5. O tratamento com neuraminidase está descrito no item 3.4 de Material e Métodos. A cromatografia foi desenvolvida conforme especificado no item 3.5. As setas indicam a posição dos marcadores: NANA, ácido N-acetil neuramínico; NANA₇, NANA oxidado; ARA, arabinose.

Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (8-15%) de (a) Bandas A, B, C purificadas a partir de epimastigotas marcados metabolicamente com (^3H)-galactose; (b) LPPG extraída a partir de epimastigotas marcados com ácido (^3H)-palmítico; (c) fração insolúvel em C/M (2:1, v/v) de epimastigotas marcados com (^3H)-galactose; (d) o mesmo que em (c) só que marcados com ácido (^3H)-palmítico; (e) fração extraída com C/M (2:1) de epimastigotas marcados com ácido (^3H)-palmítico. Detalhes nos itens 5.3 e 5.4 de Material e Métodos.

Figura 8 - Identificação de aminoalcoóis de cadeia longa. Inserto: fluorografia da cromatografia bidimensional em camada delgada dos sialoglicolipídios de epimastigotas (detalhes no item 3.7 de Material e Métodos). A seta indica o ponto de aplicação; a primeira dimensão foi realizada para cima e a segunda, da esquerda para a direita. Os compostos X e Y (do Inserto) foram extraídos independentemente, hidrolisados com HCl concentrado/metanol/água (3:29:4) e cromatografados em placas de sílica gel, conforme descrito no item 3.8 de Material e Métodos. Painel a: produto do composto X; Painel b: produto do composto Y. Os padrões aplicados foram: (1) fitoesfingosina; (2) eritrodihidroesfingosina; (3) esfingosina.

Figura 9 - Cromatografia unidimensional de glicolipídios de T. cruzi. Os eluatos de C/M (2:1, v/v) de colunas de ácido silícico (ver item 3.6. de Material e Métodos) foram cromatografados em placas de sílica gel desenvolvidas com n-propanol/ NH_4OH 28%/água (75:5:5, v/v/v). conforme descrito no item 3.7. (a) glicolipídios de epimastigotas marcados com ácido (^3H)-palmítico; (b) glicolipídios de tripomastigotas marcados como em (a); (c) glicolipídios de tripomastigotas marcados com NaB^3H_4 /galactose oxidase; (d) glicolipídios de tripomastigotas marcados com (^3H)-galactose. Detalhes das marcações nos itens 4.2; 5.3; 5.4 de Material e Métodos.

superfície celular. O tratamento enzimático dos tripomastigotas com tripsina ou neuraminidase remove estas moléculas e possibilita a lise direta dos parasitas, sem anticorpo, após a ativação da via alternada (via C3) do complemento (Kipnis et al. 1981).

1.3. Diferenças Biológicas e Bioquímicas Entre Cepas de T. cruzi

O T. cruzi representa um conjunto de populações que circulam no homem, insetos transmissores, reservatórios silvestres e animais domésticos. Na prática, qualquer isolado obtido a partir de um hospedeiro naturalmente infectado poderia ser denominado cepa. Deve-se ressaltar, no entanto, que a definição microbiológica clássica não se aplica integralmente para o T. cruzi, uma vez que nesses protozoários nunca foi descrita uma renovação do genoma através de processos sexuais. Hoare (1972) prefere definir cada membro da população como sendo, de fato, um clone.

Estudos realizados com isolados de T. cruzi mostram uma enorme variação nos parâmetros de crescimento, morfologia de formas sanguíneas, virulência, capacidade de induzir lesões, suscetibilidade a quimioterápicos, constituição antigênica e infectividade para células hospedeiras (cf. Zingales & Colli, 1985).

A questão da variabilidade entre as cepas do T. cruzi assume uma importância epidemiológica e médica enorme, uma vez que foi sugerida uma correlação entre a cepa do parasita que predomina em determinada região geográfica e a forma clínica que a Doença de Chagas assume. Além disto, também foram descritas variações significativas na sensibilidade a drogas em diversas cepas analisadas.

Não existe no momento uma revisão completa sobre as características das distintas cepas do T. cruzi. Neste trabalho tentaremos resumir certos aspectos descritos por diferentes grupos, que serão importantes para uma discussão posterior.

A cepa Y, isolada de um caso humano agudo (Silva & Nussenzweig, 1953), e a cepa CL, isolada de um triatoma natu -

ralmente infectado (Brener & Chiari, 1963), são consideradas cepas "polares", por diferirem na maioria dos parâmetros analisados. As demais cepas do T. cruzi seguem, em linhas gerais, o padrão da Y ou da CL, ou padrões intermediários.

Melo & Brener (1978) realizaram estudos sistemáticos sobre a distribuição de diferentes cepas em tecidos e órgãos de camundongos. As cepas Y e Berenice parasitam preferencialmente o baço, o fígado e a medula óssea, enquanto a cepa CL não é encontrada nesses tecidos e órgãos. Todas as cepas, no entanto, infectam células musculares em maior ou menor grau. Por este motivo, as cepas foram classificadas de acordo com seu tropismo tissular em macrofagotrópicas e em não-macrofagotrópicas (Melo & Brener, 1978).

Os primeiros estudos sobre a heterogeneidade antigênica do T. cruzi foram realizados através de testes de aglutinação e precipitação utilizando-se antígenos de formas epimastigotas (Nussenzweig et al. 1963a; Nussenzweig & Goble, 1966). As cepas foram classificadas em dois grupos antigênicos principais. Os antígenos (possivelmente polissacarídios) dos grupos A e B apresentam certa reação cruzada, o que sugere alguma semelhança estrutural. As cepas dos grupos A e B não podem ser separadas em experimentos de proteção, confirmando observações anteriores sobre a existência de resistência cruzada entre diferentes cepas do parasita (Nussenzweig et al. 1963b).

O efeito de soros imunes de camundongos ou de pacientes chagásicos crônicos na aglutinação de cepas "polares" do T. cruzi também foi investigado. Apenas a cepa Y é aglutinada por soros homólogos ou heterólogos. A preincubação de tripomastigotas da cepa Y com estes soros diminui sua infectividade quando inoculada em camundongos. Um efeito semelhante é obtido por transferência passiva de soros imunes homólogos ou heterólogos. Nenhum desses efeitos é observado para a cepa CL (Krettli & Brener, 1976). Esses resultados, no entanto, não indicam a existência de uma diferença antigênica qualitativa entre as duas cepas, eles sugerem a existência de diferenças topológicas e quantitativas na expressão dos antígenos comuns na superfície celular dos parasitas.

Recentemente foram desenvolvidos métodos bioquímicos para analisar as características intrínsecas das cepas do T. cruzi, uma vez que o comportamento do parasita em animais infectados natural ou experimentalmente poderia ser influenciado pelo hospedeiro ou por outras condições ambientais. Dois tipos de análise estão sendo aplicadas: (a) uma análise ao nível fenotípico, através da caracterização de perfis de isoenzimas, que define grupos denominados zimodemas (Miles et al. 1978, 1981; Romanha et al. 1979a,b), e (b) uma análise ao nível genotípico, através da caracterização do perfil de digestão do DNA do cinetoplasto com enzimas de restrição, que define grupos chamados esquizodemas (Morel et al. 1980, 1984; Deane et al. 1984).

Miles et al. (1978) definiram três tipos de zimodemas: no tipo I situam-se as cepas encontradas em animais silvestres e em triatomíneos; no tipo II classificam-se os isolados de pacientes nordestinos com Chagas agudo ou crônico e as cepas de animais domésticos; no tipo III incluem-se as cepas isoladas de casos humanos da região amazônica e que são sensivelmente diferentes dos isolados dos outros dois grupos. Miles et al. (1981) estenderam sua análise para diferentes regiões da América do Sul, concluindo que o tipo I é predominante na Venezuela, enquanto o tipo II é encontrado preferencialmente no Centro e no Leste do Brasil. Uma vez que a forma digestiva da Doença de Chagas é praticamente inexistente na Venezuela e bastante comum no Brasil, os autores sugeriram que determinado tipo de zimodema poderia estar relacionado com a patologia da Doença em ambos os países (Miles et al. 1981).

A análise por isoenzimas de cepas isoladas da região endêmica de Bambuí (Minas Gerais) mostrou que mesmo dentro de uma única região uma grande variabilidade pode ser encontrada. Romanha et al. (1979a,b) definiram quatro zimodemas distintos (A, B, C, D) para as cepas de Bambuí.

A comparação do perfil de restrição do DNA do cinetoplasto também foi utilizada como método de tipagem das cepas do T. cruzi (Morel et al. 1980, 1984). Através desta técnica, os isolados de Bambuí puderam ser agrupados em subpopulações, designadas esquizodemas. As cepas Y e CL mostraram ni

Figura 10 - Polipeptídios da superfície celular de diversas cepas e clones de T. cruzi, analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (7-14%). Os números referem-se à classificação do isolado. O tipo de zimodema é especificado dentro dos parênteses. Para maiores detalhes ver item 1; 4.1 e 8 de Material e Métodos.

tidamente pertencer a esquizodemas distintos. Além da tipagem de cepas, a análise de esquizodemas conseguiu demonstrar a existência de cepas diferentes circulantes no mesmo paciente ou animal infectado, confirmando dados anteriores sobre a possibilidade da reinfecção por T. cruzi no mesmo indivíduo (Deane et al. 1984; Morel et al. 1984).

Todas as cepas analisadas apresentam pelo menos uma característica em comum, que é a capacidade que a forma tripomastigota apresenta de invadir a célula hospedeira. Tendo em vista a premissa de que o mecanismo de penetração resulta da interação entre as superfícies do parasita e da célula de mamífero, decidimos analisar o perfil das proteínas de superfície de distintas cepas e clones isolados a partir de pacientes da região de Bambuí (Minas Gerais) (Zingales et al. 1984). As proteínas da superfície de formas epimastigotas, representativas dos quatro zimodemas definidos anteriormente por Romanha (1982), foram marcadas com NaI^{131} via Iodogen e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (Fig. 10). Os epimastigotas mostraram uma semelhança notável em seu perfil polipeptídico global, apesar de existirem algumas diferenças específicas entre cepas e clones pertencentes a zimodemas distintos. Estas diferenças, no entanto, não permitem que a análise das proteínas de superfície seja utilizada como método de tipagem.

Um estudo mais específico dos antígenos localizados na superfície celular dos clones de zimodema A, B e C e das cepas do zimodema D foi realizado por imunoprecipitação, em que lisados radioiodados dos parasitas eram incubados com distintos antisoros provenientes dos pacientes que albergavam cada tipo de zimodema (Figs. 11, 12, 13, 14). Os antígenos de peso molecular aparente de 95 kDa, 80 kDa e 55 kDa foram encontrados em todas as amostras analisadas, reconhecidos por todos os antisoros testados. Apenas os clones do zimodema B revelaram a presença de dois outros antígenos, com peso molecular aparente de 90 kDa e 110 kDa. Esses componentes poderiam estar antigenicamente relacionados com os antígenos de 80 kDa e 95 kDa, uma vez que foram reconhecidos por antisoros de pacientes portadores de cepas de zimodema A, C ou D.

Figura 11 - Antígenos da superfície do clone 229-10, pertencente ao zimodema A, imunoprecipitados com soros de pacientes chagásicos de Bambuí (portadores de cepas dos zimodemas A a D), e com soros de coelhos imunizados com membrana plasmática de epimastigotas [Epi (Y)] ou com tripomastigotas de cultura de tecido [Tripo (Y)]. Um "pool" de soros humanos normais foi usado como controle. Ver detalhes nos itens 1; 2 e 7 de Material e Métodos.

Figura 12 - Antígenos da superfície do clone 167-13, pertencente ao zimodema B, imunoprecipitados como descrito na legenda da Fig. 11.

Figura 13 - Antígenos da superfície do clone 182-1, pertencente ao zimodema C, imunoprecipitados com soros de pacientes chagásicos de Bambuí (portadores de cepas dos zimodemas A a D), e com soros de coelhos imunizados com membrana plasmática de epimastigotas [Epi (Y)] ou com tripomastigotas de cultura de tecidos [Tripo (Y)]. Um "pool" de soros humanos normais foi usado como controle. Ver detalhes experimentais nos itens 1; 2 e 7 de Material e Métodos.

Figura 14 - Antígenos da superfície da cepa 150, pertencente ao zimodema D, imunoprecipitados como descrito na legenda da Fig. 13.

Os três antígenos principais, comuns a todos os clones e cepas analisados, também são imunoprecipitados por antissoros de coelhos imunizados com tripomastigotas vivos ou com a fração V de membrana plasmática de epimastigotas, em ambos os casos os parasitas eram da cepa Y (Figs. 11, 12, 13, 14). Um estudo análogo, utilizando como parasitas marcados epimastigotas da cepa Y, e como antissoros, 16 amostras de pacientes de Bambuí, mostrou que os antígenos de 95 kDa, 80 kDa e 55 kDa são reconhecidos em todos os casos (Fig. 15). Esses resultados sugerem que pelo menos esses antígenos são total ou parcialmente conservados entre os clones e cepas do T. cruzi e reforçam dados anteriores (Zingales et al. 1982b) de que estes compostos seriam comuns às formas epimastigotas e tripomastigotas.

Todos os soros testados imunoprecipitam os mesmos antígenos da superfície de tripomastigotas de cultura de tecidos (cepa Y), incluindo aqueles de peso molecular superior a 95 kDa (Fig. 16), confirmando que este estágio apresenta um padrão de antígenos de superfície bem diferente daquele de formas epimastigotas (Zingales et al. 1982b) e sugerindo que estes antígenos também seriam conservados, independentemente do tipo de zimodema.

Nesta mesma linha de pesquisa Plata et al. (1984) analisaram o perfil dos antígenos de superfície de formas tripomastigotas provenientes de três cepas de T. cruzi (Y, CL e Tehuantepec) e de seus respectivos clones. Utilizando vários soros de camundongos imunizados com esses parasitas observaram, por géis unidimensionais contendo SDS, que certos clones das três cepas expressam antígenos comuns, ao passo que outros clones apresentam antígenos específicos. A existência destes últimos antígenos nas cepas Y ou CL foi confirmada em experimentos de absorção dos soros imunes com grandes massas de tripomastigotas de ambas as cepas. Ao analisar a infectividade experimental dos diferentes clones, Plata et al. (1984) verificaram que camundongos que sobreviveram à infecção com tripomastigotas clonados ou não, apresentam certa resistência a um desafio com uma dose letal de tripomastigotas provenientes de qualquer uma das três cepas em estudo. Em todos os animais infectados foi possível induzir uma imunidade cruzada (em contrapo-

Figura 15 - Antígenos da superfície de formas epimastigotas da cepa Y, imunoprecipitados com soro de coelho anti-membrana plasmática de epimastigotas [Epi (Y)] e com soros de pacientes chagásicos de Bambuí. Estes soros foram classificados de acordo com o tipo de zimodema (nos parênteses) da cepa que a albergavam. Um "pool" de soros humanos normais foi usado como controle. Detalhes nos itens 1; 2 e 7 de Material e Métodos.

Figura 16 - Antígenos da superfície de tripomastigotas de cultura de tecidos da cepa Y, imunoprecipitados com dois soros de coelho anti-tripomastigotas |Tripo (Y)| e soros de pacientes chagásicos de Bambuí, classificados como descrito na le- genda da Fig. 15.

sição a uma imunidade cepa-específica). Tais resultados confirmam a existência de antígenos comuns entre os clones e sugerem que estes antígenos poderiam induzir um estado de imunidade protetora in vivo. Segundo Plata et al. (1984) os antígenos específicos de cada cepa não teriam um papel importante na indução da proteção. Se de fato esta suposição for verdadeira, a estratégia para a obtenção de uma vacina hipotética contra a Doença de Chagas será grandemente facilitada.

A metodologia empregada por estes dois grupos (Plata et al. 1984; Zingales et al. 1984), isto é a análise por eletroforese unidimensional após imunoprecipitação com soros policlonais, não permite descartar a hipótese de existirem certas variações na estrutura primária dos antígenos comuns às cepas ou na sua expressão quantitativa. A técnica de eletroforese bidimensional de alta resolução (O'Farrell, 1975) poderia revelar variações sutis, não detectadas em géis unidimensionais. Além disso, a homologia entre os antígenos poderia ser analisada através da comparação de mapas peptídicos obtidos a partir da proteólise limitada dos compostos.

Anticorpos monoclonais dirigidos contra a glicoproteína de 72 kDa (GP 72 - Snary et al. 1981) também foram utilizados para a análise de cepas e clones do T. cruzi. Através de radioimunoensaio (RIA) concluiu-se inicialmente (Kirchoff et al. 1984a) que em duas das quatro cepas analisadas e em 23 dos 50 clones testados havia a expressão da GP 72 na superfície. Esse dado causou certa surpresa, uma vez que a esta glicoproteína havia sido atribuído o papel de "receptor" para sinais de diferenciação (Sher & Snary, 1982). Estudos posteriores, no entanto, em que se utilizaram testes de imunoprecipitação após solubilização da membrana dos parasitas com detergente, mostraram que a GP 72 existia em todos os clones e cepas testados, sugerindo que nos clones não reativos por RIA os epitopos desta glicoproteína estariam crípticos (Kirchoff et al. 1984b). Estes resultados favorecem a hipótese de que a GP 72 seria ubíqua no T. cruzi, mas que existiria uma microheterogeneidade topológica nos epitopos desta molécula na membrana das diferentes cepas e clones do parasita.

Na caracterização de clones de T. cruzi não se pode deixar de mencionar o trabalho exaustivo de Dvorak e colabora-

dores, resumido numa revisão recente (Dvorak, 1984). Esse grupo isolou numerosos clones de cepas de T. cruzi e analisou uma série de parâmetros biológicos. Diferenças de até 10 vezes foram encontradas na taxa de crescimento de clones de epimastigotas em meio axênico. A velocidade de crescimento extracelular se correlaciona com a velocidade de divisão de amastigotas intracelulares e, conseqüentemente, com a duração do ciclo celular. Clones com ciclos de 5 dias foram encontrados, ao lado de clones cujo ciclo chega a durar 3 meses. Diferenças de 40% no conteúdo de DNA total por parasita também foram relatadas. Utilizando a técnica de imunodifusão com antígenos solúveis conseguiu-se detectar de 16 a 35 antígenos diferentes nos clones analisados. Desses antígenos 5 a 7 seriam comuns a todos os isolados. A infectividade e a patologia dos clones para animais experimentais também varia. Os dados do grupo de Dvorak demonstram que a genética do parasita e a do hospedeiro são fundamentais na determinação do curso e da instalação da Doença, assim como no uso de quimioterápicos (Dvorak, 1984).

A análise da heterogeneidade entre cepas e clones do T. cruzi levanta uma série de questões extremamente importantes, e ainda não respondidas: (a) Como e por que existe essa apreciável variação?; (b) Existe variação antigênica em T. cruzi, análoga àquela descrita para tripanosomas africanos?(c) os tripanosomas americanos estão evoluindo para um aumento ou uma redução da heterogeneidade?; (d) Ou então, será esta um resultado da estabilização dos caracteres?; (e) Os estudos gerais sobre purificação de antígenos, testes de proteção, análise de infectividade, testes de quimioterápicos, etc. devem ser realizados com populações heterogêneas ou com uma série de clones do parasita?

2. INTERAÇÃO DO TRYPANOSOMA CRUZI COM FAGÓCITOS PROFISSIONAIS

As células de mamífero podem ser classificadas segundo Rabinovitch (1968) em fagócitos profissionais (leucócitos polimorfonucleares e fagócitos mononucleares), especializados em ingestão ativa e constante de partículas e organismos

e fagócitos não profissionais (fibroblastos, neurônios e várias células epiteliais), que também têm capacidade de ingerir partículas, mas em menor extensão.

A interação do T. cruzi com macrófagos tem sido estudada intensamente, uma vez que representa uma das vias pelas quais a infecção se instala (Alexander, 1975; Nogueira & Cohn, 1976; Alcantara & Brener, 1978, 1980; Kipnis et al. 1979; Meirelles et al. 1982a,b, 1983; Zenian & Kierszenbaum, 1982; Villalta & Kierszenbaum, 1983; Umezawa et al. 1985). Neste trabalho resumiremos algumas das observações mais importantes relatadas na literatura.

(a) O epimastigota, o tripomastigota e o amastigota são interiorizados em macrófagos, provavelmente através de mecanismos distintos;

(b) Todas as formas são encontradas inicialmente em vacúolos parasitóforos;

(c) A forma epimastigota é destruída, enquanto o tripomastigota e o amastigota escapam do vacúolo parasitóforo e vão para o citoplasma da célula. O tripomastigota se diferencia em amastigota, e inicia vários ciclos de divisão; o amastigota também se multiplica ativamente;

(d) Após várias gerações, o amastigota (proveniente da infecção de tripomastigotas) torna a diferenciar-se em tripomastigota, que, após a lise celular, é liberado para o meio externo;

(e) No caso da infecção por amastigotas provenientes de fígado e baço, os parasitas intracelulares não se diferenciam em tripomastigotas;

(f) Existem diferenças na infectividade de diversas cepas para os macrófagos. Tripomastigotas sanguíneas da cepa Y são 20 a 30 vezes mais infectantes do que os da cepa CL;

(g) Comparando-se a infectividade de tripomastigotas de diferentes fontes, observa-se que parasitas de cultura de tecidos são mais infectantes do que tripomastigotas de meio axênico, os quais, por sua vez, infectam mais do que tripomastigotas sanguíneas. Estas diferenças são observadas tanto com parasitas da cepa Y como com os da cepa CL.

De uma maneira geral, os dados da literatura apontam para a presença tanto na superfície do macrófago quanto na superfície do tripomastigota de "receptores" que estariam envolvidos em mecanismos de reconhecimento, adesão e penetração do parasita. Estes receptores poderiam ser glicoproteínas e/ou glicolipídios (cf. Zingales & Colli, 1985). Diferenças na interiorização de tripomastigotas de diferentes origens ou de diferentes cepas poderiam ser explicadas através da existência da expressão diferencial (quantitativa e qualitativa) de "receptores" na superfície do parasita, ou ainda pela presença de componentes parasitários específicos que inibiram a ingestão pelo macrófago.

Nogueira et al. (1980) propõem a existência de um fator "antifagocítico" na superfície de tripomastigotas sanguícolas e, mais recentemente, de tripomastigotas de cultura de tecidos (Nogueira, 1983). A remoção desse fator por tratamento suave com tripsina aumenta a penetração do sanguícola em macrófagos, atingindo-se os mesmos níveis obtidos para tripomastigotas de meio axênico (Nogueira et al. 1980; Kipnis et al. 1981). Através do uso de inibidores de síntese proteica evidenciou-se que o fator é sintetizado pelo parasita (Kipnis et al. 1981; Nogueira et al. 1981). Nogueira et al. (1980, 1981) sugerem ainda que uma glicoproteína de 90 kDa seja o fator "antifagocítico". Observações preliminares (Nogueira, 1983) tendem a correlacionar a glicoproteína de 90 kDa com uma atividade neuraminidásica, recentemente demonstrada por Pereira (1983). Esta atividade é encontrada apenas em tripomastigotas sanguícolas e de cultura de tecidos, sendo ausente em amastigotas e pouco representada em epimastigotas.

Especulações tendem a favorecer a idéia de que a atividade neuraminidásica poderia mediar o efeito "antifagocítico" da glicoproteína através da liberação de resíduos de ácido siálico, presentes em componentes da superfície do macrófago, necessários para a interiorização do parasita na célula hospedeira (Nogueira, 1983). Até o momento, no entanto, não existem explicações para o fato de tripomastigotas de cultura de tecidos, que possuem o fator antifagocítico e

alta atividade neuraminidásica, conseguirem penetrar muito mais eficazmente em macrófagos do que tripomastigotas sanguíneas (Meirelles et al. 1982b).

3. INTERAÇÃO DO TRYPANOSOMA CRUZI COM FAGÓCITOS NÃO PROFISSIONAIS

Macrófagos fagocitam eficientemente epimastigotas e tripomastigotas, ao passo que apenas os tripomastigotas são interiorizados em fagócitos não profissionais. Esses dados sugerem que os tripomastigotas seriam dotados de mecanismos de penetração ativa ou de indução de sua própria endocitose.

O evento da invasão celular é de importância fundamental para a perpetuação do ciclo biológico do parasita e representa um dos mecanismos de escape do tripomastigota à ação da resposta imune do hospedeiro. A compreensão dos fatores que determinam a capacidade de interiorização do parasita poderia facilitar a formulação de estratégias que visam bloquear esse evento. Em face do exposto acima, torna-se claro que os fagócitos não profissionais devem ser as células eleitas por aqueles que pretendem estudar esses fatores.

Na natureza dezenas de espécies animais são parasitadas pelo T. cruzi, exceção feita para as aves e animais de sangue frio. A refratariedade das aves à forma tripomastigota se deve à atividade lítica de seu soro (Neri-Guimarães & Lage, 1972), que ativa o sistema do complemento independentemente da presença de anticorpo (Kierszenbaum et al. 1981).

Os primeiros estudos sobre a infectividade de T. cruzi para células de mamífero datam da década de 40 (Meyer, 1942). Desde então, muitas linhagens celulares foram testadas, não se encontrando nenhuma que fosse resistente à invasão pelo tripomastigota. Até mesmo células de embrião de galinha (hospedeiro naturalmente refratário) podem ser eficientemente infectadas (Meyer & Xavier de Oliveira, 1948). A quantificação dos índices de interiorização do parasita mostrou, no entanto, a existência de diferenças que dependem da linhagem celular e da cepa do parasita usada. Dvorak & Howe (1976) relatam que

células de músculo esquelético de embrião bovino (BESM) interiorizam 2 a 5 vezes mais parasitas que células HeLa e Vero, respectivamente. Por outro lado, Bertelli & Brener (1980) descrevem que tripomastigotas sanguíneas da cepa Y são muito mais infectantes que tripomastigotas da cepa CL, tanto para células BESM quanto para Vero. Essas observações sugerem que a interação entre o parasita e a célula hospedeira depende de características biológicas de ambas as células.

Uma vez que o fenômeno de interiorização do parasita depende do contacto entre as membranas de ambas as células, é de se supor que componentes da superfície de ambas estejam envolvidos no fenômeno. Nesse ponto várias questões básicas poderiam ser levantadas:

(a) Por que os epimastigotas não invadem fagócitos profissionais? Os tripomastigotas apresentam componentes de superfície especializados na indução de sua interiorização?

(b) Existem diferenças qualitativas e/ou quantitativas nos componentes da superfície de tripomastigotas de diferentes cepas do T. cruzi que determinariam sua eficiência de penetração?

(c) Existem "receptores" ubíquos em diferentes linhagens de células hospedeiras? Estes "receptores" teriam uma estrutura química comum que funcionaria na adesão e/ou interiorização do parasita?

Apesar de terem sido feitos muitos esforços para tentar responder a algumas destas questões básicas, muito pouco se sabe sobre as várias etapas que levam à interiorização do parasita, e sobre a natureza dos "receptores" celulares.

3.1. Interiorização e Ciclo Intracelular do Trypanosoma cruzi

O T. cruzi tem acesso ao meio intracelular por um mecanismo denominado endocitose. Este mecanismo é definido como uma função celular generalizada que regula o englobamento de substâncias do meio através da formação de vacúolos ou vesículas originados da membrana plasmática. A endocitose de substâncias particuladas recebe o nome de fagocitose, em oposição à

substâncias solúveis que recebe o nome de pinocitose (cf. Silverstein et al. 1977). Jones et al. (1972) introduziram o termo "fagocitose induzida" para definir o processo de interiorização de parasitas intracelulares em fagócitos não profissionais.

Não se sabe através de que região do corpo a forma tripomastigota é interiorizada na célula hospedeira. Alguns estudos de microfilmagem (Dvorak & Hyde, 1973) mostram que o parasita ao se aproximar da célula provoca o aparecimento de uma depressão na membrana. Minutos depois, ele já se encontra no vacúolo parasitóforo. Dvorak & Hyde (1973) e Hyde & Dvorak (1973) mostraram que a mesma célula pode ser infectada simultaneamente ou sequencialmente por vários parasitas e que a distribuição dos tripomastigotas na monocamada é definida por uma função binomial negativa. Através de estudos de marcação com (^3H)-timidina, seguida por autoradiografia, concluiu-se que os parasitas infectantes estão na fase G1/Go de seu ciclo celular (Crane e Dvorak, 1979).

Logo após a interiorização o parasita escapa do vacúolo, sendo encontrado na matriz citoplasmática (Meyer & Xavier de Oliveira, 1948; Tanowitz et al. 1975; Nogueira & Cohn, 1976). Foi relatado que as formas tripomastigotas da cepa Ernestina transformam-se em amastigotas intracelulares 3 horas após a infecção (Dvorak & Hyde, 1973). Aparentemente a síntese de RNA não é necessária para este processo de diferenciação (Crane & Dvorak, 1980). Antes de dividir-se os amastigotas permanecem numa fase de quiescência de duração variável (até 30 horas). Após esse período pré-replicativo a população sofre um ciclo sincrônico de síntese de DNA, seguido por divisão celular. A síntese de DNA do parasita independe da síntese de DNA da célula hospedeira (Crane e Dvorak, 1979).

Após vários ciclos de divisão celular, a forma amastigota diferencia-se em tripomastigota. Para a cepa Ernestina este processo ocorre 5,5 dias após o evento de interiorização (Dvorak & Hyde, 1973). Durante a diferenciação ocorre uma migração gradual do cinetoplasto para uma posição posterior no corpo do parasita, a saída do flagelo e o aparecimento

de uma membrana ondulante. A maturação resulta primeiramente no aparecimento de formas tripomastigotas largas, que subsequentemente se transformam em formas finas (Dvorak & Hyde, 1973).

O escape do tripomastigota da célula hospedeira ocorre 24 horas após o início da diferenciação. Os parasitas liberados são capazes de infectar imediatamente outra célula (Dvorak & Hyde, 1973). Acredita-se que no hospedeiro vivo este processo também ocorra, isto é, que tripomastigotas recém liberados por uma célula infectem a célula vizinha, sem passar necessariamente pela via circulatória. Este mecanismo garante ao parasita uma proteção contra o ataque imunológico do hospedeiro.

Infecções maciças de monocamadas podem resultar na morte precoce da célula hospedeira com a liberação de amastigotas e formas de transição (esferomastigotas e tripomastigotas largas). Estas formas são capazes de infectar novas células, onde prosseguem seu ciclo de diferenciação (Dvorak & Hyde, 1973).

3.2. Papel da Célula Hospedeira na Interiorização do *Trypanosoma cruzi*

Dvorak & Crane (1981) relataram que a infecção de células de mamífero por *T. cruzi* e *Toxoplasma gondii* é modulada pelo ciclo celular do vertebrado. A capacidade de infecção de células HeLa por ambos os parasitas aumenta à medida que as células passam da fase G1 para a fase S, e diminui quando as células entram em G2-M. Essa conclusão concorda com observações anteriores de Piras et al. (1980) que indicam que monocamadas confluentes de células Vero (onde a maioria das células está em fase G1) são menos infectadas por tripomastigotas da cepa EP do que monocamadas não-confluentes (onde a maioria das células está em fase S).

Na literatura existem vários exemplos de mudanças quantitativas e qualitativas de componentes da superfície de células de mamífero durante o ciclo celular (cf. Dvorak & Crane, 1981). Portanto é possível que na fase S do ciclo da

célula hospedeira haja uma maior expressão de componentes de superfície que atuariam como "receptores" para a interiorização do T. cruzi.

Piras e colaboradores mostraram que células Vero tratadas com tripsina são menos suscetíveis à infecção pela cepa EP do que células controle (Piras et al. 1980; Henriquez et al. 1981b). Estas células recuperam a capacidade de serem infectadas após incubação por 4-5 horas em meio fresco. Se neste período de recuperação, tunicamicina for adicionada ao meio de cultura, a infecção não é restabelecida (Piras et al. 1983). O tratamento de células Vero com as lectinas de Ricina I, Con A, WGA e PHA antes da infecção também resulta na inibição (60-70%) da interiorização do parasita (Piras et al. 1983). Valores semelhantes de inibição são observados quando a célula hospedeira é exposta a metaperiodato ou a drogas que rompem o citoesqueleto (Piras et al. 1980; Henriquez et al. 1981b). O tratamento de mioblastos de coração de rato e de macrófagos de camundongo com α -manosidase promove uma redução significativa na adesão e interiorização de tripomastigotas sanguícolas e metacíclicos do inseto vetor (Villalta & Kierszenbaum, 1983).

Tomadas em conjunto essas observações obtidas com diferentes linhagens celulares e diferentes cepas e fontes de parasita sugerem fortemente que glicoproteínas da superfície da célula hospedeira e a manutenção de uma arquitetura da membrana plasmática desempenham um papel importante na interiorização do parasita.

Algumas comunicações recentes sugerem que a fibronectina, glicoproteína de alto peso molecular encontrada no sangue, tecido conjuntivo e superfície celular de muitas células de mamífero, poderia funcionar como "receptor" para mediar o mecanismo de adesão e interiorização do tripomastigota na célula hospedeira (Ouaissi et al. 1984; Wirth & Kierszenbaum, 1984). De fato, foi demonstrado que formas infectantes do T. cruzi apresentam sítios de ligação específicos para fibronectina (6×10^4 sítios/parasita, $K_d = 11,36$ nM) e que anticorpos anti-fibronectina inibem 65% da penetração em fi-

broblastos 3T3 (Ouaissi et al. 1984). Também foi demonstrado que o tratamento de macrófagos peritoneais ou de tripomastigotas sanguíneas com fibronectina humana promove um aumento da adesão e interiorização (Wirth & Kierszenbaum, 1984). Essas observações sugerem que a fibronectina, glicoproteína que apresenta resíduos de N-acetil glicosamina e ácido siálico (ver adiante) em sua estrutura, poderia ser o "receptor" ubíquo encontrado na célula hospedeira que mediará alguma etapa do processo de penetração do parasita.

3.3. Trypanosoma cruzi e sua Interação com a Célula Hospedeira

Há cerca de cinco anos nosso laboratório decidiu dedicar-se à caracterização dos componentes da superfície do T. cruzi que estariam envolvidos no processo de interiorização do parasita na célula hospedeira. As etapas da estratégia adotada foram:

(a) Definir um sistema de infecção in vitro constituído por monocamadas de células de mamífero e tripomastigotas derivados de culturas de tecido;

(b) Analisar comparativamente as proteínas e glicoproteínas da superfície de formas epimastigotas (não infectantes) e tripomastigotas (infectantes);

(c) Buscar situações em que o processo de infecção in vitro fosse afetado (tratamento dos parasitas com anticorpos, enzimas proteolíticas, inibidores de síntese proteica e de glicosilação, incubação com monossacarídeos, etc.);

(d) Analisar os antígenos, proteínas e glicoproteínas de superfície afetados pelos tratamentos descritos no item (c);

(e) Obter anticorpos monoclonais e policlonais contra antígenos específicos e analisar seu efeito no bloqueio da penetração do tripomastigota.

3.3.1. Caracterização de um sistema de infecção in vitro

Usando o mesmo enfoque experimental adotado para a análise da endocitose de partículas por fagócitos profissionais e não profissionais (Rabinovitch, 1967) foi possível dissociar e quantificar as etapas de adesão e interiorização do T. cruzi na célula hospedeira (Andrews & Colli, 1982). As células escolhidas para o estudo foram preferencialmente a linhagem LLC-MK₂ derivada do epitélio renal do macaco Rhesus, uma vez que essas células formam monocamadas perfeitas e apresentam uma alta tolerância à infecção pelo parasita. No início dos estudos preferiu-se trabalhar com monocamadas confluentes para evitar a divisão celular durante os experimentos que envolviam observações por períodos longos. Esse processo poderia ocasionar erros na determinação do parâmetro "porcentagem de células infectadas" (Colli et al., 1981; Andrews & Colli, 1982). Nos estudos posteriores em que os períodos de observação eram curtos (1 a 2 horas) passamos a usar monocamadas subconfluentes que forneciam altos índices de penetração (cf. Dvorak & Crane, 1981).

A forma tripomastigota não é interiorizada nas células quando a temperatura de incubação é mantida entre 0°C e 4°C, nessas condições o número de parasitas associados às células reflete exclusivamente a fase de adesão da infecção. O número de parasitas associados às células quando a incubação é feita a 34°C-37°C reflete a somatória dos parasitas aderidos e interiorizados. Com o intuito de quantificar o número de parasitas interiorizados a 34°C-37°C, desenvolveu-se uma técnica que permite eliminar os tripomastigotas extracelulares aderidos. Esta técnica consiste em tratar as monocamadas com um pulso hipotônico (água) por dois minutos, antes da fixação e coloração das mesmas (Andrews & Colli, 1982).

O número de parasitas aderidos a 34°C-37°C pode ser calculado a partir da diferença entre o número total de parasitas associados (antes do choque hipotônico) e o número total de parasitas interiorizados (após o choque). Em nenhuma instância a forma epimastigota é interiorizada, sendo que sua adesão à célula hospedeira é sempre inferior à adesão observada para a forma tripomastigota, tanto a 4°C quanto a 37°C. Nas

Figs. 17 e 18 observa-se o aspecto de monocamadas de células LLC-MK₂ incubadas com formas epimastigotas e tripomastigotas, respectivamente, em diferentes condições de temperatura e choque hipotônico. Conforme discutimos acima, apenas a forma tripomastigota é interiorizada a 37°C, podendo ser facilmente reconhecida após o choque hipotônico e coloração adequada com Giemsa (Fig. 18C), no caso do epimastigota, após o pulso com água, todos os parasitas aderidos são lisados (Fig. 17C).

Os parâmetros da adesão e interiorização de epimastigotas e tripomastigotas aparecem quantificados na Fig. 19. O índice "número de parasitas aderidos a 34°C-37°C" mostra uma variabilidade maior em relação ao mesmo parâmetro medido a 4°C, possivelmente porque em temperaturas mais altas aquele índice reflete uma somatória de variáveis que atuam simultaneamente sobre a adesão e a interiorização do parasita. A adesão a 4°C representa um índice cumulativo, uma vez que os parasitas não são interiorizados. Nessa condição os flagelados apresentam uma redução de motilidade, e muito provavelmente um decréscimo da atividade metabólica, também verificado na célula hospedeira.

Esse sistema de infecção desenvolvido e caracterizado por Andrews & Colli (1982) mostra que dentro de determinada faixa existe uma resposta linear entre o número de parasitas interiorizados e o tempo ou a multiplicidade de parasitas usados na incubação com a monocamada. Esse sistema foi utilizado por nós para determinarmos, no evento de interiorização, o efeito estimulatório ou inibitório de vários compostos. Nossos estudos se concentraram, na maioria das vezes, na medida do índice "parasitas interiorizados". Optamos por não analisar sistematicamente o parâmetro "parasitas aderidos" (a 4°C ou a 37°C) em vista das variáveis que atuam sobre este parâmetro, conforme discutido no parágrafo anterior. Na realidade o índice "parasitas interiorizados" é uma resultante dos eventos de adesão e penetração.

Piras e colaboradores também desenvolveram um sistema muito semelhante ao nosso para estudar a interação de tripomastigotas com a célula hospedeira (Henriquez et al. 1981a; Piras et al. 1983). Como célula alvo escolheram preferencial-

Figura 17 - Aspecto de uma monocamada de células LLC-MK₂ exposta a uma suspensão de formas epimastigotas. (A) Incubada a 4°C e lavada com PBS; (B) Incubada a 37°C e lavada com PBS; (C) Incubada a 37°C, lavada com PBS, tratada com água por 2 minutos e lavada com PBS. Para detalhes ver item 9 de Material e Métodos.

Figura 18 - Aspecto de uma monocamada de células LLC-MK₂ exposta a uma suspensão de formas tripomastigotas de cultura de tecidos. (A) Incubada a 4°C e lavada com PBS (x1.080) (mostra a adesão a 4°C); (B) Incubada a 37°C e lavada com PBS (x1.760) (mostra a adesão e interiorização a 37°C); (C) Incubada a 37°C, lavada com PBS, tratada com água por 2 minutos e lavada com PBS (x1.980) (mostra a interiorização a 37°C). As setas apontam para os parasitas interiorizados (reproduzido de Andrews & Colli, 1982).

Figura 19 - Adesão e interiorização de formas tripomastigotas (T) e epimastigotas (E). Monocamadas confluentes de células LLC-MK₂ foram incubadas com suspensões de $1,2 \times 10^7$ parasitas por 10 horas, nas condições descritas abaixo. As lamínulas foram tratadas ou não com água por 2 minutos para evidenciar os parasitas interiorizados dos parasitas aderidos. Os detalhes experimentais podem ser encontrados no item 9 de Material e Métodos. T₁ e E₁ = número de parasitas aderidos e interiorizados a 34°C; T₂ e E₂ = número de parasitas aderidos a 4°C; T₃ e E₃ = número de parasitas interiorizados a 34°C; T₄ e E₄ = número de parasitas interiorizados a 4°C; (T₁-T₃) reflete o número de parasitas aderidos a 34°C. Os resultados são a média de triplicatas e as barras representam o desvio padrão da média.

mente a linhagem Vero, realizando incubações a 0°C e a 37°C para diferenciar as etapas de adesão e interiorização, respectivamente. Esses autores não utilizam choque hipotônico para lisar os parasitas não interiorizados, sendo que a discriminação é feita apenas por observação ao microscópio.

3.3.2. Análise das proteínas de superfície do T. cruzi

Um estudo comparativo do padrão das proteínas de superfície dos distintos estágios do T. cruzi foi realizado por radioiodação de parasitas vivos, seguida por eletroforese em géis de poliacrilamida-SDS e autoradiografia.

No início de nossos estudos utilizamos como catalisador da reação de radioiodação, a lactoperoxidase (Zingales et al. 1979). Entretanto ao realizarmos posteriormente uma análise qualitativa e quantitativa da adesão de proteínas à superfície do parasita (Colli et al. 1981) verificamos que a lactoperoxidase (e várias outras proteínas testadas) ligava-se fortemente à superfície de epimastigotas e tripomastigotas, não sendo removida por vários ciclos de lavagem. Durante a reação de radioiodação a lactoperoxidase é capaz de autoiodar-se e de marcar contaminantes proteicos encontrados na preparação comercial. Esses compostos marcados são adsorvidos à superfície do parasita, fornecendo resultados errôneos. Outro grupo (Camargo et al. 1982) chegou concomitantemente às mesmas conclusões trabalhando com T. cruzi e outros tripanosomatídios. Frente a esse problema dedicamos utilizar como catalisador da reação de iodação o Iodo-gen, que apresenta uma série de vantagens práticas (cf. Zingales, 1984). Todos os resultados apresentados neste trabalho foram obtidos usando-se esse catalisador.

Na Fig. 20 apresentamos o padrão das proteínas de superfície de formas epimastigotas de meio axênico, amastigotas de baço e fígado de camundongos infectados e tripomastigotas sanguíneas e de cultura de tecidos. À primeira vista nota-se que existem componentes comuns aos três estágios de diferenciação, e componentes específicos para cada forma, como por exemplo os polipeptídios de alto peso molecular presentes em tripomastigotas e amastigotas, mas ausentes nas formas epi-

Figura 20 - Proteínas de superfície analisadas por eletrofo-
rese em gel de poliacrilamida-SDS (7-14%) após radioiodação
dos parasitas. (a) epimastigotas de meio LIT; (b) amastigo -
tas de baço e fígado de camundongos; (c) tripomastigotas de
cultura de tecidos; (d) tripomastigotas sanguíneas. Deta-
lhes experimentais nos itens 1; 4.1 e 8 de Material e Méto-
dos.

mastigotas. Também é interessante observar que o perfil das proteínas de tripomastigotas obtidos a partir de fontes diferentes é muito semelhante (Fig. 20c,d).

Esses estudos foram realizados com parasitas da cepa Y (Zingales et al. 1982b). Quando estendemos a análise para cepas e clones pertencentes a quatro zimodemas distintos, notamos haver muitas semelhanças entre o perfil das proteínas de superfície de epimastigotas da cepa Y e dos quatro zimodemas estudados (Zingales et al. 1984), conforme discutido no item 1.3. Analisamos ainda o padrão de superfície de epimastigotas e tripomastigotas (metacíclicos) de meio axênico do clone 14 da cepa CL (isolado pelo Dr. E. Chiari da UFMG) (Fig. 22, ver adiante). Neste caso também as formas epimastigotas têm proteínas de superfície análogas àsquelas encontradas em outras cepas. No caso das formas tripomastigotas metacíclicas, no entanto, o padrão obtido é muito mais simples do que aquele observado para tripomastigotas sanguícolas e de cultura de tecidos da cepa Y (Fig. 22). Apesar de existirem componentes de alto peso molecular, estes são muito menos numerosos do que aqueles obtidos para a cepa Y. Esses resultados são muito interessantes, uma vez que mostram diferenças bioquímicas nítidas entre estágios morfologicamente muito semelhantes. Os dados desse estudo são apresentados no próximo item.

Maior resolução das proteínas de superfície da forma epimastigota e tripomastigota pode ser obtida por eletroforese bidimensional em condições de equilíbrio (O'Farrell, 1975), adaptada para o T. cruzi por Andrews et al. (1984).

3.3.3. Análise das glicoproteínas da superfície do T. cruzi

Conforme descrito no item 1.2 existiam vários dados na literatura que mostravam diferenças na aglutinação dos estágios do T. cruzi por várias lectinas. Essas observações implicavam numa distribuição diferencial (qualitativa e/ou quantitativa) de glicoproteínas e/ou glicolipídios na superfície das formas do parasita.

Os primeiros dados existentes sobre o isolamento de glicoproteínas do T. cruzi são de Snary & Hudson (1979).

Esses dados mostram a presença de uma glicoproteína de 90 kDa na superfície de formas epimastigotas de meio axênico, tripomastigotas sanguíneas e amastigotas de cultura de células S₂. A glicoproteína de 90 kDa foi isolada após radioiodação dos parasitas e cromatografia de afinidade em colunas de lectina de Lens culinaris (LCA)-Sepharose. Ao analisar formas epimastigotas de diferentes clones e de cepas provenientes de diferentes áreas geográficas, Snary (1980) concluiu que essa glicoproteína é altamente conservada no T. cruzi. Uma proteção parcial contra um desafio com formas tripomastigotas foi observada em camundongos imunizados com esse composto (Scott & Snary, 1979; Snary, 1983).

Outra glicoproteína altamente conservada em cepas e clones do T. cruzi é a de 72 kDa (GP 72) encontrada na superfície de epimastigotas e tripomastigotas de meio axênico e ausente nos outros estágios (Snary et al. 1981; Kirchoff et al. 1984b). Essa glicoproteína, purificada através de um anticorpo monoclonal (Snary et al. 1981), parece proteger camundongos apenas contra a infecção por tripomastigotas de meio axênico, sendo ineficiente contra um desafio com tripomastigotas sanguíneas (Snary, 1983). A GP 72 parece ser ainda um "receptor" para a diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas (Sher & Snary, 1982).

Em nosso laboratório os primeiros estudos sobre a caracterização de glicoproteínas de superfície foram feitos em colunas de LCA-Sepharose (Zingales et al. 1982b). As glicoproteínas de epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas de cultura de tecidos foram analisadas após radioiodação in vivo, seguida por lise do parasita e cromatografia de afinidade. O material eluído com α -metil manosídeo 0,1 M foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (Fig. 21). Os epimastigotas mostram uma glicoproteína de peso molecular aparente de 90-95 kDa fortemente marcada. Outras bandas com peso molecular de 150 kDa, 80 kDa e 62 kDa também podem ser observadas (Fig. 21a). Os tripomastigotas apresentam mais de uma glicoproteína na superfície. Na região compreendida entre 80 kDa e 105 kDa observa-se uma banda larga que contém mais de um componente, não sendo possível avaliar o número exato de

Figura 21 - Glicoproteínas de superfície isoladas por cromatografia de afinidade em LCA-Sepharose e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (7-14%). (a) epimastigotas de meio LIT; (b) tripomastigotas de cultura de tecidos; (c) amastigotas de baço e fígado de camundongos. Detalhes experimentais no item 6 de Material e Métodos.

glicoproteínas presentes, através dessa metodologia. Dois compostos de alto peso molecular também podem ser observados (Fig. 21b). O padrão das glicoproteínas da superfície de amastigotas de baço de camundongos infectados é muito semelhante àquela obtido para tripomastigotas (Fig. 21c).

O perfil das glicoproteínas de superfície com afinidade por LCA que nós obtivemos (Zingales et al. 1982b) é bem mais complexo do que aquele apresentado por Snary & Hudson (1979), onde se descreve a presença de apenas uma glicoproteína de 90 kDa, comum aos três estágios do parasita. Provavelmente o uso de um radioisótopo mais penetrante (I^{131} versus I^{125}), o uso de uma massa maior de parasitas ou o uso de tripomastigotas de cultura de tecidos (versus sanguíneas) e de amastigotas de baço (versus de cultura de tecidos) poderia explicar a discrepância observada. Em todo o caso, acreditamos que na superfície dos três estágios do T. cruzi existam glicoproteínas majoritárias (ou mais eficazmente marcadas) com peso molecular compreendido entre 80 e 105 kDa, que apresentam afinidade por LCA. Os dados obtidos não permitem dizer, no entanto, se essas glicoproteínas são iguais nos três estágios do parasita.

Um estudo mais sistemático e completo sobre a caracterização das glicoproteínas da superfície das três formas de diferenciação do T. cruzi foi realizado por Katzin & Colli (1983), utilizando cromatografia de afinidade com três lectinas: Con A, WGA e SBA. A análise por Con A-Sepharose mostrou a presença de componentes de 90-95 kDa e 80 kDa em epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. Além disso, tripomastigotas e amastigotas mostraram várias glicoproteínas de peso molecular superior a 100 kDa. Epimastigotas (cepa Y) não apresentam glicoproteínas (marcadas com iodo) com afinidade por WGA e SBA, apesar de existirem "receptores" para essas lectinas, evidenciados em experimentos de ligação de WGA e SBA previamente marcadas com I^{131} (Katzin & Colli, 1983). Esses "receptores" poderiam ser as bandas ABC (Alves & Colli, 1975) ou a banda E (Confalonieri et al. 1983; Lederkremer et al. 1985), glicoconjugados específicos da forma epimastigota discutidos no item 1.2.1.

Por cromatografia de afinidade em colunas de WGA-Sepharose pode ser isolada uma glicoproteína única de 85 kDa (Tc 85), específica da superfície do tripomastigota (Katzin & Colli, 1983). Algumas evidências experimentais sugerem que o resíduo de N-acetil glicosamina seja responsável pela ligação dessa glicoproteína à WGA. Uma vez que a lectina de germe de trigo (WGA) apresenta afinidade para aquele açúcar e pelo ácido siálico, está sendo investigada a presença deste resíduo na molécula da Tc 85.

Os estudos descritos acima mostravam que a Tc 85 era uma glicoproteína específica da forma tripomastigota (cepa Y). Decidimos, então, verificar se essa glicoproteína também estaria presente em formas tripomastigotas de outra cepa. Nesses estudos utilizamos o clone 14 da cepa CL, isolado pelo Dr. E. Chiari. As formas epimastigotas deste clone são cultivadas em meio LIT, onde se multiplicam ativamente. Quando essas formas são transferidas para outro meio axênico, o meio M 16 (Chiari, 1981), sofrem um processo de diferenciação gradual para a forma tripomastigota metacíclica. Atinge-se 90% a 100% de diferenciação 6 a 7 dias após a transferência. Nos experimentos descritos na Fig. 22 analisamos comparativamente em formas epimastigotas da cepa Y e do clone 14 (cepa CL) e em formas tripomastigotas de cultura de tecidos (cepa Y) e de meio axênico (CL 14) a presença de glicoproteínas de superfície com afinidade para WGA.

O padrão total das proteínas radioiodadas (Fig. 22a-d) mostra que as formas epimastigotas de ambas as cepas são bastante semelhantes. No caso das formas tripomastigotas nota-se, no entanto, uma série de diferenças, dentre as quais a ausência de um grande número de proteínas de alto peso molecular na forma metacíclica do CL 14, quando comparada com a forma tripomastigota de cultura de tecidos da cepa Y. A forma metacíclica tem um perfil de superfície bastante simples, que no entanto apresenta diferenças quando comparado com o padrão da forma epimastigota do mesmo clone.

Na Fig. 22e-h observam-se os componentes de superfície das amostras, que não são retidos em colunas de WGA-Sepharose. As glicoproteínas eluídas dessas colunas com o açúcar

Figura 22 - Estudo comparativo das proteínas e glicoproteínas da superfície de cepas e estágios do T. cruzi. Os parasitas foram radioiodados, lisados e cromatografados em colunas de WGA-Sepharose conforme descrito nos itens 4.1 e 6 de Material e Métodos. (a), (e), (i) formas epimastigotas da cepa Y; (b), (f), (j) formas epimastigotas da cepa CL (clone 14); (c), (g), (k) formas tripomastigotas metacíclicas da cepa CL (clone 14); (d), (h), (l) formas tripomastigotas de cultura de tecidos da cepa Y. (a-d) padrão total de superfície; (e-h) material que não se liga à WGA; (i-l) material ligado à WGA. A seta aponta para a Tc 85.

competidor são mostradas na Fig. 22i-1. Nota-se que as formas epimastigotas de ambas as cepas não apresentam glicoproteínas com afinidade por WGA. Para a forma tripomastigota da cepa Y observa-se nitidamente a presença da Tc 85, que, no entanto, não consegue ser detectada na forma tripomastigota metacíclica do CL 14.

A não detecção da Tc 85 nos metacíclicos do clone 14 não deve ser tomada como uma indicação definitiva da ausência desta glicoproteína na superfície do parasita. Várias hipóteses poderiam explicar os resultados obtidos:

(a) No clone 14 existiria uma variação da estrutura da Tc 85, que promoveria sua perda de afinidade pela lectina de germe de trigo;

(b) A Tc 85 teria uma disposição topológica na membrana plasmática tal que não permitiria sua radioiodação;

(c) A Tc 85 estaria presente em baixa concentração, não sendo possível detectá-la através da metodologia empregada;

(d) A Tc 85 seria específica de formas tripomastigotas de cultura de tecidos (independentemente da cepa estudada) e inexistente em formas metacíclicas de meio axênico.

Essas hipóteses estão sendo testadas em nosso laboratório (Gonçalves, M.F., trabalho em andamento), sendo extremamente importante determinar se de fato a Tc 85 está ausente em formas metacíclicas do CL 14. Conforme discutiremos a seguir, uma série de evidências experimentais sugerem que a Tc 85 (dentre outros componentes) poderia estar envolvida no processo de interiorização do tripomastigota na célula hospedeira. Ao compararmos a infectividade dos metacíclicos do Clone 14 com a de tripomastigotas de cultura de tecidos da cepa Y verificamos que os primeiros apresentam um índice de interiorização aproximadamente 10 vezes menor que o de tripomastigotas Y. Esse dado concorda com observações anteriores (Bertelli & Brener, 1980). Se de fato ficar comprovada a inexistência ou a alteração da expressão da Tc 85 na superfície dos metacíclicos CL teremos uma evidência indireta do envolvimento desta glicoproteína no processo de penetração.

3.3.4. Efeito de antisoros na interiorização de tripomastigotas - Análise de antígenos de superfície

Utilizando o sistema de infecção descrito por Andrews & Colli (1982) observamos uma inibição da interiorização que variava entre 30% e 60% quando os tripomastigotas de cultura de tecidos eram preincubados com soros inativados de pacientes chagásicos ou de coelhos imunizados com formas tripomastigotas (Zingales et al. 1982b). A inibição da infecção era observada tanto em células HeLa quanto em células LLC-MK₂ (Fig. 23). Antisoros obtidos por imunização de coelhos com vesículas de membrana plasmática (fração V) de epimastigotas não apresentavam efeito inibitório (Fig. 23).

A capacidade desses soros de bloquear a invasão de células de mamífero em cultura foi atribuída à existência de anticorpos específicos. Fragmentos de Fab' preparados após digestão com pepsina da fração de Imunoglobulinas de soros de pacientes chagásicos inibiam a penetração do parasita, ao passo que fragmentos de Fab' obtidos a partir de soros humanos normais não tinham qualquer efeito (Colli et al. 1984).

A análise de um número maior de soros chagásicos mostrou certa variabilidade no grau de inibição da penetração observado. Esse fato poderia estar correlacionado com diferenças nos títulos de imunofluorescência, aglutinação ou lise mediada por complemento dos antisoros usados (ver adiante). Além disto, a aparente capacidade que os tripomastigotas apresentam de liberar-se dos complexos anticorpo-antígenos de superfície (Schmunis et al. 1978; 1980) também poderia ser responsável pela variabilidade observada.

Em todo o caso, os resultados obtidos sugerem que anticorpos produzidos na infecção natural ou experimental com tripomastigotas são capazes de bloquear antígenos específicos que estariam envolvidos na interação com a membrana da célula hospedeira. O fato de que anticorpos anti-epimastigotas, que reconhecem antígenos do tripomastigota comuns às duas formas de diferenciação (ver evidências a seguir) não inibirem a infectividade, nos fazem supor que o efeito inibitório

Figura 23 - Efeito de antisoros na interiorização de tripomastigotas em células HeLa em cultura. Os parasitas foram pré-incubados (10^7 células/ml, 60 minutos a 4°C) com soro normal humano (NH); soros de pacientes chagásicos (Ch_3 , Ch_5); soro normal de coelho (NC); e soro de coelho anti-vesículas da membrana plasmática de epimastigotas (V). A interiorização foi determinada após 3 horas de exposição a 34°C . Os soros foram mantidos durante a infecção. Os títulos de imunofluorescência indireta dos soros Ch_3 ; Ch_5 e V foram de 1:320; 1:320 e 1:640, respectivamente. Os títulos de inibição de hemaglutinação dos soros Ch_3 ; Ch_5 e V foram de 1:640; 1:320 e 1:320, respectivamente. A barra representa o erro padrão da média.

dos soros anti-tripomastigotas seja um efeito específico e não decorrente de um mero revestimento do parasita com anticorpos que estericamente impediriam o reconhecimento de componentes da superfície.

A etapa seguinte de nosso trabalho foi a caracterização dos antígenos da superfície de formas epimastigotas e tripomastigotas em reações de imunoprecipitação com distintos antisoros. Os imunocomplexos, após adsorção com Staphylococcus aureus, foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.

Na Fig. 24 temos a análise dos antígenos de superfície de epimastigotas imunoprecipitados com três soros obtidos contra antígenos de epimastigotas: anti-parasita total, anti-vesículas de membrana plasmática e anti-glicoproteínas que têm afinidade por LCA. Este último antisoro foi gentilmente doado pelo Dr. D. Snary (Wellcome Research Laboratories). Nos três casos os soros reconhecem a mesma classe de antígenos de peso molecular aparente de 90-95 kDa, 80 kDa e 70-72 kDa (Fig. 24b-d). Quando ao lisado de epimastigotas radioiodados foi adicionado um soro anti-tripomastigotas, obteve-se a precipitação dos antígenos de 90-95 kDa e 80 kDa (Fig. 24e), que, portanto devem ser antígenos comuns a ambas as formas. Três absorções sequenciais do lisado de epimastigotas com soro anti-tripomastigotas exauriram, quase por completo, os antígenos comuns. A adição subsequente do soro anti-epimastigota evidenciou a proteína de 70-72 kDa (Zingales et al. 1982b). Esse resultado sugere que esse antígeno é específico da forma epimastigota ou pouco representado no tripomastigota.

Conforme discutimos anteriormente, Snary et al. (1981) mostraram a presença de uma glicoproteína de 72 kDa (GP 72) na superfície de epimastigotas e tripomastigotas de meio axênico. Acreditamos que o antígeno de superfície de 70-72 kDa detectado por nós por imunoprecipitação seja a mesma glicoproteína descrita por aqueles autores, uma vez que esse antígeno é apenas encontrado na forma epimastigota.

O peso molecular dos dois antígenos majoritários da superfície do epimastigota (90-95 kDa e 80 kDa) coincide com o

Figura 24 - Antígenos de superfície da forma epimastigota identificados por imunoprecipitação com (a) soro normal de coelho; (b) soro anti-epimastigotas totais; (c) soro anti-vesículas de membrana plasmática de epimastigotas; (d) soro anti-glicoproteínas de epimastigotas com afinidade por LCA; (e) soro anti-tripomastigotas. Os soros imunes foram obtidos em coelhos, conforme descrito no item 2 de Material e Métodos. A imunoprecipitação foi realizada de acordo com o Protocolo I do item 7 de Material e Métodos.

peso molecular das glicoproteínas isoladas por cromatografia de afinidade (Fig. 21a). Além disto, o fato de um soro obtido contra glicoproteínas de epimastigotas (com afinidade por LCA) também reconhecer os mesmos antígenos (Fig. 24d), reforça a idéia de que os antígenos de 90-95 kDa e 80 kDa são glicoproteínas.

O perfil dos antígenos de superfície do tripomastigota de cultura de tecidos imunoprecipitados por distintos soros hiperimunes (induzidos em coelhos com esquemas diferentes de inoculação de tripomastigotas) e por soros de pacientes chagásicos é muito mais complexo (Fig. 25). Nota-se um agrupamento de bandas na região de 80 a 105 kDa e antígenos de alto peso molecular, chegando a 180-200 kDa. Nesta figura nota-se ainda que diferentes soros de chagásicos, ensaiados na mesma diluição, apresentam a capacidade de imunoprecipitar qualitativamente as mesmas bandas, mas com intensidades diferentes. Esse fato possivelmente está relacionado com os diferentes títulos de aglutinação e imunofluorescência indireta que esses soros apresentam.

Conforme descrito no início deste item, nós observamos que diferentes soros de chagásicos apresentam capacidades diferentes de inibir a interiorização do tripomastigota em células em cultura. Os dados de imunoprecipitação mostrados na Fig. 25 poderiam explicar a variabilidade observada.

Na Fig. 26 nota-se que soros anti-membrana plasmática de epimastigotas e anti-epimastigotas totais imunoprecipitam apenas três antígenos de superfície do tripomastigota: as proteínas de 90-95 kDa, 82 kDa e 80 kDa (Fig. 26d,e). Esses compostos seriam comuns a ambas as formas, corroborando os dados obtidos em experimentos análogos com epimastigotas, mostrados na Fig. 24. O antígeno de 82 kDa da superfície de tripomastigotas poderia compartilhar epitopos comuns com os antígenos de 90-95 kDa e 80 kDa.

Quando lisados de tripomastigotas foram absorvidos exaustivamente com soro anti-epimastigotas e subsequentemente imunoprecipitados com soro humano chagásico, os antígenos específicos da forma tripomastigota puderam ser visualizados (Fig. 26f). Além dos antígenos de alto peso molecular reconhecidos por soros anti-tripomastigotas e chagásico (Fig. 26a-c),

Figura 25 - Antígenos de superfície da forma tripomastigota identificados por imunoprecipitação com quatro soros de pacientes chagásicos obtidos no Hospital das Clínicas de São Paulo e quatro soros hiperimunes anti-tripomastigotas obtidos em coelho. Ver detalhes experimentais no item 2 de Material e Métodos. Um "pool" de soros humanos normais foi usado como controle.

Figura 26 - Antígenos de superfície da forma tripomastigota identificados por imunoprecipitação com: (a), (b) soros de pacientes chagásicos; (c) soro de coelho anti-tripomastigotas; (d) soro de coelho anti-vesículas de membrana plasmática de epimastigotas; (e) soro de coelho anti-epimastigotas; (f) soro de paciente chagásico, após imunoprecipitação prévia do lisado com soro anti-epimastigota em excesso. Ver detalhes experimentais no item 2 e 7 de Material e Métodos.

uma banda conspícua de 85 kDa pode ser evidenciada (Zingales et al. 1982b). Esse último antígeno detectado por imunoprecipitação sequencial seria mais tarde caracterizado como uma glicoproteína de superfície com afinidade por WGA e denominado Tc 85 (Katzin & Colli, 1983).

Um esquema que resume a distribuição dos antígenos de superfície de formas epimastigotas e tripomastigotas, evidenciados por reações de imunoprecipitação, é apresentado na Fig. 27. As principais conclusões são:

(a) Epimastigotas apresentam três antígenos principais de 90-95 kDa, 80 kDa e 70-72 kDa;

(b) Tripomastigotas apresentam uma série de antígenos de alto peso molecular (até 200 kDa) e um conjunto de bandas entre 80 e 105 kDa;

(c) Os antígenos de 80 kDa e 90-95 kDa, provavelmente glicoproteínas com afinidade por LCA (Zingales et al. 1982b) e por Con A (Katzin & Colli, 1983), são comuns a ambos os estágios;

(d) O antígeno de 70-72 kDa é específico de epimastigotas;

(e) Os antígenos de alto peso molecular e a Tc 85 são específicos de tripomastigotas.

Nogueira et al. (1981) descreveram a existência de um único polipeptídeo (75 kDa) na superfície de epimastigotas e tripomastigotas de meio axênico, e de um polipeptídeo majoritário (90 kDa) na superfície de tripomastigotas sanguícolas (cepas Y e CL). Essas proteínas são reconhecidas por soros imunes obtidos de pacientes chagásicos e de camundongos infectados. A extensão desses estudos a seis cepas do T. cruzi mostrou os mesmos resultados (Nogueira et al. 1982).

O padrão extremamente simplificado dos antígenos de superfície apresentado por esses autores (Nogueira et al. 1982) diverge dos dados obtidos por outros (Snary & Hudson, 1979; Araujo & Remington, 1981; Zingales et al. 1982b; Piras et al. 1983; Andrews et al. 1984). As discrepâncias observadas poderiam derivar de diferenças na metodologia utilizada, por exemplo, diferentes catalisadores (lactoperoxidase versus Iodo-gen), radioisótopos (I^{131} versus I^{125}), tempo de exposição do autoradio

Figura 27 - Resumo esquemático dos antígenos de superfície de epimastigotas e tripomastigotas reconhecidos por distintos anti-soros: (G) anti-glicoproteínas de epimastigotas com afinidade por LCA; (V) anti-vesículas de membrana plasmática de epimastigotas; (E) anti-epimastigotas totais; (T) anti-tripomastigotas; (T,E) anti-epimastigotas, após absorção com soro anti-tripomastigotas em excesso; (Ch) soro humano chagásico; (E,Ch) soro humano chagásico, após absorção com soro anti-epimastigotas em excesso. (T,E) mostra os antígenos específicos de epimastigotas; (E,Ch) mostra os antígenos específicos de tripomastigotas. Detalhes experimentais nos itens 2 e 7 de Material e Métodos.

grama, eficiência na solubilização dos antígenos, número de parasitas usados nos ensaios, dentre outras.

Andrews et al. (1984) caracterizaram os antígenos de superfície de epimastigotas e tripomastigotas por eletroforese bidimensional. Os antígenos foram numerados e definidos de acordo com seu peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI). Assim, as proteínas comuns aos dois estágios evolutivos são a P 1 (PM 90 kDa, pI 5,5-6,5) e a P 2 (PM 80 kDa, pI 5,3-6,3). A glicoproteína específica da superfície de epimastigotas foi denominada P 10 (PM 70-72 kDa, pI 5,5) e a glicoproteína específica do tripomastigota, a Tc 85, foi denominada P 5 (PM 85 kDa, pI 6,3-7,5). As proteínas de alto peso molecular, também específicas de tripomastigotas e apresentando pI ácido, foram designadas HAP (high molecular mass acidic proteins).

3.3.5. Tratamento do tripomastigota com tripsina: efeito na interiorização e nos antígenos de superfície

A sugestão de que antígenos de superfície do tripomastigota estariam envolvidos na interação com a célula hospedeira foi reforçada em experimentos nos quais os parasitas foram tratados com tripsina (5 a 150 $\mu\text{g/ml}$), por 20 minutos a 37°C. Nessas condições os tripomastigotas perdem 90% da sua capacidade de infectar monocamadas (Fig. 28) (Andrews et al. 1984; Colli et al. 1984).

A perda de infectividade não é resultante da redução de viabilidade, uma vez que parasitas tripsinizados incubados em meio de cultura fresco recuperam gradualmente sua capacidade de infectar monocamadas. Após 3 a 4 horas de incubação restabelecem-se completamente os índices de infecção. A adição de cicloheximida (5 $\mu\text{g/ml}$) ao meio de cultura inibe o processo de recuperação (Fig. 28), assim como a adição de tunicamicina (1 $\mu\text{g/ml}$).

Na Fig. 29 mostramos o efeito da tripsinização sobre os componentes da superfície de tripomastigotas e a recuperação do perfil original após 4 horas de incubação em meio de cultura fresco. A enzima numa concentração entre 5 e 150 $\mu\text{g/ml}$ é capaz de hidrolisar completamente todas as proteínas de alto

Figura 28 - Interiorização em células LLC-MK₂ de tripomastigotas controle (□) e tratados com tripsina (○, ●): efeito imediato e após distintos tempos de reincubação em DME-5% SFB. A infecção das monocamadas foi realizada por 1 hora a 37°C. Os parasitas foram tratados com tripsina (150 µg/ml, 20 minutos a 37°C). As primeiras duas horas de reincubação dos parasitas tripsinizados foram realizadas em presença (●) ou ausência (○) de 5 µg/ml de cicloheximida. A seta indica o ponto em que a droga foi removida e substituída por DME-5% SFB. Os valores de interiorização representam médias de triplicatas. (Reproduzido de Andrews et al. 1984).

Figura 29 - Proteínas de superfície de tripomastigotas, analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (5-12%). (a) parasitas controle; (b) parasitas tratados com tripsina (150 μ g/ml, 20 minutos a 37°C); (c) parasitas tripsinizados como em (b) e incubados posteriormente por 4 horas em DME-5% SFB a 37°C. A radioiodação dos parasitas foi efetuada como descrito no item 4.1 de Material e Métodos, após os tratamentos especificados.

peso molecular e algumas de peso molecular mais baixo. Na região de 85 kDa de peso molecular observa-se a presença de um polipeptídeo resistente à hidrólise (Fig. 29b). Por análise em géis bidimensionais ficou caracterizado que o material resistente à tripsina não é a Tc 85 (P 5), mas sim outras duas moléculas de PM 85 kDa e de pI 5,5 (P 3) e 5,0 (P 4) respectivamente (Andrews et al. 1984).

Tentamos em seguida verificar se havia uma correlação temporal entre o reaparecimento de determinado antígeno na superfície do parasita tripsinizado e a recuperação da capacidade infectante. Infelizmente os resultados obtidos mostraram que após duas horas de incubação em meio fresco ocorre a ressíntese concomitante de várias proteínas, as quais aumentam quantitativamente com o tempo de recuperação até atingir os níveis normais.

A persistência da síntese proteica do parasita parece ser um requisito para que ele mantenha sua infectividade. Tratamentos de tripomastigotas com concentrações de cicloheximida de 1 a 5 µg/ml (2 a 4 horas), que inibem 90% da síntese proteica, reduzem de 80 a 90% a infectividade. Nessas condições os parasitas perdem muitas proteínas de superfície, indicando um "turnover" relativamente rápido. Por outro lado, baixas concentrações da droga (10 ng/ml) que inibem 27% da síntese proteica, inibem apenas 28% da infectividade (Zingales et al. 1985).

Lima & Kierszenbaum (1982) relataram o efeito da pactamicina, uma droga que promove a inibição irreversível da síntese proteica, na interação do T. cruzi com a célula de mamífero. O tratamento de tripomastigotas sanguíneas (cepa Tulahuén) com 10^{-5} M - 10^{-4} M de pactamicina reduz sua capacidade de adesão e interiorização em células Vero e em mioblastos de coração de rato. Essa droga também reduz a infectividade do parasita para camundongos, observando-se um decréscimo da parasitemia e da taxa de mortalidade.

Piras et al. (1982a) observaram que tripomastigotas das cepas EP, BEC e MEN recém eclodidos de monocamadas infectadas (3 a 4 dias após a infecção) estão muito pouco contaminados

com formas esferomastigotas (morfologicamente semelhantes a amastigotas) e apresentam uma baixa capacidade de interiorização em células Vero. Um aumento nos índices de adesão e penetração (5 a 15 vezes) é observado após incubação do parasita em meio axênico contendo soro fetal. Para algumas das cepas esse fenômeno é acompanhado da transformação do tripomastigota em esferomastigota. A adição de puromicina (1 µg/ml) bloqueia a aquisição das capacidades de adesão e penetração, ao passo que actinomicina D (8 ng/ml) ou tunicamicina (30 ng/ml) inibem apenas a evolução da capacidade de interiorização, sem interferir no aumento de adesão (Piras et al. 1982b). Esses resultados são mais uma evidência da dissociação das etapas de adesão e interiorização no processo de infecção do parasita e sugerem o envolvimento de glicoproteínas (com ligação N-asparagina) na etapa de interiorização

Mais recentemente Piras et al. (1983) observaram que durante o processo de maturação de tripomastigotas recém eclodidos ocorre uma diminuição do peso molecular de alguns polipeptídios de superfície. Esses autores postulam que a ativação da capacidade de interiorização seria resultante de uma atividade proteolítica endógena, uma vez que o tratamento dos parasitas com tripsina reproduz a ativação obtida com a pré-incubação em meio axênico.

Estudos de nosso laboratório (Kuwajima & Colli, 1983) confirmaram que tripomastigotas da cepa Y recém eclodidos apresentam baixos índices de infecção e que tais índices aumentam (3 vezes em 6 horas) por incubação em meio DME-2% SFB. Em alguns experimentos, mas não em todos, houve um aumento na proporção de esferomastigotas. Entretanto, por eletroforese bidimensional observou-se que os padrões de proteínas de superfície de tripomastigotas recém eclodidos e tripomastigotas "máduros" são praticamente indistinguíveis. A incubação dos parasitas com tripsina (150 µg/ml a 0,5 µg/ml) abole a maioria das proteínas de superfície com concomitante inibição da penetração (Kuwajima & Colli, 1983). Esses dados permitiram concluir que na cepa Y: (a) o aparecimento de formas esferomastigotas não está relacionado com a maturação de tripomastigotas recém eclodidos; (b) a ativação da interiorização não depende de proteo-

lise. É possível, portanto, que o processo de maturação dependa da continuação em meio extracelular da síntese de algum componente presente no tripomastigota recém eclodido, mas em níveis insuficientes para promover a interiorização plena.

3.3.6. Possível envolvimento de glicoproteínas na interação entre o T. cruzi e a célula hospedeira

Glicoproteínas de superfície desempenham um papel fundamental em muitos processos de reconhecimento celular, dentre eles as interações célula-célula (cf. Phillips & Gartner, 1980). A inibição destas interações por lectinas, monossacarídeos ou tunicamicina indica o envolvimento da porção glicídica das glicoproteínas na função de ligante-receptor.

Como descrevemos anteriormente, várias referências da literatura demonstram a presença de resíduos de açúcar na superfície celular dos diferentes estágios do T. cruzi. Os estudos de aglutinação do parasita por lectinas (Alves & Colli, 1974; Chiari et al. 1978; Pereira et al. 1980), a ligação de lectinas marcadas (Araujo et al. 1980; Pereira et al. 1980; Katzin & Colli, 1983) e o isolamento de glicoproteínas por cromatografia de afinidade (Snary & Hudson, 1979; Zingales et al. 1982b; Katzin & Colli, 1983) parecem indicar que todos os estágios evolutivos apresentam em sua superfície os resíduos de: manose, galactose, N-acetil glicosamina, N-acetil galactosamina e, provavelmente, ácido siálico.

Numa tentativa de verificar se os resíduos de açúcar da superfície de tripomastigotas estavam envolvidos no processo de infecção, os parasitas e/ou a célula hospedeira foram expostos a monossacarídeos. Os dados obtidos mostraram que apenas N-acetil glicosamina (adicionada durante a infecção) inibe significativamente a interiorização de tripomastigotas de cultura de tecidos em células HeLa e LLC-MK₂ (Andrews & Colli, 1981; Colli et al. 1984). Uma inibição de 70-80% é obtida para células LLC-MK₂ e de 90-95% para células HeLa quando se utilizam 200 mM e 50 mM de N-acetil glicosamina, respectivamente. Para células HeLa, N-acetil galactosamina também promove certa inibição da interiorização. A pré-incubação dos

tripomastigotas ou das monocamadas com diferentes monossacarídeos, seguida por lavagem, não afeta os índices de infecção em relação aos controles (Colli et al. 1984). Os dados obtidos sugerem o envolvimento de algum componente que contém N-acetil glicosamina no processo de interiorização. Esse componente deveria estar presente na superfície do parasita e/ou da célula hospedeira.

Crane & Dvorak (1982) também observaram uma drástica inibição da infecção de células BESM por tripomastigotas das cepas Ernestina e Y, quando 10 mM de N-acetil glicosamina é adicionado durante o período de infecção. Esses estudos foram mais tarde estendidos para um número maior de cepas e clones (Dvorak, 1984). Em todos os isolados (com exceção do clone CA-I/71) N-acetil glicosamina inibiu a interiorização do tripomastigota. O clone CA-I/71 é muito infectante para camundongos e para células em cultura (Dvorak, 1984), fazendo supor que componentes que não contêm resíduos de N-acetil glicosamina em sua estrutura, também participam do processo de interiorização. Nesse sentido, seria extremamente interessante verificar se a Tc 85 e os demais componentes que julgamos possam estar envolvidos na penetração estão presentes nesse isolado.

Ao contrário de que foi relatado por Colli et al. (1984), Crane & Dvorak (1982) encontraram que a pré-incubação do tripomastigota com N-acetil glicosamina, seguida por lavagem, também reduzia a infectividade. Nenhum efeito foi observado quando a monocamada de células era incubada com este monossacarídeo. Os autores interpretaram seus resultados como sendo sugestivos da existência de uma lectina do tipo WGA na superfície do tripomastigota. Essa lectina reconheceria e se ligaria a um "receptor", contendo N-acetil glicosamina, na superfície da célula hospedeira. Esse tipo de "receptor" não foi isolado até o momento.

O grupo de Piras na Venezuela (Piras et al. 1980; Henriquez et al. 1981b) mostrou que a pré-incubação de células Vero com diferentes monossacarídeos não alterava os índices de adesão e interiorização de tripomastigotas da cepa EP.

Por outro lado, o tratamento de parasitas com manose, N-acetil glicosamina, N-acetil galactosamina ou manana promovia um decréscimo de sua infectividade, detectado principalmente através de uma redução drástica da etapa de adesão (medida a 4°C). Para explicar seus resultados, Piras et al. (1983) também propõem a existência de um componente do tipo lectina na superfície do parasita.

O efeito de várias lectinas na adesão e interiorização de tripomastigotas da cepa EP em células Vero também foi analisado (Piras et al. 1980; 1983; Henriquez et al. 1981b). Observou-se que a pré-incubação da célula hospedeira com WGA e PHA (30 minutos com 10 µg/ml de lectina), seguida por lavagem, resulta na inibição de ambas as etapas do processo de infecção. Por outro lado, Con A estimula a adesão do parasita (a 4°C) e inibe sua penetração (a 37°C). Quando os parasitas são pré-tratados com as várias lectinas, lavados e usados para infectar as células, observa-se que Con A, WGA e PHA promovem uma estimulação de 2 a 3 vezes da adesão e da interiorização (Piras et al. 1983).

Os resultados de nosso laboratório com a cepa Y e a linhagem de células LLC-MK₂ são diferentes, pelo menos no que diz respeito à ação de WGA. Os resultados obtidos por N. W. Andrews (1983) mostram que a pré-incubação de monocamadas por períodos mais longos (4 horas com 50 µg/ml de lectina) resulta numa leve estimulação da interiorização do tripomastigota. Nenhum efeito é observado em concentrações mais baixas de lectina. Quando WGA é mantida durante o período de infecção (4 horas) também se observa uma estimulação da penetração. A explicação mais provável para essas observações é a de que a endocitose promovida pela ligação da lectina na superfície da célula hospedeira carrega o parasita para dentro da célula. De fato, os períodos longos de infecção usados nesses experimentos correspondem ao período em que a endocitose da lectina é ativa em células de mamífero (cf. Kramer & Canellakis, 1979).

Apesar da existência de algumas observações contraditórias (atribuíveis ao uso de diferentes protocolos experimentais, cepas do parasita e linhagens celulares), os resulta

dos relatados favorecem, em seu conjunto, o envolvimento de processos ligante-receptor na interação do T. cruzi com a célula hospedeira. Os candidatos para mediar esses processos poderiam ser substâncias do tipo lectinas, glicoproteínas e/ou glicolipídios presentes na superfície do parasita e/ou da célula de mamífero.

Uma vez que tínhamos acumulado evidências de que proteínas antigênicas da superfície do tripomastigota poderiam estar envolvidas no fenômeno de penetração, passamos a analisar especificamente o papel de glicoproteínas da superfície do parasita, utilizando como instrumento metodológico a tunicamicina, inibidor da glicosilação de proteínas em resíduos de asparagina (Lehle e Tanner, 1976; Elbein, 1981).

A incubação de tripomastigotas de cultura de tecidos com tunicamicina promove uma inibição de sua interiorização em células LLC-MK₂. A tunicamicina não afeta a viabilidade do parasita, uma vez que ele recupera sua infectividade normal após lavagem da droga e incubação em meio fresco (Fig. 30). O efeito da tunicamicina é dependente da concentração da droga e do tempo de incubação com o parasita. Concentrações de 1 e 2,5 µg/ml por 6 horas promovem uma inibição de 60% e 80%, respectivamente. Em tempos mais curtos (2 horas) ambas as concentrações não exercem nenhum efeito, sugerindo a necessidade de um tempo mínimo para esgotar o "pool" endógeno de precursores e/ou permitir a degradação de glicoproteínas pré-existentes. Piras et al. (1982) relatam uma redução de 75% da infectividade após 6 horas de pré-incubação dos parasitas com 0,3 µg/ml de tunicamicina. As diferenças nas concentrações de droga usadas para promover uma inibição efetiva poderiam ser explicadas pela procedência da tunicamicina e as diferentes cepas e células usadas nos ensaios. De fato, verificamos que uma concentração de tunicamicina da Sigma de 0,2 µg/ml exerce o mesmo efeito inibitório de uma concentração 5 vezes superior de tunicamicina da Lilly (usada nos ensaios descritos acima).

A tunicamicina além de afetar o índice de interiorização do tripomastigota ("número de parasitas por 100 células"), também afeta a porcentagem de células infectadas e o número médio de parasitas por célula (Tabela I).

Figura 30 - Efeito da tunicamicina (TM) e da cicloheximida (CH) na interiorização de tripomastigotas em células LLC-MK₂. (A) Os parasitas foram incubados com TM (1 ou 2,5 µg/ml) ou com CH (5 µg/ml) por diferentes tempos (2; 4; 6 horas) e, em seguida, expostos a monocamadas subconfluentes (1 hora a 37°C). A interiorização foi determinada como descrito no item 9 de Material e Métodos, e expressa como porcentagem dos controles, onde o antibiótico foi adicionado apenas no momento da infecção. (B) Os parasitas tratados com 1 µg/ml de TM (área pontilhada em A) e com 2,5 µg/ml de TM (área tracejada em A) foram lavados e reincubados em meio DME-5% SFB por 4 horas. A recuperação da capacidade infectante foi determinada como em (A).

Tabela I - Efeito da tunicamicina na interiorização do T. cruzi em células LLC-MK₂

		Tempo de pré-incubação (horas)						Recuperação(horas)					
		2			4			6			4		
		p	m	n	p	m	n	p	m	n	p	m	n
Controle	107 ⁺ -12	32	3,3	3,3	104 ⁺ -2	33	3,2	118 ⁺ -8	45	2,6	95 ⁺ -7	31	3,0
Tunicamicina (1 µg/ml)	120 ⁺ -1	40	3,0	3,0	110 ⁺ -5	38	2,8	47 ⁺ -5	23	2,0	95 ⁺ -4	30	3,0
Tunicamicina (2,5 µg/ml)	98 ⁺ -14	34	2,8	2,8	73 ⁺ -5	32	2,2	28 ⁺ -4	18	1,6	109 ⁺ -7	35	3,1

Os tripomastigotas foram pré-incubados com tunicamicina (1 ou 2,5 µg/ml) pelos períodos de tempo especificados. As amostras tratadas por 6 horas foram lavadas e reincubadas em meio fresco por 4 horas (Recuperação). A infecção de monocamadas subconfluentes de células LLC-MK₂ foi realizada a 37°C por 1 hora. Os parasitas interiorizados foram analisados conforme descrito no item 9 de Material e Métodos. + erro padrão da média.
p = parasitas por 100 células infectadas por 100 células analisadas.
m = número médio de parasitas por célula infectada.

O efeito da droga sobre a síntese de proteínas e glicoproteínas do parasita foi analisado através da medida da incorporação de (^{35}S)-metionina e (^3H)-manose em material TCA precipitável (Tabela II). Tripomastigotas pré-incubados com 1,0 $\mu\text{g/ml}$ ou 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina por 6 horas, e em seguida marcados com cada um dos precursores por 1 hora, apresentaram uma inibição de 23% e 30% da síntese proteica e 45% e 60% da incorporação de (^3H)-manose, respectivamente. Utilizando um protocolo adaptado anteriormente para formas epimastigotas (Zingales et al. 1982a) para a extração do lipídio oligossacárido, observamos 90% de inibição da incorporação de (^3H)-manose nesse composto, quando tripomastigotas foram tratados por 5,5 horas com 1 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina. Esses dados demonstram que a droga de fato inibe a síntese de glicoproteínas do parasita.

Com a finalidade de afastarmos a hipótese de que o 20% a 30% da inibição da síntese proteica promovida pela tunicamicina (Tabela II) fosse responsável pela redução drástica da infectividade do tripomastigota, determinamos a concentração de cicloheximida que é capaz de promover o mesmo nível de inibição de síntese e analisamos seu efeito no índice de interiorização do parasita. Encontramos que 10 ng/ml de cicloheximida inibem, respectivamente, 27% e 10% da incorporação de (^{35}S)-metionina e (^3H)-manose em material TCA precipitável do tripomastigota. Nessa concentração a interiorização do parasita é inibida apenas 28%, sendo essa inibição revertida após lavagem e incubação do parasita em meio fresco (Zingales et al. 1985).

Com a finalidade de determinar a natureza das glicoproteínas afetadas por tunicamicina, analisamos o padrão total e o de imunoprecipitação de tripomastigotas marcados com (^{35}S)-metionina e incubados com a droga nas condições que inibem 60% da interiorização. A análise por eletroforese em gel de poli(acrilamida)-SDS mostrou que pelo menos 4 componentes apresentaram uma migração eletroforética alterada em relação aos controles (Fig. 33a,b). A análise dos antígenos do tripomastigota (totais e de superfície) afetados por tunicamicina foi efetuada por ensaios de imunoprecipitação em que se utilizaram dois

Tabela II - Efeito da tunicamicina na síntese de proteínas e glicoproteínas

	Inibição da incorporação em relação ao controle (%)	
	(³⁵ S)-metionina	(³ H)-manose
Tunicamicina (Lilly) (2,5 µg/ml)	30	60
Tunicamicina (Lilly) (1,0 µg/ml)	23	53
Tunicamicina (Sigma) (0,2 µg/ml)	28	45

Os tripomastigotas (5×10^7 /ml) foram incubados com tunicamicina por 6 horas e em seguida marcados com (³⁵S)-metionina ou (³H)-manose por 1 hora. A incorporação foi determinada após precipitação com TCA, conforme descrito no item 5,6 de Material e Métodos.

protocolos diferentes. O Protocolo I, em que um soro de coelho anti-tripomastigota foi adicionado às amostras após lise do parasita com detergente e o Protocolo II, em que IgG de soros de humanos chagásicos foi adicionada aos parasitas íntegros. Como demonstramos anteriormente (Zingales et al. 1982b), esses dois protocolos permitem identificar, respectivamente, os antígenos totais e de superfície de tripanosomas marcados metabolicamente com metionina. Na Fig. 31 mostramos que o padrão dos antígenos totais é alterado após tratamento com tunicamicina. Na Fig. 32 mostramos uma situação análoga para os antígenos de superfície reconhecidos pela incubação dos parasitas vivos com IgG imune. Os antígenos de peso molecular de 175-180 kDa, 120-125 kDa, 90-95 kDa e 85 kDa não são encontrados nos tripomastigotas tratados com tunicamicina. Em seu lugar, aparecem proteínas com peso molecular de 155 kDa, 105 kDa e 75 kDa (Fig. 32).

Esses dados sugerem que os anticorpos policlonais conseguem reconhecer epitopos localizados na parte proteica das glicoproteínas e que proteínas não glicosiladas conseguem migrar para a superfície do parasita. Para se estabelecer se de fato existe uma correlação entre os antígenos expressos em parasitas tratados com tunicamicina e seus produtos finais glicosilados (nos parasitas controle), mapas peptídicos de ambos os compostos poderiam ser feitos.

Como discutimos anteriormente, a maioria das glicoproteínas da superfície do tripomastigota ligam-se à Con A-Sepharose, ao passo que apenas uma glicoproteína, a Tc 85, liga-se à WGA-Sepharose (Katzin & Colli, 1983). Com a finalidade de caracterizarmos a natureza das glicoproteínas afetadas por tunicamicina realizamos o seguinte experimento. Os parasitas foram incubados com a droga (1 µg/ml, por 3 horas), marcados com (³⁵S)-metionina (por mais 3 horas), lisados e cromatografados em colunas de WGA-Sepharose. Uma parte do material que não se ligou à coluna foi analisado por eletroforese em gel e outra parte foi passada em colunas de Con A-Sepharose. O material ligado a ambas as lectinas foi eluído com os açúcares específicos e analisado em gel de poliacrilamida-SDS. Os componentes obtidos em parasitas tratados e nos controles são

Figura 31 - Antígenos de tripomastigotas marcados com (^{35}S)-metionina, e isolados por imunoprecipitação. Os parasitas foram pré-incubados com tunicamicina (1 $\mu\text{g/ml}$, por 2,5 horas) e em seguida marcados com (^{35}S)-metionina por mais 3 horas, em presença da droga. Após lise dos parasitas, adicionou-se soro de coelho anti-tripomastigotas, realizando-se a imunoprecipitação de acordo com o Protocolo I do item 7 de Material e Métodos. (a) e (c) parasitas controle; (b) e (d) parasitas tratados com tunicamicina; (a) e (b) soro pré-imune de coelho; (c) e (d) soro hiperimune de coelho.

Figura 32 - Antígenos de superfície de tripomastigotas marca - dos com (^{35}S)-metionina, e isolados por imunoprecipitação. Os parasitas foram pré-incubados com tunicamicina e marcados com metionina, nas condições descritas na legenda da Fig. 31. Os parasitas vivos foram incubados com a fração de IgG de um soro humano chagásico por 1 hora a 4°C . Após centrifugação, os parasitas foram lisados e imunoprecipitados como descrito no Protocolo II do item 7 de Material e Métodos. (a) e (c) parasitas controle; (b) e (d) parasitas tratados com tunicamicina; (a) e (b) IgG de um "pool" de soro humano normal; (c) e (d) IgG de soro humano chagásico.

mostrados na Fig. 33.

O padrão total das proteínas marcadas com metionina (Fig. 33a,b) mostra diferenças notáveis entre o controle e os parasitas tratados com a droga. Essas diferenças são visualizadas melhor no material que não se liga à WGA-Sepharose (Fig. 33c,d). A glicoproteína Tc 85 é detectada apenas nos parasitas controle (Fig. 33e, seta), sendo virtualmente ausente nos parasitas tratados (Fig. 33f). As demais glicoproteínas com afinidade por WGA observadas no controle são provavelmente componentes internos do parasita, uma vez que nunca foram detectados em tripomastigotas, cuja superfície foi marcada com iodo. A cromatografia em Con A-Sepharose mostra que no controle (Fig. 33g) a maioria das glicoproteínas são retidas na coluna, ao passo que nos parasitas tratados com tunicamicina esses compostos não se ligam à resina (Fig. 33h). As glicoproteínas das amostras controle ligadas à Con A são eluídas com os açúcares específicos (Fig. 33i), enquanto essas glicoproteínas estão ausentes em eluatos análogos de colunas onde foram cromatografados parasitas tratados (Fig. 33j). A análise dos componentes por eletroforese bidimensional é mostrada na Fig. 34. A Tc 85 pode ser vista na Fig. 34d (seta), estando ausente nos parasitas incubados com tunicamicina.

Os dados quantitativos desses experimentos são mostrados na Tabela III. A radioatividade total presente em cada "pool" eluído de ambas as colunas foi normalizada para 2×10^8 parasitas (o número inicial de células usado). No experimento controle, 5,5% da radioatividade total introduzida na coluna de WGA-Sepharose é retida, ao passo que nos parasitas tratados com tunicamicina esse valor é de apenas 1,6%. No caso do experimento com Con A-Sepharose, 53% da radioatividade total introduzida permanece retida na coluna quando se cromatografam parasitas controle, e esse valor é de zero para parasitas tratados.

Os resultados de que o tratamento com tunicamicina leva à inibição da interiorização do tripomastigota e à modificação de pelo menos 4 glicoproteínas de sua superfície sugerem o possível envolvimento desses compostos na interação parasita-célula hospedeira. O envolvimento de outras moléculas de

Figura 33 - Padrão eletroforético das glicoproteínas de tripomastigotas isoladas por cromatografia de afinidade. Os parasitas foram incubados com tunicamicina (1 μ g/ml por 3 horas) e em seguida, marcados com (35 S)-metionina por mais 3 horas, lisados e cromatografados em colunas de WGA-Sepharose. O material não ligado à lectina foi cromatografado em colunas de Con A-Sepharose. As glicoproteínas ligadas às lectinas foram eluídas com os açúcares específicos, conforme descrito no item 6 de Material e Métodos. (a); (c); (e); (g); (i) parasitas controle; (b); (d); (f); (h); (j) parasitas tratados com tunicamicina; (a); (b) padrão de proteínas totais; (c); (d) material não ligado à WGA; (e); (f) material ligado à WGA; (g); (h) material não ligado à Con A; (i); (j) material ligado à Con A. A seta indica a posição da Tc 85.

Figura 34 - Eletroforese bidimensional de polipeptídios marcada dos com (^{35}S)-metionina e isolados por cromatografia de afinidade, como descrito na legenda da Fig. 33. (a) parasitas controle, material não ligado à Con A; (b) parasitas tratados com tunicamicina, material não ligado à Con A; (c) parasitas controle, material retido em Con A; (d) parasitas controle, material retido em WGA. A seta indica a posição da Tc 85.

Tabela III - Análise por cromatografia de afinidade das glicoproteínas de tripomastigotas tratados com tunicamicina

	cpm ($\times 10^{-3}$)	
	Controle	Tratados com tunicamicina
Incorporação total	522	400
WGA-Sepharose		
material não ligado	373	302
material ligado	22	5
Con-A Sepharose		
material não ligado	121	245
material ligado	136	0

Os tripomastigotas (2×10^8) foram incubados em ausência ou em presença de 1 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina por 3 horas e marcados com (^{35}S)-metionina por 3 horas adicionais. O sobrenadante dos lisados celulares (item 6 de Material e Métodos) foi aplicado em colunas de WGA-Sepharose. O material ligado à lectina foi eluído com N-acetil-D-glicosamina. O material não ligado foi recromatografado em colunas de Con A-Sepharose. A radioatividade ligada à Con A foi eluída com 0,1 M de α -metil manosídeo e 0,1 M de α -metil glicosídeo. Para maiores detalhes ver item 6 de Material e Métodos.

natureza não glicoproteica não pode ser afastado, a partir desses dados.

A glicoproteína de 90-95 kDa existe nas formas epimastigotas e tripomastigotas (Snary & Hudson, 1979; Zingales et al. 1982b). Uma vez que o soro anti-membrana plasmática de epimastigotas não inibe a interiorização do tripomastigota (Zingales et al. 1982b), somos tentados a concluir que essa glicoproteína não estaria envolvida na penetração. Essa conclusão, no entanto, deve ser tomada com cautela, já que foi demonstrado que a glicoproteína de 90 kDa é muito mais representada na superfície do tripomastigota do que na de epimastigotas (Andrews et al. 1984).

As glicoproteínas de 175-180 kDa, 120-125 kDa e a Tc 85, afetadas pela tunicamicina, são específicas da superfície do tripomastigota. Essas moléculas poderiam estar envolvidas na interiorização. Várias observações reforçam esta hipótese: essas glicoproteínas são antigências (reconhecidas por soros chagásicos e de coelhos imunizados com tripomastigotas, soros estes que inibem a infecção de monocamadas) e são sensíveis à tripsina (que também inibe a interiorização). No caso da Tc 85 temos mais uma evidência indireta a favor de seu envolvimento na interiorização, que é o fato de ela conter N-acetil glicosamina em sua estrutura, açúcar que inibe drasticamente a infectividade do parasita. Essas evidências sugerem que pelo menos uma destas glicoproteínas participaria da interação parasita-célula hospedeira. Não pode ser afastado, no entanto, o envolvimento de outras moléculas.

Em fase do exposto acima torna-se extremamente importante verificar se em outras cepas e clones do T. cruzi esses compostos estão presentes. Conforme descrito no item 3.3.3 (Fig. 22) não conseguimos detectar a presença da Tc 85 na superfície da forma metacíclica do clone 14 (cepa CL), em experimentos preliminares. Analisando comparativamente a infectividade dessas formas com a de tripomastigotas de cultura de tecidos (cepa Y) observamos que a forma metacíclica é 9 vezes menos infectante que a forma tripomastigota (cepa Y) para monocamadas de células LLC-MK₂. Esses dados concordam com

observações anteriores de Bertelli & Brener (1980) mostrando que tripomastigotas da cepa Y são muito mais infectantes que tripomastigotas da cepa CL. Essas diferenças de infectividade poderiam estar correlacionadas com a expressão da Tc 85.

Um soro imune (anti P₂-WGA) que reconhece a Tc 85 foi obtido por imunização de coelhos com o material de formas tripomastigotas (cepa Y) que se liga à WGA-Sepharose (Colli et al. 1984). Esse antisoro inibe moderadamente a infectividade do tripomastigota. Recentemente, Goldenberg et al. (1985) utilizando esse antisoro identificaram um polipeptídeo de 48 kDa, sintetizado in vitro a partir de mRNA purificado da forma metacíclica do clone DM 28c de T. cruzi (cf. Goldenberg et al. 1984). O mRNA da forma epimastigota do mesmo clone não codifica para a síntese desse polipeptídeo no mesmo sistema de tradução in vitro. Esses dados sugerem, portanto, que a Tc 85 ou uma molécula antigenicamente relacionada seria expressa na forma tripomastigota desse clone. Esses resultados reforçam a necessidade de verificar se a Tc 85 é encontrada em outros isolados do T. cruzi.

Estudos recentes realizados em sistemas de mamífero mostram que a tunicamicina também exerce um efeito inibitório na biossíntese de gangliosídeos (Guarnaccia et al. 1983; Yusuf et al. 1983a,b). Nós demonstramos a presença de gangliosídeos em epimastigotas (Confalonieri et al. 1983; Lederkremer et al. 1985) e em tripomastigotas (Couto et al. 1985). Não sabemos, no entanto, se a síntese desses compostos é inibida pela droga. Portanto, até o presente momento, não podemos excluir a possibilidade de que a inibição da interiorização promovida pela tunicamicina não seja decorrente também da inibição da biossíntese de gangliosídeos do parasita.

3.3.7. Ácido siálico: Participação na interiorização?

Piras et al. (1983) mostraram que tripomastigotas recém eclodidos têm seu índice de interiorização aumentado após incubação em meio de cultura axênico contendo soro inativado. Uma vez que dentre os vários soros testados o soro fetal bovino mostrou ser o mais eficiente, esses autores passaram a estu

dar o efeito da fetuína, uma glicoproteína característica do SFB, na interiorização do parasita. Piras et al. (1984) e Piras, R. (comunicação pessoal) encontraram que a fetuína bovina estimula por si só a interiorização do tripomastigota e que um efeito máximo é observado quando os parasitas são trip-sinizados antes da adição da fetuína. Várias outras sialoglicoproteínas (transferrina, fibrinogênio, α -1-antitripsina e mucina) também estimulam a interiorização, se bem que em menor grau. A fetuína desializada (asialofetuína) e o ácido siálico isolado não exercem nenhum efeito. Esses resultados foram interpretados como indicativos de que várias sialoglicoproteínas (algumas normalmente encontradas no sangue de mamíferos) poderiam atuar através de seu resíduo de ácido siálico com componentes de membrana celular do tripomastigota envolvidos na penetração. O mecanismo molecular que explicaria esse efeito não foi estabelecido pelos autores.

Várias evidências na literatura indicam que o T. cruzi é incapaz de sintetizar ácido siálico, tendo que recorrer à hidrólise de compostos do meio (que contêm esse resíduo) a fim de obter precursores para a síntese endógena de glicoproteínas e glicolipídios (Schauer et al. 1983; Pessolani et al. 1984). A atividade neuraminidásica descrita para o T. cruzi (Pereira et al. 1983) participaria deste processo. Sob essa perspectiva, a fetuína (e outras sialoglicoproteínas que estimulam a infectividade) poderia ser uma fonte doadora de resíduos de ácido siálico para componentes da superfície do tripomastigota envolvidos na penetração. A fibronectina, outra sialoglicoproteína que também promove um aumento da adesão e interiorização (Wirth & Kierszenbaum, 1984), poderia desempenhar o mesmo papel.

Em uma comunicação recente, Andrade et al. (1984) demonstraram que epimastigotas tratados com neuraminidase perdem receptores para WGA e são aglutinados por PNA (lectina específica para galactose, açúcar subterminal ao ácido siálico). A capacidade de aglutinação por WGA é recuperada após incubação com fetuína e sialilactose, mas não com ácido siálico. Esses dados levantaram uma hipótese atraente (Andrade et al. 1984)

segundo a qual o T. cruzi possuiria uma transglicosidase de membrana, que seria capaz de transferir o ácido siálico de proteínas exógenas para componentes de sua superfície. Pretendemos testar essa hipótese marcando o resíduo de ácido siálico da fetuína (cf. Blumenfeld et al. 1972), incubar o tripomastigota com essa proteína e determinar em seguida se o ácido siálico marcado foi transferido para glicoproteínas e glicolipídios do T. cruzi, já caracterizados por nós. Essa mesma hipótese poderá ainda ser testada in vitro usando-se um sistema acelar de T. cruzi para aumentar a probabilidade de detectar a atividade transneuraminidásica.

4. COMENTÁRIOS FINAIS

Uma série de evidências experimentais discutidas neste trabalho mostram que a superfície celular da forma tripomastigota do T. cruzi desempenha um papel importante no processo de reconhecimento, adesão e interiorização do parasita em fagócitos não profissionais.

Há cerca de 5 anos nosso grupo definiu uma estratégia de trabalho para tentar caracterizar os componentes da superfície do parasita envolvidos no processo de penetração em células de mamífero em cultura. Nesse sentido, foi definido um sistema que permite quantificar o índice de interiorização do tripomastigota e foram buscadas situações experimentais que levassem à alteração desse parâmetro. O tratamento dos parasitas com anticorpos anti-tripomastigotas, com tripsina, ou ainda com inibidores de síntese proteica (cicloheximida) ou de glicosilação (tunicamicina), promoveu independentemente uma inibição da interiorização que variou de 60% a 90%, de acordo com o agente empregado. Foi observado também que a presença de N-acetil glicosamina durante a infecção promove uma drástica redução da interiorização. Esses dados sugeriram que antígenos de natureza proteica e glicoproteica, específicos da superfície do tripomastigota, estariam envolvidos na penetração do parasita na célula hospedeira.

Esses compostos foram analisados por eletroforese em gel uni e bidimensional após reações de imunoprecipitação

ou cromatografia de afinidade em colunas de lectina-Sepharose. Os testes de imunoprecipitação mostraram que existem antígenos de superfície que são específicos da forma tripomastigota, dentre eles os antígenos de alto peso molecular e a Tc 85. Estes antígenos são sensíveis à tripsina e são glicoproteínas com afinidade por Con A. A Tc 85 é a única glicoproteína específica da superfície do tripomastigota que se liga à WGA-Sepharose. Deve-se lembrar que esta lectina apresenta alta afinidade por resíduos de N-acetil glicosamina, açúcar que inibe drasticamente a infectividade de tripomastigotas de várias cepas e clones.

As glicoproteínas antigênicas de 175-180 kDa, 120-125 kDa, 90 kDa e a Tc 85 têm sua glicosilação inibida por tunicamicina, tratamento esse que também inibe a interiorização. Tomadas em seu conjunto, essas observações fazem supor que pelo menos uma dessas glicoproteínas estaria envolvida no processo de penetração. Infelizmente, até o momento, não temos evidências suficientes que nos permitam afirmar se esses componentes atuariam independentemente ou de maneira concertada, ou ainda se outras moléculas ainda não caracterizadas também participariam no processo.

Uma maneira mais direta de comprovar o papel de determinado componente no processo de infecção seria isolar esse componente e testar, por competição, seu efeito no sistema de infecção in vitro. Até o momento as técnicas bioquímicas de que dispomos não nos permitem tentar este enfoque em virtude, principalmente, da massa limitada de formas infectantes que podemos obter. Conforme discutiremos a seguir a tecnologia do DNA recombinante deverá ser experimentada para resolver esse impasse metodológico.

A interiorização do tripomastigota na célula hospedeira poderia também ser mediada pela ação de enzimas hidrolíticas do tipo proteases, fosfolipases ou glicosidases, que teriam a função de desestabilizar a membrana da célula de mamífero, promovendo a infecção. Ainda não determinamos se os componentes da superfície do tripomastigota, que poderiam estar envolvidos na interiorização, apresentam alguma atividade enzimática. A presença de proteases na superfície de tripanosomas já

foi descrita (Krettli et al. 1980; Rangel et al. 1981). Estas proteases além de atuar no processo de infecção, poderiam participar da resistência que a forma tripomastigota apresenta ao ataque das enzimas hidrolíticas, vertidas no vacúolo parasitóforo pela fusão com o lisossomo (Nogueira & Cohn, 1976), e na destruição de anticorpos dirigidos contra antígenos de superfície do parasita (Krettli et al. 1980). Recentemente Pereira (1983) encontrou que tripomastigotas sanguíneas e de cultura de tecidos apresentam uma atividade neuraminidásica que é 6 a 15 vezes superior do que aquela encontrada em formas de meio de cultura axênico; em amastigotas essa atividade é nula. A neuraminidase do T. cruzi parece ser ativa na infecção experimental, uma vez que eritrócitos obtidos a partir de camundongos infectados são aglutinados pela lectina de amendoim, o que indica sua desialização. As evidências existentes sugerem fortemente que a neuraminidase seria secretada ou estaria associada à membrana do parasita. Observações preliminares (Nogueira, 1983) tendem a correlacionar a glicoproteína de 90 kDa (Snary & Hudson, 1979) com a atividade neuraminidásica. Uma vez que a presença de resíduos de ácido siálico em componentes da superfície de células de mamífero foi amplamente documentada, a participação da neuraminidase do T. cruzi no processo de infecção não pode ser afastada (Pereira, 1983).

Não temos evidências para dizer se os antígenos de superfície, indentificados em nossos estudos de infecção de células de mamífero em cultura, desempenham um papel ativo na infecção de um hospedeiro vivo. Krettli & Brener (1976) mostraram que a transferência passiva de soro imune ou a pré-incubação de tripomastigotas sanguíneas com soro chagásico ou hiperimune, promovia uma redução da parasitemia e da mortalidade dos camundongos, mostrando que os antígenos de superfície do parasita desempenham um papel importante na infecção. Lima & Kierszenbaum (1982) relataram que o pré-tratamento do tripomastigota com pactamicina (um inibidor irreversível da síntese proteica) também levava a uma redução de sua infectividade para animais experimentais. O tratamento de tripomastigotas de cultura de tecidos com 8-metoxi psoralen (uma droga inter-

calante que se liga covalentemente ao DNA) também promove o mesmo efeito (Andrews et al. 1985), tanto para monocamadas de células, quanto para hospedeiros vivos. Essas observações sugerem que os dados obtidos para sistemas de infecção in vitro, poderiam, em parte, ser extrapolados para a situação in vivo. No entanto, é evidente que uma série de outros fatores podem estar influenciando a infecção das células de um hospedeiro vivo.

A tarefa da identificação dos antígenos parasitários relevantes no processo de interiorização continua a ser seguida em nosso laboratório. O racional que tem orientado os estudos é a obtenção de anticorpos específicos dirigidos contra antígenos de superfície do tripomastigota e a verificação de seu poder de inibir a interiorização do parasita em células de mamífero em cultura. Duas metodologias têm sido seguidas: a primeira é a obtenção de anticorpos monoclonais a partir da imunização de camundongos com tripomastigotas atenuados (Alves, Abuin & Colli, em preparação); a segunda é a obtenção de anticorpos policlonais em coelhos através da imunização com antígenos do tripomastigota, isolados em gel preparativo de poliacrilamida-SDS (Arruda, Colli & Zingales, em preparação).

Através dessas metodologias já se obtiveram alguns anticorpos monoclonais e policlonais que inibem parcialmente -(até 70%) a interiorização do tripomastigota. Esses anticorpos serão utilizados no isolamento e caracterização dos antígenos possivelmente envolvidos na interiorização in vitro e em testes de transferência passiva e neutralização, para verificar se os antígenos em estudo desempenham algum papel na infecção de um hospedeiro experimental. Se esses antígenos mostrarem ser relevantes haverá a necessidade de obter uma massa considerável de proteína para uma caracterização biológica e bioquímica mais profunda. Em todos os sistemas parasitários em que é impossível obter grandes quantidades de antígenos de formas patogênicas, a estratégia adotada é recorrer à tecnologia do DNA recombinante para clonar os genes que codificam esses polipeptídios (vide por exemplo o sistema da malária). Pretendemos pois, num futuro próximo, implantar essa tecnologia no laboratório e utilizar os anticorpos monoclonais e policlonais

para detectar os clones recombinantes que expressam o(s) antígeno(s) de interesse. Estes recombinantes serão extremamente importantes para a determinação da estrutura primária do polipeptídeo e para a obtenção de massa do antígeno, permitindo a verificação mais direta de seu papel biológico.

APÊNDICE
MATERIAL E MÉTODOS

Este Apêndice tem por finalidade complementar os dados e as observações apresentadas neste trabalho, no sentido de fornecer ao leitor os detalhes da metodologia empregada nos experimentos descritos.

1. PARASITAS

As formas epimastigotas de várias cepas e clones de T. cruzi foram cultivadas em meio LIT (Castellani et al. 1967) em agitador rotatório a 28°C. Os parasitas de culturas de 3 dias (98% de epimastigotas) foram coletados por centrifugação (800 x g, 10 min) e lavados 4 vezes com PBS (tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,2; NaCl 150 mM). Formas tripomastigotas da cepa Y foram mantidas por passagens semanais em camundongos isogênicos A/Snell. Os parasitas foram purificados dos elementos do sangue por centrifugação em gradiente de Metrizamida (Pereira et al. 1980). Tripomastigotas de cultura de tecidos (cepa Y) foram obtidos a partir do sobrenadante de monocamadas de células LLC-MK₂ (Andrews & Colli, 1982). As formas tripomastigotas foram coletadas por centrifugação (2.500xg, 10 min) e lavadas três vezes em DME ou meio 199. Tripomastigotas metacíclicos do clone 14 (cepa CL), gentilmente cedido pelo Dr. E. Chiari (UFMG), foram obtidos por diferenciação da forma epimastigota em meio M 16 (Chiari, 1981). Os clones e cepas de T. cruzi foram obtidos a partir de hemoculturas de pacientes chagásicos da área de Bambuí (Minas Gerais) e gentilmente cedidos pelo Dr. E. Chiari (UFMG) e Dr. A. Romanha (FIOCRUZ). Esses isolados foram cultivados conforme descrito anteriormente (Chiari et al. 1979). As formas de cultura foram classificadas nos zimodemas A, B, C e D (Romanha et al. 1979a). As formas amastigotas foram purificadas do baço e fígado de camundongos infectados conforme descrito (Katzin & Colli, 1983).

2. ANTISOROS

Soros humanos chagásicos foram obtidos no Hospital das Clínicas (São Paulo) e de pacientes de Bambuí (Minas Gerais). O soro anti-membrana plasmática de epimastigotas foi obtido por imunização de coelhos com vesículas de membrana plasmática (cf. Zingales et al. 1982b). O soro anti-epimastigotas totais foi obtido por imunização de coelhos com formas epimastigotas da cepa Y. O soro anti-glicoproteínas de epimastigotas foi enviado pelo Dr. D. Snary (Wellcome Research Laboratories,

Becknham, Inglaterra). O soro anti-tripomastigotas foi obtido a partir de coelhos infectados com três doses de 10^3 tripomastigotas (cepa Y) de cultura de tecidos. IgG foi isolada a partir de soros de chagásicos e soros normais por precipitação com sulfato de sódio e cromatografia em DEAE-celulose. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). Os soros foram caracterizados por testes de imunofluorescência indireta e aglutinação de parasitas vivos e conservados a -70°C .

3. PURIFICAÇÃO DE GLICOCONJUGADOS

3.1. Obtenção das bandas A, B, C e D. A extração dos parasitas com fenol-água foi realizada segundo Lederkremer et al. (1976). A LPPG foi purificada a partir do complexo de glicoconjugados como descrito anteriormente (Lederkremer et al. 1976).

3.2. Extração do lipídio oligossacarídeo. O lipídio oligossacarídeo foi isolado segundo Parodi (1979) com modificações introduzidas por Zingales et al. (1982a).

3.3. Extração de glicolipídios. Os parasitas foram lisados por congelamentos e degelamentos sucessivos, liofilizados e extraídos duas vezes com clorofórmio/metanol (C/M, 2:1, v/v) por uma hora (Confalonieri et al. 1983). Os sobrenadantes foram combinados e fracionados com KCl 0,1 N, conforme recomendado para o isolamento de gangliosídeos (Dittmer & Wells, 1969).

3.4. Fracionamento de glicolipídios. O extrato C/M (2:1) do item 3.3 foi cromatografado em coluna de sílica gel H sob leve pressão de Nitrogênio. A eluição foi efetuada aumentando-se a concentração de metanol no clorofórmio. As frações A e B obtidas, após remoção dos solventes, foram tratadas com neuraminidase de C. perfringens (Sigma) a 37°C por 24 h, na presença de acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5. A reação enzimática foi interrompida pela adição de um volume igual de C/M (2:1). Após três extrações com esse solvente, as fases superiores foram liofilizadas e preparadas para análise cromatográfica.

3.5. Cromatografia em papel. A fase superior dos extratos C/M (2:1) de glicolipídios tratados com neuraminidase (item 3.4) foi cromatografada em papel Whatman nº 1 com o solvente : n-butanol/ácido acético/água (5:2:2, v/v/v), por 18 horas. A posição dos padrões de ácido N-acetil neuramínico e N-glicolil neuramínico foi determinada após reação colorimétrica com periodato/ácido tiobarbitúrico (cf. Confalonieri et al. 1983).

3.6. Fracionamento de glicosfingolipídios. Basicamente utilizou-se o método descrito por Ledeen et al. (1973) adaptado para o T. cruzi por Lederkremer et al. (1985). Os extratos C/M (item 3.3) dos parasitas foram fracionados em colunas de DEAE-Sephadex-acetato. A fração dos lipídios ácidos foi evaporada e saponificada (cf. Lederkremer et al. 1985). O resíduo foi aplicado em coluna de ácido silícico e os sialoglicolipídios foram eluídos com C/M (1:1, v/v).

3.7. Cromatografia em camada delgada dos sialoglicolipídios. Esta foi desenvolvida em placas de sílica gel (Merck) num sistema bidimensional com o solvente (a) clorofórmio/metanol/ CaCl_2 a quoso 0,2% (5:4:1, v/v/v), na primeira dimensão; e o solvente (b) clorofórmio/metanol/ NH_4OH 2,5 M (5:4:1, v/v/v), na segunda dimensão. Os compostos foram visualizados após fluorografia da placa com 2-metil naftaleno e 2,5-difeniloxazol (Bonner & Stedman, 1978). Em alguns experimentos usou-se cromatografia unidimensional no sistema n-prôpanol/ NH_4OH 28%/água (75:5:5, v/v/v).

3.8. Identificação de aminoalcoóis de cadeia longa. Os glicolipídios detectados no item 3.7 foram removidos da placa de sílica gel, extraídos com hexano (para remover o 2-metil naftaleno) e sonicados em 0,1 ml de água. Após adicionar 1 ml de C/M (1:1, v/v) os sobrenadantes foram separados, fazendo-se outra extração com água/clorofórmio/metanol (1:5:5, v/v/v). Os sobrenadantes foram combinados, evaporados e os glicolipídios hidrolisados por aquecimento a 70-78°C por 18 horas em HCl concentrado/metanol/água (3:29:4, v/v/v). O hidrolisado foi alcalinizado, extraído com éter etílico e submetido a cromatografia em

camada delgada (placas de sílica gel), desenvolvida com clorofórmio/metanol/ NH_4OH 1 M (40:10:1, v/v/v).

4. MARCAÇÃO DE COMPONENTES DA SUPERFÍCIE

4.1. Marcação de proteínas de superfície por radioiodação. Os parasitas (10^8 células) foram incubados em 0,5 - 1 ml de PBS contendo 250-500 μCi de Na^{131}I (IPEN, São Paulo) em tubos de vidro encapados com 20 μg de Iodo-gen (Pierce) por 10 minutos a 4°C . Após marcação os parasitas foram lavados 3 vezes (vide item 1) e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida, imunoprecipitação ou cromatografia de afinidade, conforme especificado. A eficiência da marcação foi determinada após precipitação de alíquotas de parasitas (5×10^6 células) com TCA 10% (p/v), filtração em membranas de nitrocelulose e contagem em contador gama (Beckman).

4.2. Marcação de gliconjugados da superfície com galactose oxidase. Os parasitas (2×10^8 células) foram ressuspensos em 0,4 ml de PBS contendo 0,1 mg de galactose oxidase (Worthington) e incubados por 40 minutos a 30°C . Em seguida adicionou-se 0,021 mg de NaB^3H_4 (New England Nuclear, a.e. = 282 mCi/mmol) procedendo-se a uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 5 ml de PBS contendo 1 mg/ml de NaBH_4 e os parasitas foram lavados 3 vezes com o mesmo tampão. A eficiência de marcação foi determinada como descrito no item 4.1 em contador de cintilação líquida (Beckman).

4.3. Marcação de glicoconjugados de superfície com metaperiodato-borohidreto. Os parasitas (2×10^8 células) foram incubados em 0,4 ml de PBS contendo 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de NaBH_4 por 30 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas em seguida por 20 minutos à temperatura ambiente, no escuro, com PBS contendo metaperiodato de sódio 20 mM. A oxidação foi interrompida diluindo-se as células com tampão frio. Após duas lavagens os parasitas foram ressuspensos em 0,2 ml de PBS contendo 0,0175 mg de NaB^3H_4 (New England

Nuclear, a.e. = 282 mCi/mmol) e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após redução as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 1 mg/ml de NaBH_4 não radioativo. A eficiência de marcação foi determinada conforme descrito no item 4.1, em contador de cintilação líquido.

5. MARCAÇÃO METABÓLICA

5.1. Com (^{35}S)-Metionina. Tripomastigotas (5×10^7 células/ml) foram cultivados em DME (sem metionina) contendo 5% de SFB e 25-50 $\mu\text{Ci/ml}$ de (^{35}S)-metionina (Amersham, a.e. = 1200 Ci/mmol), a 37°C em estufa umidificada com fluxo de 5% de CO_2 , pelos tempos especificados.

5.2. Com (^3H)-Manose. Tripomastigotas (5×10^7 células/ml) foram cultivados em DME (sem glicose) suplementado com 30 $\mu\text{g/ml}$ de manose, 5% SFB e 50 $\mu\text{Ci/ml}$ de D-2(^3H)-manose (New England Nuclear, a.e. = 10 Ci/mmol). As células foram incubadas por 1 hora nas condições descritas acima.

5.3. Com (^3H)-Galactose. Os parasitas ($5 \times 10^7/\text{ml}$) foram cultivados em meio Boné & Parent (1963), no caso de epimastigotas, e em meio DME (suplementado com 100 $\mu\text{g/ml}$ de glicose, 3 $\mu\text{g/ml}$ de galactose e 5% de SFB), no caso de tripomastigotas. A ambas as culturas adicionou-se 20 $\mu\text{Ci/ml}$ de D-1-(^3H)-galactose (Amersham, a.e. = 10,4 Ci/mmol). As formas epimastigotas foram incubadas 12 horas a 28°C , ao passo que as formas tripomastigotas foram mantidas por 6 horas a 37°C (em estufa umidificada com 5% de CO_2).

5.4. Com Ácido (^3H)-Palmítico. Os parasitas ($5 \times 10^7/\text{ml}$) foram incubados nas condições descritas no item 5.3 em meio de cultura contendo 20 $\mu\text{Ci/ml}$ de ácido palmítico (9,10 n- ^3H) (Amersham, a.e. = 500 mCi/mmol). As formas epimastigotas foram incubadas 12 horas a 28°C e as formas tripomastigotas 7,5 horas a 37°C .

5.5. Com (^{14}C)-Glicose. Os epimastigotas ($6 \times 10^7/\text{ml}$) foram cultivados em meio de Boné & Parent (1963) sem glicose por 2

horas. Em seguida adicionou-se 9,6 $\mu\text{Ci/ml}$ de D-(^{14}C)-glicose (New England Nuclear, a.e. = 4,8 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), realizando-se uma incubação por 16 horas a 28°C . Após esse período adicionou-se 2 mg/ml de glicose não radioativa, procedendo-se a uma incubação adicional de 4 horas.

5.6. Determinação da radioatividade incorporada. Em todos os casos, após marcação metabólica, os parasitas foram lavados duas vezes (vide item 1), e a radioatividade incorporada foi determinada em alíquotas de 5×10^6 células após precipitação com TCA, conforme descrito no item 4.1. A eficiência de marcação foi medida em contador de cintilação líquida.

6. ISOLAMENTO DE GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE

Os parasitas (2×10^8) radioiodados ou marcados metabolicamente com (^{35}S)-metionina foram lisados em Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, Nonidet P-40 2% (v/v) contendo os seguintes inibidores de protease: TLCK 1 mM, PMSF 1 mM, ácido ϵ -amino caprótico 10 mM, aprotinina 2,8 unidades/ml e antipain 25 $\mu\text{g/ml}$, por incubação a 37°C por 30 minutos. Após centrifugação a $10.000 \times g$ por 30 minutos a 4°C o sobrenadante foi aplicado a colunas de 1 ml de Sepharose acoplada a lectinas. Utilizou-se LCA-Sepharose, Con A-Sepharose ou WGA-Sepharose (Pharmacia) conforme especificado. A eluição foi monitorada em contador gama ou de cintilação líquida, de acordo com o radioisótopo usado. O material não ligado à resina foi lavado com o mesmo tampão utilizado para a lise dos parasitas. As glicoproteínas ligadas foram eluídas com 0,1 M do açúcar competidor, dissolvido no mesmo tampão de lise. Para LCA-Sepharose usou-se α -metil manosídeo; para Con A-Sepharose, α -metil manosídeo e α -metil glicopiranosídeo; para WGA-Sepharose, N-acetil-D-glicosamina. As frações eluídas foram reunidas, precipitadas com 3 volumes de etanol frio (-20°C , 48 horas) e coletadas por centrifugação a $10.000 \times g$ por 30 minutos. Após dissolução em tampão adequado foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida.

7. IMUNOPRECIPITAÇÃO

Dois protocolos diferentes foram usados: o Protocolo I, com lisado total de parasitas e o Protocolo II, com parasitas vivos. No primeiro caso os parasitas (2×10^8 /ml) foram lisados com Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), Nonidet P-40 1% (v/v) contendo TLCK 1 mM, PMSF 1 mM e aprotinina 2,8 unidades/ml por incubação a 37°C por 10 minutos. Os lisados foram centrifugados a 10.000xg por 30 minutos (a 4°C) e o sobrenadante utilizado imediatamente. Aliquotas de lisado correspondentes a 3×10^7 células foram incubadas com soro normal ou imune (na diluição adequada) por períodos que variavam entre 2 a 14 horas a 4°C. Em alguns casos o lisado foi pré-absorvido com Staphylococcus aureus (formolizado e inativado pelo calor, conforme descrito por Kessler, 1975) e soro normal, antes de ser incubado com o soro imune. Este procedimento foi adotado para remover os componentes do T. cruzi que interagiam inespecificamente com o imunoadsorvente. Após a reação com o soro imune, adicionou-se 50 µl - 70 µl de uma suspensão de S. aureus (10%, p/v), incubando-se por 30 minutos à temperatura ambiente. Os imunocomplexos formados foram lavados 3 vezes (cf. Zingales et al. 1982b) e ressuspensos em tampão de eletroforese adequado. A radioatividade imunoprecipitada foi quantificada.

Para a identificação dos antígenos de superfície de parasitas marcados com (35 S)-metionina, utilizou-se o Protocolo II. Neste caso os parasitas vivos (5×10^7 células) foram incubados em 1 ml de DME contendo 700 µg de IgG (imune ou normal), por 1 hora a 4°C, com agitação lenta. Em seguida, os parasitas foram lavados com DME, lisados com 250 µl de tampão de lise do Protocolo I e centrifugados a 10.000xg por 30 minutos. Os imunocomplexos foram precipitados com 100 µl de uma suspensão de S. aureus, lavados e preparados para eletroforese como descrito acima.

As imunoprecipitações sequenciais para a detecção de antígenos estágio-específicos foram conduzidas segundo Zingales et al. (1982b). O lisado de parasitas foi incubado com o primeiro antisoro, nas condições descritas no Protocolo I. Os imunocomplexos foram precipitados com S. aureus e o

sobrenadante foi incubado novamente com o primeiro antisoro, nas condições acima. Após quatro absorções análogas, o sobrenadante final foi incubado com o segundo antisoro, para revelar os antígenos específicos. Os complexos antígeno-anticorpo foram processados como descrito no Protocolo I.

8. ELETROFORESE EM GEL

8.1. Gel unidimensional de poliacrilamida-SDS. A eletroforese foi realizada em placas de acordo com Laemmli (1970), em sistemas únicos (10%) ou em gradientes lineares de poliacrilamida-SDS (concentração 8-15%, 5-12% ou 7-14%, dependendo do material a ser analisado). Padrões proteicos de P.M. conhecido foram analisados em cada gel. Após a corrida o gel foi fixado, corado, descorado, secado e exposto para autoradiografia. Géis contendo compostos marcados com (^{35}S)-metionina ou com precursores tritiados ou com Carbono-14 foram processados para fluorografia (Bonner & Laskey, 1974) antes de serem expostos para autoradiografia. Exposições curtas e longas foram feitas para cada gel.

8.2. Eletroforese bidimensional. A eletroforese bidimensional foi realizada fazendo-se uma focalização isoelétrica na primeira dimensão nas condições de equilíbrio descritas por O'Farrell (1975) e adaptadas para a análise dos polipeptídios de T. cruzi por Andrews et al. (1984). A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida-SDS, como descrito acima.

9. INTERIORIZAÇÃO DO T. CRUZI EM CÉLULAS DE MAMÍFERO

O sistema adotado foi descrito por Andrews & Colli (1972). Monocamadas confluentes ou subconfluentes (dependendo do experimento) de células LLC-MK₂ ou HeLa foram cultivadas em DME-5% SFB em lamínulas contidas em placas de Petri. As monocamadas foram infectadas com suspensões de parasitas por períodos de tempo que variavam de 1 hora a 3 horas (ou tempos mais longos, conforme especificado) em temperaturas de 37°C, 34°C

ou 4°C, de acordo com o experimento. As incubações a 37°C ou 34°C foram realizadas em estufa umidificada com fluxo de 5% de CO₂. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS (para remover os parasitas não aderidos), tratadas com um pulso de água por dois minutos (quando se queria determinar o número de parasitas interiorizados) e lavadas mais três vezes com PBS. Após fixação e coloração com Giemsa (Andrews & Colli, 1972) as preparações foram analisadas em microscópio Nikon HFM optiphot. Os resultados expressos são a média de três lamínulas onde pelo menos 200 células por lamínula foram observadas. O número de parasitas associados com as células foi calculado e expresso em número de parasitas por 100 células. Cada experimento foi repetido no mínimo três vezes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcântara, A. & Brener, Z. (1978) The in vitro interaction of Trypanosoma cruzi blood stream forms and mouse peritoneal macrophages. Acta Trop. 33: 209-219.
- Alcântara, A. & Brener, Z. (1980) Trypanosoma cruzi: role of macrophage membrane components in the phagocytosis of blood stream forms. Exp. Parasitol. 50: 1-6.
- Alexander, J. (1975) Effect of the antiphagocytic agent cytochalasin B on macrophage invasion by Leishmania mexicana promastigotes and Trypanosoma cruzi epimastigotes J. Protozool. 22: 237-240.
- Alves, M.J.M. & Colli, W. (1974) Agglutination of Trypanosoma cruzi by concanavalin A. J. Protozool. 21: 575-578.
- Alves, M.J.M. & Colli, W. (1975) Glycoproteins from Trypanosoma cruzi: partial purification by gel chromatography. FEBS Lett. 52: 188-190. ✓
- Alves, M.J.M., da Silveira, J.F., De Paiva, C.H.R., Tanaka, C.T. & Colli, W. (1979) Evidence for the plasma membrane localization of carbohydrate-containing macromolecules from epimastigote form of Trypanosoma cruzi. FEBS Lett. 99: 81-85. ✓
- Andrade, A.F.B.; Mendonça-Previato, L., Pessolani, M.C.V. & Previato, J.O. (1984) Transglycosidase for sialic acid. An hypothesis for addition of sialic acid residues on cell surface of Trypanosoma cruzi epimastigotes. Em: XI Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu, Brasil, p. 87.
- Andrews, N.W. (1983) Papel da superfície celular do Trypanosoma cruzi na interação com células de mamífero em cultura. Tese, Universidade de São Paulo.
- Andrews, N.W. & Colli, W. (1981) Interiorization of Trypanosoma cruzi in cultured mammalian cells. Inhibition by N-acetyl-D-glucosamine. Em: VIII Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu, Brasil, p. 81.
- Andrews, N.W. & Colli, W. (1982) Adhesion and interiorization of Trypanosoma cruzi in mammalian cells. J. Protozool. 29: 264-269.
- Andrews, N.W., Katzin, A.M. & Colli, W. (1984) Mapping of surface glycoproteins of Trypanosoma cruzi by two-dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity. Eur. J. Biochem. 140: 599-604.
- Andrews, N.W., Alves, M.J.M., Schumacher, R.I. & Colli, W. (1985) Trypanosoma cruzi: protection in mice immunized with 8-methoxy-psoralen inactivated trypomastigotes. Exp. Parasitol. (no prelo).

- Araujo, F.G. & Remington, J.S. (1981) Characterization of stages and strains of Trypanosoma cruzi by analysis of cell membrane components. J. Immunol. 127: 855-859.
- Araujo, F.G., Handman, E. & Remington, J.S. (1980) Binding of lectins to the cell surface of Trypanosoma cruzi. J. Protozool. 27: 397-400.
- Bertelli, M.S.M. & Brener, Z. (1980) Infection of tissue culture cells with blood stream trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. J. Parasitol. 66; 992-997.
- Blumenfeld, O.O., Gallop, P.M. & Liao, T.H. (1972) Modification and introduction of a specific radioactive label into erythrocyte membrane sialoglycoproteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48: 242-251.
- Boné, G.J. & Parent, G. (1963) Stearic acid - an essential growth factor for Trypanosoma cruzi. J. Gen. Microbiol. 31: 261-266.
- Bonner, M.W. & Laskey, R.A. (1974) A film detection method for tritium labelled proteins and nucleic acids in polyacrilamide gels. Eur. J. Biochem. 46: 83-88.
- Bonner, M.W. & Stedman, J.D. (1978) Efficient fluorography of ³H and ¹⁴C on thin layer. Anal. Biochem. 89: 247-256.
- Brener, Z. (1973) Biology of Trypanosoma cruzi. Annu. Rev. Microbiol. 27: 347-383.
- Brener, Z. (1980) Immunity to Trypanosoma cruzi. Adv. Parasitol. 18:247-292.
- Brener, Z. (1984) Laboratory-acquired Chagas' disease: an endemic disease among parasitologists? Em: Morel, C.M. (ed.) Genes and antigens of parasites - a laboratory manual, 2^a ed. FIOCRUZ, Rio de Janeiro. pp. 3-9.
- Brener, Z. & Camargo, E.P. (1982) Perspectives of vaccination in Chagas' disease. Pont. Acad. Sci. Scripta Varia 47: 145-168.
- Brener, Z. & Chiari, E. (1963) Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 5: 220-224.
- Camargo, E.P., Barbieri, C.L. & Jankevicius, J.V. (1982) Possible artifacts in the radioiodination of surface proteins of trypanosomatids. J. Immunol. Meth. 52: 245-253.
- Castellani, O., Ribeiro, L.V. & Ferreira, J.F. (1967) Differentiation of Trypanosoma cruzi in culture. J. Protozool. 14: 447-451.
- Chiari, E. (1981) Diferenciação do Trypanosoma cruzi em cultura. Tese, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Chiari, E., De Souza, W., Romanha, A.J., Chiari, C.A. & Brener, Z. (1978) Concanavalin A receptors on the cell membrane of Trypanosoma cruzi. Acta Trop. 35: 113-121.
- Chiari, E., Dias, J.C.P., Lana, M. & Chiari, C.A. (1979) Hemocultures for the parasitological diagnosis of human Chagas' disease in the chronic phase. Em: Congresso Internacional sobre Doença de Chagas, Rio de Janeiro, Brasil, res. N1.
- Colli, W. (1979) Chagas' disease. Em: Wallach D.F.H. (ed.) The membrane pathobiology of tropical disease. Schwabe, Basel, pp. 131-153 (Tropical research Series).
- Colli, W., Andrews, N.W. & Zingales, B. (1981) Surface determinants in American trypanosomes. Em: Schweiger, H.G. (ed.) International cell biology 1980/1981, Springer, Berlin Heidelberg New York. pp. 401-410.
- Colli, W., Katzin, A.M., Andrews, N.W., Kuwajima, V.Y., Gonçalves, M.F., Abuin, G., Alves, M.J.M. & Zingales, B. (1984) Perspectives of vaccination against Chagas' disease through biotechnology. I. Definition of relevant antigens possibly involved in parasite-host cell interaction. Em: Bell, R., Torrigiani, G. (eds.) New approaches to vaccine development. Schwabe, Basel, pp. 418-441.
- Confalonieri, A.N., Martin, N.F., Zingales, B., Colli, W. & Lederkremer, R.M. (1983) Sialoglycolipids in Trypanosoma cruzi. Biochem. Intern. 7: 215-222.
- Couto, A.S., Zingales, B., Lederkremer, R.M. & Colli, W. (1985) Trypanosoma cruzi: metabolic labeling of trypomastigote sialoglycolipids. Experientia (no prelo).
- Crane, M.S.J. & Dvorak, J.A. (1979) Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells. DNA synthesis and growth of intracellular amastigotes and their relationship to host cell DNA synthesis and growth. J. Protozool. 26: 599-604.
- Crane, M.S.J. & Dvorak, J.A. (1980) Trypanosoma cruzi: pattern of RNA synthesis following infection of vertebrate cells. J. Protozool. 27: 336-338.
- Crane, M.S.J. & Dvorak, J.A. (1982) Influence of monosaccharides on the infection of vertebrate cells by Trypanosoma cruzi and Toxoplasma gondii. Mol. Biochem. Parasitol. 5: 333-341.
- Deane, M.P., Souza, M.A., Pereira, N.M., Gonçalves, A.M., Momen, H. & Morel, C.M. (1984) Trypanosoma cruzi: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analyses. J. Protozool. 31: 276-280.
- De Souza, W. (1983) Cell biology of Trypanosoma cruzi. Int. Rev. Cytol. 86: 197-283.

- De Souza, W., Martinez-Palomo, A. & Gonzales-Robles, A. (1978) The cell surface of Trypanosoma cruzi. J.Cell Sci. 33:285-299.
- Dittmer, J.C. & Wells, A.M. (1969) Quantitative and qualitative analysis of lipid components. Em: Lowenstein, J.M. (ed.) Methods in Enzymol. vol. XIV pp. 482-530.
- Dusanic, D.G. (1980) "In vitro" production of metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. J. Parasitol. 66:1046-1049.
- Dvorak, J.A. (1984) The natural heterogeneity of Trypanosoma cruzi: biological and medical implications. J. Cell Biochem. 24: 357-371.
- Dvorak, J.A. & Crane, M.S.J. (1981) Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites. Science 214: 1034-1036.
- Dvorak, J.A. & Howe, C.L. (1976) The attraction of Trypanosoma cruzi to vertebrate cells "in vitro". J. Protozool. 23: 534-537.
- Dvorak, J.A. & Hyde, T.P. (1973) Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells "in vitro". I. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. Exp. Parasitol. 34: 268-283.
- Elbein, A.D. (1981) The tunicamycins - useful tools for studies on glycoproteins. Trends Biochem. Sci. 6: 219-221.
- Franco da Silveira, J., Abrahamsohn, P.A. & Colli, W. (1979) Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of Trypanosoma cruzi. Biochim. Biophys. Acta 550: 222-232.
- Goldenberg, S., Contreras, V.T., Salles, J.M., Franco, M.P.A.L., Bonaldo, M.C., Valle D., Gonçalves, A.M. & Morel, C.M. (1984) Perspectives of vaccination against Chagas' disease through biotechnology. II. Gene expression in Trypanosoma cruzi trypomastigotes and cell free translation of mRNAs coding for relevant antigens. Em: Bell, R., Torrigiani, G. (eds.) New approaches to vaccine development. Schwabe, Basel. pp. 442-459.
- Goldenberg, S., Salles, J.M., Contreras, V.T., Lima Franco, M.P., Katzin, A.M., Colli, W. & Morel, C.M. (1985) Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. FEBS Lett. 180:265-270.
- González-Cappa, S.M., Kloetzel, J., Katzin, A.M. & Ribeiro dos Santos, R. (1980) Trypanosoma cruzi: activity of immune sera on surface antigens. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 22:275-280.
- Guarnaccia, S.P., Shaper J.H. & Schnaar, R.L. (1983) Tunicamycin inhibits ganglioside biosynthesis in neuronal cells. Proc. Natl. Sci. USA 80: 1551-1555.
- Gutteridge, W.E., Cover, B. & Gaborak, M. (1978) Isolation of blood and intracellular forms of Trypanosoma cruzi from rats and other rodents and preliminary studies of their metabolism. Parasitology 76: 153-176.

- Henriquez, D., Piras, R. & Piras, M.M. (1981a) Surface membrane interactions of Trypanosoma cruzi and Vero cells: dissociation of the adhesion and penetration steps. J. Cell Biol. 9:108a.
- Henriquez, D., Piras, R. & Piras, M.M. (1981b) The effect of surface membrane modification of fibroblastic cells on the entry process of Trypanosoma cruzi trypomastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 2: 359-366.
- Hoare, C.A. (1972) The trypanosomes of mammals. Blackwell Sci. Oxford. p. 749.
- Hoare, C.A. & Wallace, F.G. (1966) Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. Nature 212: 1385-1386.
- Hyde, T.P. & Dvorak, J.A. (1973) Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells "in vitro". II. Quantitative analysis of the penetration phase. Exp. Parasitol. 54: 284-294.
- Hudson, L., Snary, D. & Morgan, S.J. (1984) Trypanosoma cruzi: continuous cultivation with murine cell lines. Parasitology 88: 283-294.
- Jones, T.C., Yeh, S. & Hirsch, J.G. (1972) The interaction between Toxoplasma gondii and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. J. Exp. Med. 136: 1157-1172.
- Katzin, A.M. & Colli, W. (1983) Lectin receptors in Trypanosoma cruzi, an N-acetyl-D-glucosamine containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. Biochim. Biophys. Acta 727:403-411.
- Kessler, S.W. (1975) Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. J. Immunol. 115: 1617-1624.
- Kierszenbaum, F., Gottlieb, C.A. & Budzko, D.B. (1981) Antibody-independent natural resistance of birds to Trypanosoma cruzi infection. J. Parasitol. 67: 656-660.
- Kipnis, T.L., Calich, V.L.G. & Dias da Silva, W. (1979) Active entry blood stream forms of Trypanosoma cruzi into macrophages. Parasitology 78: 89-99.
- Kipnis, T.L., David, J.R., Alper, C.A., Sher, A. & Dias da Silva, W. (1981) Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of Trypanosoma cruzi into activators of the alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:602-605.
- Kirchoff, L.V., Engel, J.C., Dvorak, J.A. & Sher, A. (1984a) Strains and clones of Trypanosoma cruzi differ in their expression of a surface antigen identified by a monoclonal antibody. Mol. Biochem. Parasitol. 11: 81-89.

- Kirchoff, L.V., Hieny, S., Shiver, G.M., Snary, D. & Sher, A. (1984b) Cryptic epitope explains the failure of a monoclonal antibody to bind to certain isolates of Trypanosoma cruzi. J. Immunol. 133: 2731-2735.
- Kloetzel, J. & Deane, M.P. (1977) Presence of immunoglobulins on the surface of blood stream of Trypanosoma cruzi. Capping during differentiation in culture. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 19:397-402.
- Kramer, R.H. & Canellakis, E.S. (1979) The surface glycoproteins of the HeLa cell. Internalization of wheat germ agglutinin-receptors. Biochim. Biophys. Acta 551:328-348.
- Krettli, A.U. & Brener, Z. (1976) Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections. J. Immunol. 116: 755-760.
- Krettli, A.U., Weisz-Carrington, P. & Nussenzweig, R.S. (1979) Membrane-bound antibodies to bloodstream Trypanosoma cruzi in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. Clin. exp. Immunol. 37: 416-423.
- Krettli, A., Thomas, N. & Eisen, H. (1980) Escape mechanism of Trypanosoma cruzi from the host immune system. Em: Israel, L., Lagrange, P. & Salomon, J.C. (eds.). Les Colloques de L'INSERM - Cancer immunology and parasite immunology, Paris, França, pp. 553-558.
- Kuwajima, V.Y. & Colli, W. (1983) Fatores que determinam a interiorização de Trypanosoma cruzi em células de mamífero. Em: X Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu, Brasil, BQ59.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Ledeen, R.W., Yu, R.K. & Eng, L.F. (1973) Gangliosides of human myelin: sialosylgalactosylceramide (G₇) as a major component. J. Neurochem. 21: 829-839.
- Lederkremer, R.M., Alves, M.J.M., Fonseca, G.C. & Colli, W. (1976) A lipopeptidophosphoglycan from Trypanosoma cruzi (epimastigote). Isolation, purification and carbohydrate composition. Biochem. Biophys. Acta 444: 85-96. ✓
- Lederkremer, R.M., Tanaka, C.T., Alves, M.J.M. & Colli, W. (1977) Lipopeptidophosphoglycan from Trypanosoma cruzi. Amide and ester-linked fatty acids. Eur. J. Biochem. 74: 263-267.
- Lederkremer, R.M., Casal, O.L., Alves, M.J.M. & Colli, W. (1980) Evidence for the presence of D-galactofuranose in the lipopeptidophosphoglycan from Trypanosoma cruzi. FEBS Lett. 116: 25-29.

- Lederkremer, R.M., Zingales, B., Confalonieri, A.N., Couto, A.S., Martin, N.F. & Colli, W. (1985) "In vivo" incorporation of palmitic acid and galactose in glycolipids of Trypanosoma cruzi epimastigotes. Biochem. Int. 10: 79-88.
- Lehle, L. & Tanner, W. (1976) The specific site of tunicamycin inhibition in the formation of dolichol-bound N-acetyl-glucosamine derivatives. FEBS Lett. 71: 167-170.
- Liao, T.H., Gallop, P.M. & Blumenfeld, O.A. (1973) Modification of sialyl residues of sialoglyco-protein(s) of the human erythrocyte surface. J. Biol. Chem. 248: 8247-8253.
- Lima, M.F. & Kierszenbaum, F. (1982) Biochemical requirements for intracellular invasion by Trypanosoma cruzi: protein synthesis. J. Protozool. 29:566-579.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Meirelles, M.N.L., Araujo Jorge, T.C. & De Souza, W. (1982a) Interaction of Trypanosoma cruzi with macrophages "in vitro": dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B. Z. Parasitenkd 68: 7-14.
- Meirelles, M.N.L., Chiari, E. & De Souza, W. (1982b) Interaction of blood stream, tissue culture-derived and axenic culture-derived trypomastigotes of Trypanosoma cruzi with macrophages. Acta Trop. 39:195-205.
- Meirelles, M.N.L., Martinez-Palomo, A., Souto-Padron, T. & De Souza, W. (1983) Participation of concanavalin A binding sites in the interaction between Trypanosoma cruzi and macrophages. J. Cell Sci. 62: 287-299.
- Melo, R.C. & Brener, Z. (1978) Tissue tropism of different strains. J. Parasitol. 64: 475-482.
- Meyer, H. (1942) Culturas de tecido nervoso infectadas por Schizotrypanum cruzi. Anais Acad. Brasil.Cien. 14: 253-256.
- Meyer, H. & Xavier de Oliveira, F. (1948) Cultivation of Trypanosoma cruzi in tissue culture: a four-year study. Parasitology 39: 91-94.
- Miles, M.A., Souza, A., Póvoa, M., Shaw, J.J., Lainson, R. & Toye, P.J. (1978) Isozymic heterogeneity of Trypanosoma cruzi in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. Nature 272:819-821.
- Miles, M.A., Póvoa, M.M., Prata, A., Cedillos, R.A., De Souza, A.A. & Macedo, V. (1981) Do radically dissimilar Trypanosoma cruzi strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? Lancet 20: 1338-1340.

- Morel, C., Chiari, E., Camargo, E.P., Mattei, D.M., Romanha, A.J. & Simpson, L. (1980) Strains and clones of Trypanosoma cruzi can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6810-6814.
- Morel, C.M., Gonçalves, A.M., Chiari, E., Deane, M.P., Carneiro, M. & Romanha, A.J. (1984) Schizodeme characterization of natural and artificial populations of Trypanosoma cruzi as a tool in the study of Chagas' disease. Em: Newton, B.N. & Michal, F. (eds.) New approaches in the identification of parasites and their vectors, WHO, Geneva, Suíça. pp. 253-275.
- 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: 563-572.
- Nery-Guimarães, F. & Lage, H.A. (1972) A refratariedade das aves ao Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi. II. Refratariedade das galinhas desde o crescimento; persistência da refratariedade após bursectomia, infecções em ovos embrionados. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 70: 97-107.
- Nogueira, N. (1983) Host and parasite factors affecting the invasion of mononuclear phagocytes by Trypanosoma cruzi. Em: Cytopathology of parasitic disease. Pitman, London. pp. 52-73 (Ciba Foundation Symposium 99).
- Nogueira, N. & Cohn, Z. (1976) Trypanosoma cruzi: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. J. Exp. Med. 143: 1402-1420.
- Nogueira, N., Bianco, C. & Cohn, Z. (1975) Studies of the selective lysis and purification of Trypanosoma cruzi. J. Exp. Med. 142: 224-229.
- Nogueira, N., Chaplan, S. & Cohn, Z. (1980) Trypanosoma cruzi: factors modifying ingestion and fate of bloodform trypomastigotes. J. Exp. Med. 152: 447-451.
- Nogueira, N., Chaplan, S., Tydings, J.D., Unkeless, J. & Cohn, Z. (1981) Trypanosoma cruzi: surface antigens of blood and culture forms. J. Exp. Med. 153: 629-639.
- Nogueira, N., Unkeless, J. & Cohn, Z. (1982) Specific glycoprotein antigens on the surface of insect and mammalian stages of Trypanosoma cruzi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1259-1263.
- Nussenzweig, V., Deane, L.M. & Kloetzel, J. (1963a) Differences in antigenic constitution of strains of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasitol. 14: 221-232.
- Nussenzweig, V., Kloetzel, J. & Deane, L.M. (1963b) Acquired immunity in mice infected with strains of immunological types A and B of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasitol. 14: 233-239.

- Nussenzweig, V. & Goble, F.C. (1966) Further studies on the antigenic constitution of strains of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi. Exp. Parasitol. 18: 224-230.
- O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, J. Biol. Chem. 250: 4007-4021.
- Ouaissi, M.A., Afchain, D., Capron, A. & Grimaud, J.A. (1984) Fibronectin receptors on Trypanosoma cruzi trypomastigotes and their biological function. Nature 308: 380-382.
- Pan, S.C. (1978) Trypanosoma cruzi: intracellular stages grown in cell-free medium at 37°C. Exp. Parasitol. 42: 215-224.
- Parodi, A.J. (1979) Biosynthesis of yeast glycoproteins. Processing of the oligosaccharides transferred from dolichol derivatives. J. Biol. Chem. 254: 10051-10060.
- Pereira, M.E.A. (1983) A developmentally regulated neuraminidase activity in Trypanosoma cruzi. Science 219: 1444-1446.
- Pereira, M.E.A., Loures, M.A., Villalta, F. & Andrade, A.F.B. (1980) Lectin receptors as markers for Trypanosoma cruzi. J. Exp. Med. 152:1375-1392.
- Pessolani, C.V., Andrade, A.F.M., Mendonça-Previato, L. & Previato, J.O. (1984) Chemical analysis of sialogalactomannan-protein from Trypanosoma cruzi: evidence that the sialic acid residues are taken up from the culture medium. Arq. Biol. Tecnol. 27:159.
- Phillips, D.R. & Gartner, T.K. (1980) Cell recognition systems in eukaryotic cells. Em: Cuatrecasas, P. & Greaves, M.F. (eds.) Receptors and recognition. Chapman & Hall, London. vol. 6, series B, pp. 400-438.
- Piras, R., Henriquez, D. & Piras, M.M. (1980) Studies on host-parasite interactions: role of fibroblastic cell surface functions and Trypanosoma cruzi forms in the infective process. In: van den Bosche, H. (ed.) Host-invader interplay. Elsevier/North-Holland Biomedical, Amsterdam, pp. 131-134.
- Piras, M.M., Piras, R. & Henriquez, D. (1982a) Changes in morphology and infectivity of cell cultured-derived trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 6: 67-81.
- Piras, R., Piras, M.M. & Henriquez, D. (1982b) The effect of inhibitors of macromolecular biosynthesis on the in vitro infectivity and morphology of Trypanosoma cruzi trypomastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 6: 83-92.
- Piras, R., Piras, M.M. & Henriquez, D. (1983) Trypanosoma cruzi-fibroblastic cell interaction necessary for cellular invasion In: Cytopathology of parasitic disease. Pitman. London. pp. 31-55 (Ciba Foundation Symposium 99).

- Piras, R., Piras, M.M. & Henriquez, D. (1984) Studies on the in vitro interaction of Trypanosoma cruzi-fibroblastic cell. Em: IV Pan-American Biochemistry Congress, Buenos Aires, Argentina, Res. 93.
- Plata, F., Pons, F.G. & Eisen, H. (1984) Antigenic polymorphism of Trypanosoma cruzi: clonal analysis of trypomastigote surface antigens. Eur. J. Immunol. 14: 392-399.
- Rabinovitch, M. (1967) The dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis by macrophages. Exp. Cell Res. 46:19-28.
- Rabinovitch, M. (1968) Phagocytosis: the engulfment stage. Semin Hematol 5:134-155.
- Rangel, H.A., Araujo, P.M.F., Camargo, I.K.B., Bonfitto, M., Repka, D., Sakurada, J.K. & Atta, A.M. (1981) Detection of a proteinase common to epimastigote, trypomastigote and amastigote of different strains of Trypanosoma cruzi. Tropenmed. Parasitol. 32: 87-92.
- Romanha, A.J. (1982) Heterogeneidade isoenzimática em Trypanosoma cruzi. Tese, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Romanha, A.J., Pereira, A.A.S., Chiari, E. & Dias, J.C.P. (1979a) Isoenzyme patterns of Trypanosoma cruzi isolated from patients with Chagas' disease. Em: Congresso Internacional sobre Doença de Chagas, Rio de Janeiro, Brasil, Res.70.
- Romanha, A.J., Pereira, A.A.S., Chiari, E. & Kilgour, V. (1979b) Isoenzyme patterns of cultured Trypanosoma cruzi: changes after prolonged subculture. Comp. Biochem. Physiol. 62B:139-142.
- Schauer, R., Reuter, G., Mühlpfordt, H., Andrade, A.F.B., & Pereira, M.E.A. (1983) The occurrence of N-acetyl and N-glycolyl-neuraminic acid in Trypanosoma cruzi. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 364:1053-1057.
- Schmuñis, G.A., Szarfman, A., Langembach, T. & De Souza, W. (1978) Induction of capping in blood-stage trypomastigotes of Trypanosoma cruzi by human anti-Trypanosoma cruzi antibodies. Infect. Immun. 20:567-569.
- Schmuñis, G.A., Szarfman, A. & De Souza, W. (1980) Trypanosoma cruzi: antibody-induced mobility of surface antigens. Exper. Parasitol. 49: 90-102.
- Scott, M.T. & Snary, D. (1979) Protective immunization of mice using cell surface glycoprotein from Trypanosoma cruzi. Nature 282:73-74.
- Scott, M.T. & Snary, D. (1982) II American trypanosomiasis (Chagas' disease). Em: Cohen S. & Warren K. (eds.) Immunology of parasitic infections. Blackwell, Oxford, pp. 262-298.

- Sher, A. & Snary, D. (1982) Specific inhibition of the morphogenesis of Trypanosoma cruzi by a monoclonal antibody. *Nature* 300: 639-640.
- Sher, A., Crane, M.S.J. & Kirchhoff, L.V. (1983) Incubation in mice provides a signal for the differentiation of Trypanosoma cruzi epimastigotes to trypomastigotes. *J. Protozool.* 30:278-283.
- Silva, L.H.P. & Nussenzweig, V. (1953) Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* 20:191-207.
- Silverstein, S.C., Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. (1977) Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 46:669-772.
- Snary, D. (1980) Trypanosoma cruzi: antigenic invariance of the cell surface glycoprotein. *Exp. Parasitol.* 49: 68-77.
- Snary, D. (1983) Cell surface glycoproteins of Trypanosoma cruzi: protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77:126-129.
- Snary, D. & Hudson, L. (1979) Trypanosoma cruzi cell surface proteins: identification of one major glycoprotein. *FEBS Lett.* 100:166-170.
- Snary, D., Ferguson, M.A.J., Scott, M.T. & Allen, A.K. (1981) Cell surface antigens of Trypanosoma cruzi: use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3:343-356.
- Szarfman, A., Queiroz, T. & De Souza, W. (1980) Mobility of concanavalin A receptors in Trypanosoma cruzi. *J. Parasitol.* 66: 1055-1057.
- Tanowitz, H., Wittner, M., Kress, Y. & Bloom, B. (1975) Studies of in vitro infectivity by Trypanosoma cruzi. I. Ultra-structural studies on the invasion of macrophages and L-cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 25-33.
- Teixeira, A.R.L. (1977) Immunoprophylaxis against Chagas' disease. Em: Miller, L.H., Pino, J.A. & MacKelvey, J.J.Jr. (eds.) *Immunity to blood parasites of animals and man*. Plenum, New York. pp. 243-284.
- Umezawa, E.S., Milder, R.V. & Abrahamsohn, I.A. (1985) Trypanosoma cruzi amastigotes: development in vitro and infectivity in vivo of the forms isolated from spleen and liver. *Acta Trop.* 42: 25-32.
- Villalta, F. & Kierszenbaum, F. (1982) Growth of isolated amastigotes of Trypanosoma cruzi in cell-free medium. *J. Protozool.* 29:570-576.
- Villalta, F. & Kierszenbaum, F. (1983) Role of cell surface mannose residues in host cell invasion by Trypanosoma cruzi. *Biochim. Biophys. Acta* 736:39-44.

- Wirth, J.J. & Kierszenbaum, F. (1984) Fibronectin enhances macrophage association with invasive forms of Trypanosoma cruzi. J. Immunol. 133: 460-464.
- Yusuf, H.K.M., Pohlentz, G., Schwarzmann, G. & Sandhoff, K. (1983a) Ganglioside biosynthesis in Golgi apparatus of rat liver. Stimulation by phosphatidylglycerol and inhibition by tunicamycin. Eur. J. Biochem. 134:47-54.
- Yusuf, H.K.M., Pohlentz, G. & Sandhoff, K. (1983b) Tunicamycin inhibits ganglioside biosynthesis in rat liver Golgi apparatus by blocking sugar nucleotide transport across the membrane vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7075-7079.
- Zenian, A. & Kierszenbaum, F. (1982) Inhibition of macrophage-Trypanosoma cruzi interaction by concanavalin A and differential binding of blood stream and culture forms to the macrophage surface. J. Parasitol. 68:408-415.
- Zingales, B. (1984) Labelling of surface antigens. Em: Morel, C.M. (ed.) Genes and antigens of parasites - a laboratory manual. 2a. ed. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil pp. 333-338.
- Zingales, B., Carniol, C., Abrahamsohn, P.A. & Colli, W. (1979) Purification of an adenylyl cyclase-containing plasma membrane fraction from Trypanosoma cruzi. Biochim.Biophys. Acta 550: 233-244.
- Zingales, B., Martin, N.F., Lederkremer, R.M. & Colli, W. (1982a) Endogenous and surface labeling of glycoconjugates from the three differentiation stages of Trypanosoma cruzi. FEBS Lett. 142:238-242.
- Zingales, B., Andrews, N.W., Kuwajima, V.Y. & Colli, W. (1982b) Cell surface antigens of Trypanosoma cruzi: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. Mol. Biochem. Parasitol. 6: 111-124.
- Zingales, B., Abuin, G., Romanha, A.J., Chiari, E. & Colli, W. (1984) Surface antigens of stocks and clones of Trypanosoma cruzi isolated from humans. Acta Trop. 41: 5-16.
- Zingales, B. & Colli, W. (1985) Trypanosoma cruzi: interaction with host cells. Em: Current topics in microbiology and immunology. Hudson, L. (ed.) Springer Verlag-Berlin Heidelberg, vol. 117, pp. 129-152.
- Zingales, B., Katzin, A.M., Arruda, M.V. & Colli, W. (1985) Correlation of tunicamycin sensitive surface glycoproteins from Trypanosoma cruzi with parasite interiorization into mammalian cells. Mol. Biochem. Parasitol. 16: 21-34.