Maria Júlia Manso Alves

Anticorpos monoclonais anti-*Trypanosoma cruzi*
definem antígeno envolvido no mecanismo de penetração.

Tese apresentada para o concurso de
Livre-Docência do Instituto de
Química, USP 1986.

íNDICE

Resumo	1
Introdução	2
Resultados e Discussão	3
A. Superfície de Formas Epimastigotas	14
B. Superfície de Formas Tripomastigotas	29
Material e Métodos	
1. Cultivo de <i>T. cruzi</i>	55
2. Obtenção de anticorpos monoclonais	60
3. Obtenção de anticorpos policlonais	67
4. Purificação de anticorpos e obtenção de fragmentos Fab	69
5. Reatividade de anticorpos com <i>T. cruzi</i>	70
6. Invasão de cultura de células pelo parasita. Efeito de anticorpos	72
7. Marcação isotópica. Identificação de antígenos	73
8. Cromatografia de afinidade (lectinas-Sepharose)	75
9. Outros Métodos	76
10. Bibliografia	78
11. Anexos	105

ABREVIATURAS

BSA - Albumina bovina

Con A - Concanavalina A

DME - Meio de Eagle modificado por Dulbecco

FCS - Soro fetal bovino

LIT - Meio axênico, contendo infusão de fígado e triptose

M-16 - Meio de diferenciação M-16

8-MOP - 8-metoxipsoralen

PBS - Tampão fosfato-salina - 0,15M de NaCl, 0,01M de fosfato
de sódio, pH 7,2

PMSF - Fenilmetil sulfonil fluoreto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TAU - Urina artificial de Triatoma

TLCK - N-tosil-L-lisilclorometil cetona

WGA - Lectina de germe de trigo

Este trabalho teve apoio financeiro da UNDP/World BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Financiadora de Estudos e Projetos.

RESUMO

Nossos resultados mostram na superfície do *T. cruzi*: 1. diferenças entre clones e cepas de formas epimastigotas detectadas pelo anticorpo monoclonal B2/5 e pelas lectinas con A e WGA; 2. epitopos comuns entre as formas epimastigotas e tripomastigotas, detectados pelos anticorpos monoclonais H366, L5B11 e L1D10; 3. epitopos específicos das formas tripomastigotas detectados pelos anticorpos monoclonais (H1A10, 6A2, 3D11, entre outros); 4. diferenças de reatividade entre a população de formas tripomastigotas de cultura de tecido com o monoclonal H1A10; 5. heterogeneidade no antígeno (Tc-85), detectadas por cromatografia em colunas de afinidade em WGA-Sepharose e em H1A10-Sepharose; 6. diferenças entre os antígenos reconhecidos pelo monoclonal H1A10 nas formas tripomastigotas de cultura de tecido e metacíclicas. As formas tripomastigotas metacíclicas apresentam 3 antígenos de peso molecular menor que a Tc-85 e que não se ligam a colunas de WGA-Sepharose; 7. inibição parcial da invasão *in vitro* de formas tripomastigotas de cultura de tecido (50 - 70%) e das formas tripomastigotas metacíclicas (90%) devido aos anticorpos monoclonais (H1A10, 6A2 e 3D11).

INTRODUÇÃO

A descrição da técnica de produção de hibridomas por Kohler & Milstein em 1975 revolucionou a maneira clássica de obtenção de anticorpos. Convencionalmente os anticorpos podem ser obtidos pelo inóculo do antígeno em animais, cujo sistema imune responderá a diferentes determinantes desse antígeno e o soro, coletado posteriormente, será uma mistura de anticorpos, produzidos por diferentes clones de linfócitos B. Em essência, o anticorpo monoclonal perpetua a produção de um clone de linfócitos B. Para se poder apreciar a importância da técnica, basta dizer que serão produzidos comercialmente este ano entre 10 a 15 Kg de anticorpos monoclonais a serem empregados principalmente em diagnóstico (Newmark, 1985). O avanço do conhecimento verificado em algumas áreas de pesquisa básica só foi possível com o emprego de anticorpos monoclonais. Dentre elas destaca-se a parasitologia. Pelo menos em teoria, é possível obter-se o anticorpo monoclonal que se deseja, contanto que se estabeleça o método adequado de seleção dos hibridomas. Na verdade, os anticorpos monoclonais obtidos são consequência direta do método estabelecido nessa seleção. Como no caso de outros parasitas, a obtenção de anticorpos monoclonais contra o *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) pode ajudar a estabelecer, por exemplo, os antígenos relevantes na interação hospedeiro-parasita, área de nosso interesse. O *T. cruzi* é um protozoário digenético, de vertebrados e insetos. Entre 10 e 20 milhões de pessoas na Améri-

ca do Sul apresentam sorologia positiva para a Doença de Chagas. Descrita em 1909 por Carlos Chagas, que descreveu não só a doença, mas também o parasita, o transmissor e seu ciclo biológico) parece ser de origem antiga. Foram detectados recentemente sintomas da Doença de Chagas (megaesôfago, megacólon ou cardiomegalia) em 11 de 35 múmias encontradas no norte do Chile (Rothhammer, 1985). O ciclo na natureza baseia-se na transmissão entre o inseto e pequenos mamíferos, embora o duplo ciclo descrito em gambás amplie a proposição geral (cf. Lenzi, Jansen e Deane, 1984). A responsabilidade pela doença em humanos é atribuída à adaptação dos insetos aos ambientes domésticos, como o *Triatoma infestans* (o principal vetor no Brasil). Em alguns locais onde o combate ao triatomídeo foi efetivo, como S. Paulo, outras formas de transmissão, como a transfusional, são responsáveis pelos 1 500 novos casos estimados por ano para a Doença de Chagas. Esses números sobem para 10 000 a 20 000 em todo o Brasil (Dias e Brener, 1984).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* (cf. Huare, 1972) é composto de: a- Epimastigotas, encontradas no trato digestivo do inseto, multiplicando-se por divisão binária; b- Tripomastigotas metacíclicas, encontradas no final do trato digestivo do inseto, sem capacidade de multiplicação e que dão início à infecção no vertebrado; c- Amastigotas, encontradas no interior de células do hospedeiro vertebrado, onde se multiplicam por divisão binária e d- Tripomastigotas sangüícolas, encontradas livres na circulação dos vertebrados, sem capacidade de multiplicação, sendo responsáveis pela invasão de novas células

ou de reiniciar o ciclo no hospedeiro invertebrado. Este ciclo pode portanto ser simplificado em formas com capacidade de infecção. No laboratório podem-se obter as diferentes formas a partir de animais ou: a- as formas epimastigotas em larga escala em meios axênicos complexos; b- as formas tripomastigotas metacíclicas com variados graus de sucesso, a partir da diferenciação em meio axênico das formas epimastigotas e c- as formas tripomastigotas de cultura de tecido e as formas amastigotas.

O *T. cruzi* enfrenta ao longo de seu ciclo evolutivo diferentes ambientes, possivelmente com reflexos na composição da superfície do parasita. Um exemplo dessas diferenças é a lise das formas por complemento, independente de soro imune, fenômeno não verificado com as formas tripomastigotas, que entram em contacto com o sangue do animal (Muniz & Borriello, 1945; Nogueira, Bianco & Cohn, 1975; Budzko, Pizzimenti & Kierszenbaum, 1975; Kierszenbaum, 1976).

A análise, isolamento e caracterização de componentes da superfície do parasita restringe-se, praticamente, às formas epimastigotas, pela facilidade de sua obtenção em larga escala. Entretanto o estudo comparado será rapidamente intensificado não só pelo emprego de novas técnicas, como a de hibridomas, mas também pelo aumento do número de laboratórios que estudam e desenvolvem condições para a obtenção dos demais estágios do parasita.

O *Trypanosoma cruzi* tem sido alvo, nos últimos anos, de uma série de revisões (Colli, 1979; Brener, 1980; de

Souza, 1983, 1984; Colli et al, 1984; Dvorak, 1984; uma série de autores abordando diferentes aspectos no volume especial do Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, suppl. vol. 79, 1984; Scott & Neal, 1984; Zingales & Colli, 1985; Snary, 1985; Colli, Alves & Zingales, 1985, entre outros). Por isso, somente alguns dados relativos à superfície do *T. cruzi* e à interação com a célula hospedeira serão apresentados a seguir.

A presença de carboidratos na superfície do *T. cruzi* foi detectada inicialmente pelo emprego de lectinas (Alves & Colli, 1974; Chiari et al, 1980; Araujo, Handman & Remington, 1980; Pereira et al, 1980; Katzin & Colli, 1983). Os componentes de superfície isolados posteriormente são todos glicoconjugados. Isso pode ser atribuído, em parte, à metodologia empregada para o isolamento, mas é interessante notar que praticamente todos os antígenos detectados na superfície do parasita são glicoproteínas. O estudo de glicolipídios só recentemente tem recebido maior atenção (Zingales et al, 1982a; Confalonieri, 1983; Lederkremer et al, 1985). Até o momento, poucos componentes da superfície foram isolados e caracterizados, mesmo que parcialmente: uma glicofosfoceramida, a LPPG (lipopeptidiofosfoglicana) e as glicoproteínas de 90 kDa, 72 kDa e 25 kDa, todas isoladas a partir de formas epimastigotas.

A LPPG foi inicialmente obtida juntamente com três outras glicoproteínas, por extração fenólica (Alves & Colli, 1975) e posteriormente purificada. É composta por 60% de açúcares neutros (manose/ galactose/ glicose = 35/22/1), 1% de

glicosamina, 3-5% de proteína, 2% de fósforo, além de ácidos graxos, principalmente palmítico e lignocérico. Como constituintes da molécula foram encontrados ainda inositol, 17-metil-esfinganina e esfinganina, propondo-se uma estrutura de glicofosfoceramida para a LPPG (Lederkremer et al, 1976; 1977, 1978). Estudos posteriores levaram, pelo menos em parte, à determinação da estrutura da molécula (Lederkremer et al, 1980; Lederkremer et al, 1985). Praticamente os mesmos resultados na composição da LPPG foram obtidos por Ferguson et al (1985). A molécula foi encontrada somente na superfície de formas epimastigotas (Alves et al, 1979; Zingales et al, 1982). No entanto anticorpos obtidos contra o complexo apresentaram reação positiva com formas amastigotas (Repka, Camargo & Santana, 1980). Embora a função dessa molécula seja desconhecida, é interessante que o complexo descrito também foi encontrado em soro de animais em fase aguda da infecção (Gottlieb, 1977).

Uma glicoproteína de superfície de 90 kDa (GP 90) foi descrita nas formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas (Snary & Hudson, 1979). Embora não tenha sido detectada nas formas epimastigotas por alguns autores (Nogueira et al 1981), sua presença foi confirmada por outros (Araújo & Remington, 1981; Zingales et al, 1982b; Andrews et al, 1984). Esta glicoproteína é altamente conservada tendo sido encontrada em quase todas as amostras de formas epimastigotas analisadas e obtidas de diferentes regiões geográficas, (Snary, 1980). A GP 90 é constituída de 81% de proteína e de 19% de açúcares: manose, galactose e glicose (11, 1, 1 resíduos por cada 100 aminoácidos, respecti-

vamente). As cadeias de oligossacarídeos parecem estar ligadas por ligações N-glicosídicas com a proteína (Ferguson, Snary & Allen, 1985). Quando a GP 90 foi utilizada juntamente com adjuvantes para imunizar camundongos, verificou-se que os animais apresentavam parasitemia menor e uma ligeira sobrevida (em relação a camundongos não imunizados) quando recebiam uma dose desafio de formas tripomastigotas sangüícolas ou metacíclicas (Scott & Snary, 1979; Snary, 1983). Sugeriu-se que anticorpos anti-GP 90 poderiam ser utilizados para diagnóstico (Schechter et al, 1983; Dragon et al (1985). A função dessa glicoproteína é desconhecida, embora alguns autores tenham proposto que fosse o componente antifagocítico existentes formas tripomastigotas sangüícolas (Nogueira et al, 1981).

A glicoproteína de 72 kDa (GP 72) foi encontrada somente nas formas tripomastigotas metacíclicas e epimastigotas (Nogueira et al, 1981; Snary et al, 1981). Estudos empregando anticorpos monoclonais contra essa glicoproteína mostraram diferenças na quantidade de GP 72 existente entre diferentes isolados de formas epimastigotas (Flint et al, 1984), possíveis de serem correlacionadas com a classificação dos parasitas em zimodemas (Chapman, Snary & Miles, 1984). Essas diferenças foram atribuídas, posteriormente, à presença de epitopos crípticos na superfície das formas epimastigotas (Kirchhoff et al, 1984 a e b). A GP 72 tem 49% (em peso) de carboidratos na molécula, sendo os açúcares encontrados, galactose, xilose, manose, fucose, ribose, glucosamina e glicose (23,3, 19,1, 12,3, 10,8, 7,7, 4,4 e 2 resíduos por 100 aminoácidos, respectivamente). A molécula

tem ainda alto conteúdo de fosfato (10% em peso), ligado covalentemente aos açúcares (Ferguson, Allen & Snary, 1983). Anticorpos contra a GP 72 são capazes de proteger camundongos contra uma dose de formas tripomastigotas metacíclicas, mas não sangüícolas (Snary, 1983). Foi sugerido que a GP 72 estaria envolvida em diferenciação, já que os anticorpos anti-GP 72 inibem a transformação de formas epimastigotas para tripomastigotas, em experimentos onde as formas epimastigotas são colocados em camaras implantadas subcutaneamente em camundongos (Sher & Snary, 1982; Sher, Crane & Kirchhoff, 1983). Foi sugerido ainda que a GP 72 seria o acceptor de C3 (do complemento) na membrana de formas epimastigotas (Joiner et al, 1985), embora aparentemente não nas formas tripomastigotas (Sher, Hieny & Joiner, 1986).

A glicoproteína de 25 kDa, encontrada em formas epimastigotas e tripomastigotas ainda está pouco estudada. Contém principalmente galactose e manose, além de xilose e glicose (Mendonça-Previato et al, 1983). Essa glicoproteína reage com soro de animais (inclusive o homem) infectados com *T.cruzi*, tendo sido proposto utilizá-la como antígeno para imunodiagnóstico (Scharfstein et al, 1983).

A invasão da célula hospedeira pelo *T.cruzi* é um processo que envolve a superfície de ambas as células. Como célula hospedeira têm sido utilizadas macrófagos e uma série de linhagens de células já estabelecidas em cultura além de alguns experimentos com cultura primária (Meirelles et al 1984). Todos os estágios do parasita são interiorizados por macrófagos, enquanto células não fagocitárias profissionais não são

invadidas por formas epimastigotas. Mas, mesmo no caso de macrófagos, foi observado que formas tripomastigotas obtidas de cultura de tecido apresentam maior índice de infecção, quando comparadas com tripomastigotas sangüícolas ou metacíclicas derivadas de meio axênico (Meirelles, Chiari & de Souza, 1982), assim como, dentro de um mesmo estágio, uma infectividade muito maior de determinadas cepas em relação a outras (Alcântara & Brener, 1978). Também diferenças de infectividade foram encontradas com células com cultura, dependendo da linhagem de células (Dvorak & Howe, 1976) ou da cepa do parasita empregada (Bertelli & Brener, 1980). Além disso, a capacidade de infecção varia de acordo com ciclo celular da célula hospedeira, aumentando da fase G1 para S e diminuindo de G2 para M (Dvorak & Crane, 1981), confirmando observações prévias de Piras, Henriquez e Piras (1980). O tratamento com tripsina de células em cultura (Vero) diminui sua infecção pelo *T. cruzi*, assim como o tratamento com lectinas, periodato ou a ressíntese de componentes de superfície após tratamento com tripsina, quando na presença de tunica-micina (Piras, Henriquez & Piras, 1980; Henriquez, Piras & Piras, 1981a; Piras, Piras & Henriquez, 1983).

A invasão *in vitro* de células em cultura pelo *T. cruzi* foi operacionalmente dividida nas etapas de adesão e interiorização (Henriquez, Piras & Piras, 1981b; Colli, Andrews & Zingales, 1981; Andrews & Colli, 1982). Segundo Piras, Piras & Henriquez (1982), as formas tripomastigotas recém liberadas de células em cultura tem capacidade de adesão e penetração de 5 a 15 vezes menor quando comparadas com as mesmas formas incubadas

em meio acelular, contendo soro fetal bovino (resultados confirmados por Kuwajima & Colli, 1983). A adição de puromicina inibe as duas etapas, enquanto actinomicina e tunicamicina inibem somente a interiorização. A adição de inibidores de protease também inibe o aumento de adesão e interiorização, levando os autores a propor o envolvimento de uma protease nessa ativação (Piras, Piras & Henriquez, 1983). O tratamento da superfície do parasita com tripsina inibe (Andrews, Katzin & Colli, 1984) ou estimula a entrada do parasita na célula (Henriquez, Piras & Piras, 1981b), de acordo com o laboratório. Aparentemente, essas diferenças são devidas à utilização de formas tripomastigotas já ativadas ou recém saídas de células e também à extensão de proteólise (Piras, Henriquez & Piras 1985). O tratamento do parasita com tripsina leva à remoção das proteínas de superfície e à inibição de penetração. Ambas são restabelecidas após incubação em meio suplementado com soro (Andrews, Katzin & Colli, 1984). A adição de tunicamicina inibe em até 80% a penetração (Zingales et al, 1985).

Quando carboidratos foram adicionados *in vitro*, verificou-se que N-acetil-D-glicosamina inibia a penetração do *T. cruzi* (Andrews & Colli, 1981; Henriquez, Piras & Piras, 1981a, Crane & Dvorak, 1982; Piras, Piras & Henriquez, 1983; Colli et al, 1984), embora recentemente tenham sido descritos clones que não têm sua capacidade invasiva alterada na presença de açúcares (Doyle, Dvorak & Engel, 1984). O tratamento do parasita com alfa-manosidase, alfa-galactosidase ou

N-acetilglucosaminidase, aumenta a interação com a célula hospedeira (Villalta & Kierzenbaum, 1983; 1984, 1985).

Verificou-se que a adição de moléculas contendo Ácido siálico ao ensaio estimulava a internalização do parasita, sendo o melhor efeito obtido com fetuína (Piras, Piras & Henriquez, 1984). Uma vez que o *T. cruzi* parece não sintetizar ácido siálico (Schauer et al, 1983), propôs-se que ele seja retirado do meio para sua incorporação em macromoléculas do parasita (Schottellius, 1984, Pessolani et al, 1984). Sugeriu-se então que glicoproteínas ou glicolipídios contendo ácido siálico na superfície do *T. cruzi* seriam importantes na invasão (cf Colli, 1984).

Recentemente descreveu-se a presença de receptores para fibronectina na superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A adição de fibronectina aumenta, enquanto a adição de anticorpos anti-fibronectina diminui em 69% a invasão de fibroblastos em cultura pelo parasita. Esses resultados sugerem que a fibronectina deve ter um papel na ligação do *T. cruzi* com a superfície da célula hospedeira (Ouaissi et al, 1984, 1985a). Resultados semelhantes foram obtidos com macrófagos (Wirth & Kierszenbaum, 1984). O mesmo efeito foi observado em *Leishmania* (Wyler, Sypek & Mc Donald, 1985) e o efeito inverso em merozoítos de *P. falciparum* (Ouaissi et al, 1985). Talvez o *T. cruzi* possa utilizar-se, para sua invasão, de moléculas envolvidas na adesão de células do hospedeiro, entre elas a fibronectina e a laminina (Kleinman, Klebe & Martin, 1981; Mark & Kuhl, 1985). É interessante notar

que Ruoshlati & Pierschbacher (1986) sugeriram que a sequência ARG-GLY-ASP comum a diferentes moléculas de adesão, seria crucial para a interação com o receptor celular. Poder-se-ia especular se parasitas, como o *T.cruzi*, que invadem diferentes células *in vitro*, se utilizam para a sua etapa de adesão dessas ou mesmo de outras sequências comuns a moléculas existentes na célula hospedeira.

Na tentativa de identificar as moléculas envolvidas na penetração, vários laboratórios analisaram a composição proteica da superfície do parasita. Empregando soros humanos ou obtidos em animais, identificaram-se antígenos principalmente localizados entre 70 e 100 kDa (Andrews, Katzin & Colli, 1984), embora outras proteínas de mais alto peso molecular tenham sido detectadas (Zingales et al, 1982b; Martins et al, 1985). É interessante observar que os soros obtidos de pacientes chagásicos ou de animais hiperimunes foram capazes de inibir *in vitro* a entrada do parasita na célula hospedeira em até 70%, sugerindo o envolvimento de antígenos na invasão. Por cromatografia em colunas de WGA-Sepharose foi isolada uma glicoproteína de 85 kDa, localizada na superfície de formas tripomastigotas e ausente nas formas epimastigotas (Katzin & Colli, 1983). Anticorpos obtidos contra o material ligado à coluna inibiram entre 20 e 40% a penetração do *T.cruzi in vitro*. Foi sugerido que essa glicoproteína poderia estar envolvida com a interiorização do parasita (Colli et al, 1984).

O fato de anticorpos monoclonais poderem auxiliar na identificação de compostos de algum modo envolvidos no mecanismo

de penetração do *Trypanosoma cruzi*, levou-nos a investir nessa tecnologia. Procuramos, numa primeira seleção, obter anticorpos que reagissem com as formas tripomastigotas e, numa segunda etapa, selecionar aqueles que apresentassem *in vitro* algum efeito na penetração. Procuramos então identificar e purificar o antígeno. Durante o trabalho detectamos variação de reatividade da superfície de formas epimastigotas pertencentes a diferentes clones e cepas com um dos anticorpos monoclonais. Essa observação foi explorada, já que possíveis variações do *T. cruzi*, se existentes na natureza, podem ter grande importância médica e biológica.

RESULTADOS - DISCUSSÃO

A. SUPERFÍCIE DE FORMAS EPIMASTIGOTAS

O anticorpo monoclonal B2/5 reconhece a superfície de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas de meio axênico (cepa Y e CL) de *T. cruzi*. Quando as formas epimastigotas são incubadas com o anticorpo monoclonal, observa-se diminuição imediata da motilidade do parasita, seguida de aglutinação, inibição da síntese de ácidos nucleicos e morte da maioria das formas epimastigotas (Alves, Aikawa & Nussenzweig, 1983). Esse anticorpo monoclonal não tem qualquer efeito sobre as formas promastigotas de *L. mexicana amazonensis* e *C. acanthocephala*.

A capacidade do anticorpo monoclonal de B2/5 de aglutinar as formas epimastigotas viáveis da cepa Y e CL foi utilizada para a comparação da superfície de diferentes cepas e clones de *T. cruzi* (Tabela I). Também se verificou a aglutinação das formas epimastigotas com as lectinas Con A e WGA nas concentrações de 500, 50 e 5 ug/ml (Tabela I). As variações de aglutinação com o anticorpo monoclonal observadas entre as amostras podem ser atribuídas a diferenças de expressão do antígeno na superfície do protozoário ou à inacessibilidade do antígeno pelo anticorpo. Verificou-se esta última hipótese pela marcação da superfície de 5 clones e 5 cepas do parasita pela técnica do Iodo-Gen-¹³¹I, seguida de imunoprecipitação do extrato com o monoclonal B2/5 e análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (FIGURA 1). Principalmente dois polipeptídios

TABELA I Aglutinação de formas epimastigotas de *T. cruzi* pelo anticorpo monoclonal B2/5 e por lectinas (em Alves, Abuin, Gonçalves, Kuwajima & Colli 1986).

Cepa/clone	Aglutinação ^a		
	B2/5 (Título)	Con A ^b	WGA ^b
Costalimai	zero	+	-
Guafitas	zero	-	++
MD	zero	+	++
CL	10240 ^c	+++	+
CL-14 (clone CL)	1280	-	+
Y	10240	+++	+
M1 (clone Y)	10240	+	+
M12 (clone Y)	20480	-	+
W	20480	+++	+
229-7A (clone) ^c	1280	+	+
167-13B (clone) ^c	40960	+	+
181-1C (clone) ^c	1280	+++	++
143-D ^c	640	+++	+++

⁶
a- 5x10⁶ parasitas viáveis incubados com o monoclonal ou lectinas por 1h., 28 C.

b. Aglutinação com 5 ug/ml (+++), 50 ug/ml (++) , 500 ug/ml (+) ou não-aglutinação (-)

c. As letras depois dos números indicam respectivamente, zimodemas A,B,C e D (Romanha et al., 1979).

Figura 1 -Antígenos de superfície de cepas e clones de formas epimastigotas de *T. cruzi* reconhecidos pelo anticorpo monoclonal B2/5. As amostras foram marcadas na superfície (Iodo-Gen-¹³¹I), imunoprecipitadas com o anticorpo e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. 1. CL; 2. CL-14; 3. 229-7A; 4. 143-D; 5. 167-13B; 6. Y; 7. M1; 8. M12; 9. Costalimai, 10. MD; 11. Soro normal (cepa Costalimai). (em Alves, Abuin, Gonçalves, Kuwajima & Colli, 1986).

de 59 e 55 kDa foram imunoprecipitados nas cepas e clones que são aglutinadas pelo monoclonal, em contraste com as cepas Costalimai e MD, que não são aglutinadas. As bandas observadas nessas cepas são as mesmas obtidas com um anticorpo monoclonal não relacionado (anti-esporozoito de *P. knowlesi*) ou com soro normal de camundongo.

O padrão antigênico de superfície, das mesmas amostras de *T. cruzi*, reconhecido por um soro obtido em camundongos contra a cepa Y é mostrado na FIGURA 2. Embora menos evidentes que os resultados obtidos com o anticorpo monoclonal, podem ser detectadas diferenças entre as amostras. Compare-se por exemplo os clones CL-14 (clone de CL) e o M-12 (clone de Y) ou as cepas Y e Costalimai. Note-se também a semelhança de padrão antigênico entre algumas amostras (como CL, CL-14, clone 229-7A e 143-D).¹³¹ O padrão total da superfície das amostras marcadas com I é apresentado na FIGURA 3.

Para a comparação dos antígenos metabolicamente marca-³⁵ dos (metionina-³⁵S) foram utilizados somente quatro cepas: Y, CL, Guafitas e Costalimai, dois grupos que apresentam comportamento distinto quanto à aglutinação pelo B2/5 (cf. TABELA 1). O padrão antigênico dessas cepas após imunoprecipitação com um soro policlonal obtido em coelhos (anti-cepa Y) é mostrado na FIGURA 4. Ao contrário do esperado, quando se utilizou o anticorpo monoclonal B2/5 não se observaram diferenças marcantes entre as quatro cepas (dados não apresentados). Havia portanto a possibilidade dos antígenos estarem presentes em todas as amostras, mas talvez expressos em baixas concentrações na super-

Figura 2. Antígenos de superfície de cepas e clones de formas epimastigotas de *T. cruzi* reconhecidos por um anticorpo anti-cepça Y, obtido em camundongo. Mesma legenda da Figura 1. 1. CL; 2. CL-14; 3. 229-7A; 4. 143-D; 5. 167-13B; 6. Y; 7. M1; 8. M12; 9. Costalimai; 10. MD. (em Alves, Abuin, Gonçalves, Kuwajima & Colli, 1986).

Figura 3. Padrão total da superfície de cepas e clones de formas epimastigotas de *T. cruzi*. A superfície do parasita foi marcado por Iodo-Gen-¹³¹I e o extrato submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida. 1. CL; 2. CL-14; 3. 229-A; 4. 143-D; 5. 167-13B; 6. Y; 7. M1; 8. M-12; 9. Costalimai; 10. MD.

Figura 4. Antígenos de formas epimastigotas de *T.cruzi* metabolicamente marcados e reconhecidos por um soro policlonal (anti-cepa Y). As amostras foram marcadas com metionina-³⁵S e o extrato imunoprecipitado com um soro obtido em coelhos contra formas tripomastigotas de cultura de tecido (previamente tratadas com 8-MOP): 1. Y; 2. CL; 3. Costalimai; 4. Guafitas; ou com soro normal: 5. Y; 6. Costalimai; 7. Guafitas; 8. CL.

fície das cepas Costalimai e Guafitas. Os resultados obtidos não são totalmente conclusivos. A presença dos antígenos na superfície de formas epimastigotas e no extrato celular foi verificada empregando-se os seguintes anticorpos: 1. monoclonal B2/5; 2. um soro policlonal obtido em camundongos contra um extrato de formas epimastigotas da cepa Y cromatografado em colunas de afinidade B2/5-Sepharose (denominado B2/5 Y) e 3. um soro policlonal obtido em camundongos contra o extrato da cepa Guafitas cromatografado em colunas de B2/5-Sepharose (B2/5-Gua). Formas epimastigotas das cepas Y, CL, Guafitas e Costalimai foram marcados com metionina-³⁵S e tratadas com os anticorpos *in vivo*. Após lavagem para eliminar o anticorpo livre, foi feito o extrato celular com Nonidet P-40, o complexo antígeno-anticorpo ligado a *Staphylococcus*, centrifugado e o sobrenadante separado. Ao sobrenadante adicionou-se o mesmo anticorpo. Após tratamento com *Staphylococcus* os antígenos foram, em ambos os casos, identificados por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Após 1 mês de exposição do gel, os resultados obtidos para as cepas Y e CL são apresentados na FIGURA 5 e os das cepas Guafitas e Costalimai na FIGURA 6. Os resultados sugerem que as cepas Guafitas e Costalimai apresentam os antígenos reconhecidos pelo monoclonal B2/5, talvez menos expressos na sua superfície, quando comparados com as cepas Y e CL. Esses resultados no entanto contrastam com os obtidos previamente na marcação por ¹³¹I.

Os resultados da reação de aglutinação das formas epimastigotas de *T. cruzi* de diferentes cepas com o anticorpo monoclonal B2/5 mostram uma heterogeneidade de

Figura 5. Antígenos de formas epimastigotas de *T. cruzi* metabolicamente marcados com metionina-³⁵S (cepas Y e CL). Cepa Y: 1. antígenos imunoprecipitados primeiramente *in vivo* com o monoclonal B2/5, seguido de imunoprecipitação do extrato com o mesmo anticorpo (2); 3. *in vivo* com o anticorpo B2/5-Y, seguido do extrato (4); 5. *in vivo* com o anticorpo B2/5-Gua, seguido do extrato (6); Cepa CL: de 7 a 12 na mesma sequência que a cepa Y.

Figura 6. Antígenos de formas epimastigotas de *T. cruzi*
metabolicamente marcadas com metionina-³⁵S (cepas Costalimai e Guafitas). Mesma legenda e sequência da Figura 5. Cepa Costalimai (1 a 6); Cepa Guafitas (7-12).

superfície bastante grande a presença de dois antígenos na superfície do parasita passíveis de concentração com ¹³¹I (59 e 55 kDa) parece estar relacionada com a aglutinação do parasita, embora devam existir diferenças quantitativas na expressão desses antígenos entre as cepas e clones analisadas, como é sugerido pelos diferentes títulos de aglutinação observados com o anticorpo monoclonal. A ausência de aglutinação e de antígenos marcados com ¹³¹I em algumas cepas pode ser atribuída a uma baixa expressão ou à ausência do antígeno e/ou epitopo reconhecido pelo monoclonal na superfície do parasita. Os resultados obtidos com duas cepas metabolicamente marcadas sugerem que os antígenos estão presentes em menor concentração na superfície das amostras que não são aglutinadas pelo monoclonal, ao contrário das outras duas. No entanto, uma quantificação desses antígenos nas diferentes cepas se faz necessária.

Quando se comparam as cepas Y e CL, há uma variação na expressão dos antígenos marcados com metionina: a cepa Y apresenta os de 59 e 55 kDa mais ou menos na mesma intensidade, enquanto que a CL apresenta majoritariamente o de 59 kDa. A relação entre esses antígenos não foi estabelecida.

Surpreendentemente, quando outros parâmetros também foram analisados, como a aglutinação por Con A ou WGA, a variação entre as amostras se tornou ainda maior, não se podendo estabelecer nenhuma relação entre a aglutinação pelo anticorpo monoclonal e pelas lectinas. Também não foi possível estabelecer uma relação entre esses resultados e origem

geográfica do parasita, hospedeiro de origem ou sua classificação em zimodemas, ao contrário de outros autores (Schottelius, 1982; Chapman, Snary & Miles, 1984). Os resultados obtidos com o anticorpo policlonal (anti-cepa Y) sugerem que as variações observadas não podem ser atribuídas exclusivamente a pequenas diferenças entre os antígenos reconhecidos pelo anticorpo monoclonal ou à microheterogeneidade na composição de carboidratos detectada pelas lectinas. Kirchhoff et al (1984a) utilizando um anticorpo monoclonal contra uma glicoproteína de 72 kDa mostraram diferenças de superfície entre formas epimastigotas, devidas à existência de um epitopo críptico (Kirchhoff et al, 1984b). No entanto, esta não parece ser a explicação para os nossos resultados. No caso dos antígenos de superfície detectados pelo anticorpo policlonal anti-Y é possível verificar que certas cepas e clones apresentam padrão antigênico bastante semelhante, com possíveis diferenças quantitativas entre eles. Esta pode ser a razão pela qual não se encontraram anteriormente diferenças entre algumas amostras analisadas (Zingales et al, 1984). Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por outros autores (Araújo & Remington, 1981; McDaniel, Howard & Dvorak, 1986).

O anticorpo monoclonal B2/5 reage com as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas de meio axênico. Não se observa entretanto qualquer reação com as formas tripomastigotas de cultura de tecido por imunofluorescência indireta ou por imunoprecipitação de antígenos de superfície de parasitas previamente marcados com Iodo-Gen-¹³¹I (dados não

apresentados). Esses resultados sugerem a existência de diferenças na composição de antígenos de formas tripomastigotas obtidas por diferentes meios.

A imunofluorescência indireta do anticorpo monoclonal B2/5 com formas de cultura de meio axênico (cepa Y) mostrou diferentes intensidades de reação entre os indivíduos da população. Também a lise do parasita provocada por esse anticorpo não é total. Isso nos levou a sugerir, entre outras hipóteses, que a cepa Y era composta de indivíduos geneticamente diferentes ou que havia uma modulação de expressão do antígeno ao longo de seu ciclo (Alves, Aikawa & Nussenzweig, 1983). Tentamos então selecionar a população resistente à lise pelo monoclonal. Os parasitas foram incubados com o anticorpo por 4-5 dias em meio LIT (1 mg/ml, 28 °C), centrifugados, lavados e colocados em meio LIT por 1-2 semanas para o crescimento das células. O tratamento com o monoclonal era então repetido. Ao final de 5 desses ciclos, mediu-se a incorporação de uridina-³H das formas epimastigotas na presença do anticorpo monoclonal. Como controle, o mesmo tratamento foi feito com *C. acanthocephala*, que não é afetada pelo monoclonal. O resultado obtido com o *T. cruzi* não mostrou qualquer diferença com a população inicial do parasita. Embora persista a possibilidade de que o número de ciclos de tratamento do parasita com o monoclonal não tenha sido suficiente para a seleção de populações, os dados sugerem a existência de uma variação na expressão do antígeno na superfície, devida neste caso, provavelmente, a condições fisiológicas do parasita.

A literatura vem acumulando, principalmente nos últimos

anos, dados relativos à heterogeneidade entre diferentes cepas e clones de *T.cruzi*, quanto ao esquizodema (Morel et al, 1980), ligação de lectinas (Schottelius, 1982), zimodema (Miles, 1978; Romanha, 1979), à quantidade de DNA por organismo, à duração de seu ciclo celular (cf. Dvorak, 1984) e ao seu padrão de antígenos totais (Nussenzweig et al, 1963; Bongertz & Dvorak, 1983). Mesmo em formas tripomastigotas foi detectado poliformismo em seus antígenos de superfície (Plata, Pons e Eisen, 1984).

A primeira pergunta que surge diz respeito à origem dessas variações, uma vez que o parasita é aparentemente diplóide e de reprodução assexuada. Após um extenso estudo de isoenzimas em 121 amostras de *T.cruzi*, Tibayrenc et al (1986) propuseram que a heterogeneidade genética por eles observada poderia ser atribuída a 1. divergência antiga e evolução independente de múltiplos clones 2. divergência antiga de poucas espécies biológicas, com alguma heterogeneidade entre elas. Outros mecanismos que levem a uma heterogeneidade não podem no entanto ser excluídos. Só recentemente foi possível identificar parte dos cromossomos de alguns parasitas. Em *P.falciparum* identificaram-se pelo menos 7 cromossomos, que variam em até 20% de tamanho entre os isolados analisados. Obsevou-se também que genes codificando antígenos contendo sequências repetitivas encontravam-se em diferentes cromossomos e aparentemente dois cromossomos continham as mesmas sequências (Kemp et al, 1985). Em *T.brucei* parece ocorrer transposição de grande número de pares de bases de um cromossomo para outro, resultando em grande variação de tamanho entre os minicromossomos existentes nessa

espécie. Em *T.vivax*, já não se encontraram minicromossomos em *T.equiperdum* localizaram-se apenas dois (cf. Cox, 1985). Em *T.cruzi*, Engman et al (1986) descreveram variações no tamanho dos cromossomos entre as 11 amostras estudadas (entre elas 6 clones), sugerindo que a heterogeneidade observada deve ser acompanhada de diferenças na organização dos cromossomos.

A doença de Chagas apresenta entre os pacientes quadros clínicos distintos (Rezende, 1979). Algumas cepas de *T.cruzi* infectam preferencialmente determinadas células (Brener, 1980). Quantas e quais heterogeneidades descritas no *T.cruzi* guardam alguma relação com as diferenças biológicas e médicas encontradas na natureza são pontos importantes e ainda não respondidos.

B. SUPERFÍCIE DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS

Para a obtenção de anticorpos monoclonais contra a superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, desenvolvemos o tratamento do parasita com 8-metoxipsoralen (8-MOP) de tal modo que: 1. a superfície do parasita ficasse inalterada; 2. se obtivesse boa resposta humoral em camundongos; 3. os camundongos fossem resistentes a um inóculo de formas infectantes do parasita não tratadas (dose desafio) e 4. não houvesse contaminação dos híbridos obtidos após a fusão com formas viáveis do *T. cruzi* (Andrews et al, 1985).

Após o tratamento das formas tripomastigotas de cultura de tecido com 8-MOP, verificou-se a sua capacidade de invadir monocamadas de células em cultura (LLC-MK2). Como controle utilizou-se o parasita submetido ao mesmo tratamento, na ausência de 8-MOP. A observação ao microscópio óptico e a análise quantitativa do número de parasitas intracelulares ao longo do tempo mostram que o parasita tratado com 8-MOP mantém sua capacidade de invadir células *in vitro*, mas tem sua capacidade de diferenciação e/ou divisão comprometidas (FIGURAS 7 e 8).

O comportamento *in vivo* de formas tripomastigotas de cultura de tecido tratadas com 8-MOP foi verificado injetando-se 1×10^7 parasitas por camundongo (total de 10 animais), seguindo-se a parasitemia diariamente. Não se observou, por exame de sangue a fresco, a presença de parasitas em camundongos inoculados com o *T. cruzi* tratado com 8-MOP, ao contrário dos animais controle, que desenvolveram alta

Figura 7 - Capacidade de invasão e divisão intracelular de formas tripomastigotas de *T. cruzi* tratadas ou não com 8-MOP. (em Andrews et al., 1985).

Figura 8. Capacidade de invasão e multiplicação intracelular de formas tripomastigotas de *T. cruzi* tratadas ou não com 8-MOP. O gráfico mostra a quantificação da Fig.7. Formas tripomastigotas tratadas (○) e não tratadas com 8-MOP (●). (em Andrews et al., 1985).

parasitemia, com morte dos animais em torno do 11 dia (FIGURA 9). O lote de camundongos inoculados com o parasita tratado recebeu duas outras doses de *T. cruzi*, iguais à primeira, 16 e 37 dias após a primeira dose. Também foram inoculados animais controle e a parasitemia de cada animal acompanhado. O mesmo resultado foi obtido (FIGURA 9). Para verificar se os camundongos imunizados eram resistentes a um inóculo de formas infectantes, os animais foram divididos em dois lotes iguais. O lote A recebeu 1000 formas tripomastigotas sanguícolas, 56 dias após o início do experimento. Os cinco animais apresentaram parasitemia negativa, ao contrário dos animais controle, com alta parasitemia e morte em torno do 16^o dia. Os animais do lote B também apresentaram parasitemia negativa quando um inóculo de 1000 formas sanguícolas foi fornecido no 77^o dia do experimento, assim como os do lote A, novamente inoculados (FIGURA 9).

A metodologia empregada para a detecção de parasitas no sangue dos animais (contagem ao microscópio óptico) não é suficientemente sensível para detectar baixos índices de parasitemia. Por isso, ao longo do experimento, foram retiradas assepticamente amostras de sangue de cada camundongo e inoculadas em meio de cultura axênico (LIT). Cada amostra foi distribuída pelo menos em dois tubos e examinada periodicamente ao microscópio. Depois de 3 meses após o inóculo foi possível observar que 3 camundongos apresentavam parasitemia: 2 ainda da fase de imunização e 1 do lote A, depois do inóculo com formas sanguícolas. Esses resultados mostram que o tratamento das formas

Figura 9 - Proteção em camundongos contra *T. cruzi*

obtida pela imunização com formas tripomastigotas de cultura de tecido tratadas com 8-MOP (cepa Y). (●) controle; (○) imunizados. As 3 setas na parte à esquerda da figura indicam os dias de imunização (0, 16 e 37). Os pontos correspondentes a 100% da mortalidade dos animais controle são indicados (*). Durante a imunização somente a curva de parasitemia na 1a. dose de imunização dos animais controle é apresentada. Os pontos correspondem à média das parasitemias. (em Andrews et al., 1985).

tripomastigotas com 8-MOP não inativa totalmente os parasitas, havendo a possibilidade de alguns escaparem, levando ao aparecimento de parasitemia nos camundongos, embora em nível bastante reduzido. Esses resultados podem ser atribuídos à não formação de pontes entre o 8-MOP e as fitas de DNA do parasita, embora a ação de mecanismos de reparo não possa ser excluída.

Um fator decisivo na imunização visando à obtenção de anticorpos monoclonais é o nível de resposta humoral produzida nos animais. O aparecimento de anticorpos nos camundongos inoculados com parasitas tratados com 8-MOP foi seguido ao longo de todo o experimento por imunofluorescência indireta, aglutinação, lise mediada por complemento e por imunoprecipitação. Os resultados obtidos mostram o aparecimento, ao longo do experimento, de anticorpos contra a superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (TABELA II). O padrão de antígenos de superfície obtido com o soro desses animais imunes é o mesmo descrito anteriormente (resultados não apresentados) para a superfície de formas tripomastigotas (Andrews, Katzin & Colli, 1984).

Na literatura, existe a associação entre infecção prévia e proteção contra um inóculo de *T. cruzi*. Isso levou alguns autores a proporem a dissociação entre a chamada sorologia convencional e a presença de anticorpos líticos (Krettli & Brener, 1982; Krettli, Cançado & Brener, 1982), isto é, somente soros provenientes de animais infectados seriam capazes de lisar o *T. cruzi* (lise esta dependente de complemento) e conferir proteção. Embora essa generalização seja passível de discussão, o

TABELA II Reações mediadas por anticorpos em soro de camundongos imunizados com formas tripomastigotas de cultura de tecido tratadas com 8-MOP (cepa Y)^a (em Andrews et al, 1985).

Soro	Imuno-	Aglutinação	Lise ^b	Imuno-
	fluorescência	direta		precipitação
	(Título)	(Título)	(%)	(cpm)
controle	negativo	negativo	negativo	2.000
Dia 11	40	negativo	10	2.300
Dia 28	600	60	60	10.300
Dia 48	1.200	400	90	15.200
Dia 76 (Lote A)	3.200	400	ND	15.200
Dia 76 (Lote B)	800	200	ND	ND
Dia 111 (Lote A)	1.600	100	55	ND
Dia 111 (Lote B)	1.600	100	70	ND

a- Os valores mostrados (excepto imunoprecipitação) correspondem à média dos resultados obtidos para cada camundongo (10 camundongos nos dias 11, 28 e 48 ; 5 camundongos nos dias 76 e 111 dos lotes A ou B).

b- Lise mediada por complemento.

ND- Não determinado.

fato é que até o momento, incluindo nossos resultados, não se afastou a relação infecção-proteção *in vivo*.

Nosso objetivo ao tratar as formas tripomastigotas de cultura de tecido com 8-MOP foi procurar um método que mantivesse a superfície do parasita inalterada e estimulasse uma boa resposta humoral em camundongos para que pudesse ser utilizado na obtenção de anticorpos monoclonais. Os resultados mostram que o parasita tratado com 8-MOP é capaz de invadir monocamadas de células *in vitro*, tendo, no entanto, seu desenvolvimento posterior alterado e que esses parasitas tratados quando inoculados em camundongos, levam ao aparecimento de altos títulos de anticorpos. Um resultado importante é que esses camundongos, mostraram-se resistentes a um inóculo com formas infectantes não tratadas (tripomastigotas de cultura de tecido ou sanguícolas), ao contrário dos animais controle. Embora não se tenha obtido proteção total, os resultados do tratamento com 8-MOP sugerem que a apresentação dos antígenos na superfície do parasita deve ser importante na obtenção de boa resposta imune. O tratamento do *T. cruzi* com substâncias como formaldeído ou glutaraldeído alteram alguns antígenos, além de fornecerem baixos níveis de anticorpos, quando inoculados em camundongos (Alves, dados não publicados, Yoshida, 1983).

A imunização de camundongos com formas tripomastigotas tratadas com 8-MOP preenchia a maioria dos requisitos estabelecidos anteriormente para ser empregada na obtenção de anticorpos monoclonais. Camundongos das linhagens A/Snell e Balb/c foram imunizados da maneira descrita e suas células de baço fundidas

com células de mieloma P3U1, utilizando-se PEG 35% como agente fusogênico. A reatividade dos anticorpos monoclonais obtidos com diferentes estágios do parasita e o tipo de imunoglobulina secretada pelos híbridos são apresentados na TABELA III. Pelos resultados de imunofluorescência indireta, três dos anticorpos monoclonais reagiram com formas epimastigotas e tripomastigotas e oito reconheceram especificamente formas tripomastigotas, exceto um, que apresentou fraca reação também com formas amastigotas isoladas de baço de animais infectados. Os anticorpos monoclonais por nós obtidos e específicos para as formas infectantes, reagiram com formas tripomastigotas isoladas de cultura de tecido, de sangue de camundongos, de urina de insetos ou de meio axênico (meios M-16 ou TAU-3AG).

O efeito dos anticorpos monoclonais na invasão de células de cultura de tecido pelo *T. cruzi* foi verificada adicionando-se ao meio de incubação 1 mg/ml de proteína previamente concentrada, a partir de sobrenadante de cultura dos hibridomas (50% de sulfato de amônio). Utilizaram-se como controles, um anticorpo monoclonal (B10/3), não reativo, por imunofluorescência indireta, com a superfície de formas tripomastigotas, soro de camundongos imunizados contra o parasita tratado com 8-MOP e soro de camundongos normais. Não se observaram mudanças na motilidade ou aglutinação dos parasitas nas condições do experimento. Os resultados são apresentados na TABELA IV. Os anticorpos monoclonais H1A10 e 6A2 apresentaram os melhores resultados de inibição de penetração do parasita *in vitro*, com variações entre 50 e 70%,

TABELA III - Reatividade dos anticorpos monoclonais com diferentes estágios da *T. cruzi*, fixados com formaldeído (em Alves, Abuin, Kuwajima & Colli, 1986).

Clone	Isotipo	Formas tripomastigotas					
		a		b		b	
		cultura a tecido	sanguícolas	Metacíclicas (inseto)	Metacíclicas (meio axênico)	Epimastigotas	Amastigotas
H3G6	IgM	+	+	+	+	+	-
L5B11	IgG1	++	++	ND	++	++	-
L1D10	IgM	+	++		++	+	-
L2B4	IgG1	++	++		+	-	-
L2B11	IgM	++	+			-	-
L2E11	IgG2a			ND		-	-
H1A10	IgG2a	++	+	+	++	-	-
H1H8	IgG2a ⁻¹	++	++	+	++	-	-
6A2	IgG2a	++	+		++	-	-
3D11	IgM	+	+	+	++	-	-
L2F9	IgM	+			+	-	-

a- cepa Y

b- cepa W, recém isolada de preã. Também se empregou a cepa Y no caso de H1A10 e L1D10. Gentilmente fornecidas pela Dra. Gentilda K.F. Takeda e pelo Dr. Eloi S. Garcia.

c- clone CL-14, derivado de cepa CL

ND- Não determinado

TABELA IV - Efeito de anticorpos monoclonais na invasão de célula de cultura de tecido pelo T.cruzi (cepa Y). (em Alves, Abuin, Kuwajima & Colli, 1986).

Anticorpo monoclonal (1mg/ml)	^a Experimento 1		^a Experimento 2	
	parasitas/100 células	Inibição	parasitas/100 células	Inibição
		(%)		(%)
B10/3	51,0 ± 1,5	0	103,2 ± 2,1	0
H1A10	21,0 ± 1,4	58,8	31,3 ± 1,1	69,6
6A2	25,9 ± 1,0	49,2	36,5 ± 1,2	64,6
L2B11	32,6 ± 2,4	36,0	-	-
3D11	35,1 ± 1,3	31,1	-	-
L2B4	41,3 ± 2,4	19,0	-	-
L1D10	43,2 ± 2,7	15,2	89,9 ± 2,7	12,8
H1A10 + 6A2	16,8 ± 0,9	67,0	-	-
6A2 + 3D11	24,4 ± 4,5	46,2	-	-
^d Soro normal	54,4 ± 1,3	0	124,6 ± 2,8	0
^d Soro imune	21,9 ± 0,9	59,7	49,9 ± 1,5	59,9

a. Os resultados representam a média (±S.D.) de 6 lamínulas. Foram contadas 300 células/lamínula.

b. Soros utilizados na diluição de 1:100.

dependendo do experimento. Esses índices de inibição de penetração não foram alterados quando se adicionaram diferentes combinações de anticorpos monoclonais, entre elas H1A10 e 6A2, nas concentrações de 1 mg/ml cada um ou mesmo pelo aumento da concentração de H1A10 até 3 mg/ml (FIGURA 10). O mesmo resultado foi obtido quando se utilizaram nos ensaios de inibição de penetração fragmentos Fab preparados a partir do monoclonal H1A10 (FIGURA 11). Também uma inibição parcial foi obtida quando fragmentos Fab preparados a partir de anticorpos obtidos de coelhos imunizados contra o *T. cruzi* foram utilizados no ensaio, confirmando dados anteriores (Colli et al, 1984). É interessante notar que a reatividade do anticorpo monoclonal H1A10, observada por imunofluorescência indireta ou por microscopia de alta eletrônica foi heterogênea entre os indivíduos da população de formas tripomastigotas isoladas de cultura de tecido (FIGURA 12).

O antígeno reconhecido pelos monoclonais H1A10 ou 6A2 na superfície de formas tripomastigotas de cultura de tecido previamente marcadas pela técnica de Iodo-Gen-¹³¹I apresenta 85 kDa de peso molecular e um ponto isoelétrico distribuído em uma faixa bastante ampla (FIGURA 13). Quando as formas tripomas-³⁵tigotas de cultura de tecido foram incubadas com metionina-³⁵S e seu extrato imunoprecipitado com os mesmos anticorpos monoclonais, também um único polipeptídio de 85 kDa foi imunoprecipitado (FIGURA 14). Esse antígeno liga-se especificamente a colunas de WGA-Sepharose (resultados não apresentados). Essas características correspondem à glicoproteína

Figura 10. Efeito da concentração do anticorpo monoclonal H1A10 na invasão de células *in vitro* por formas tripomastigotas de cultura de tecido, cepa Y. As condições experimentais são as descritas na Tabela IV. (Δ) H1A10; (X) B10/3 (controle). (em Alves, Abuin, Kuwajima & Colli, 1986).

Figura 11. Efeito da concentração de fragmentos Fab na invasão *in vitro* de células LLC-MK2 por formas tripomastigotas de cultura de tecido, cepa Y. Condições experimentais iguais às descritas na Tabela IV (Δ) fragmentos Fab de H1A10; (O) fragmentos Fab do soro policlonal obtido contra formas tripomastigotas de cultura de tecido previamente tratadas com 8-MOP. (em Alves, Abuin, Kuwajima & Colli, 1986).

Figura 12. Reatividade do anticorpo monoclonal H1A10 com formas tripomastigotas de cultura de tecido, cepa Y. O parasita foi fixado previamente, antes de ser incubado com o monoclonal. Foto obtida pelo Dr. W. de Souza (Aumento 45000x).

Figura 13. Autoradiograma do antígeno de superfície reconhecido pelo anticorpo monoclonal H1A10 em formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). A superfície dos parasitas foi marcada com ¹³¹I-Iodo-Gen, o extrato imunoprecipitado com o monoclonal e submetido a eletroforese bidimensional. (em Alves, Abuin, Kuwajima & Colli, 1986).

Figura 14. Autoradiograma de formas tripomastigotas de cultura de tecido metabolicamente marcadas e imunoprecipitadas com o anticorpo monoclonal H1A10. Os parasitas foram incubados com metionina-³⁵S em diferentes tempos: 1. 15 min; 2. 30 min; 3. 60 min; 4. 120 min; 5. 180 min.

Tc-85 previamente descrita em *T. cruzi* nas formas tripomastigotas de cultura de tecido (Katzin & Colli, 1983). No entanto o isolamento da Tc-85 por coluna de afinidade com H1A10, seguida de cromatografia em coluna de WGA-Sepharose, mostrou que somente parte das moléculas se ligam à WGA-Sepharose, indicando uma heterogeneidade na composição da Tc-85, devida provavelmente ao conteúdo de ácido siálico e/ou N-acetil-D-glicosamina.

As formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* obtidas em meio axênico, com capacidade de invadir células de cultura de tecido, reagem com os anticorpos monoclonais H1A10 e 6A2. Os polipeptídios reconhecidos pelo H1A10 na superfície de formas metacíclicas da cepa Y ou do clone CL-14 previamente marcados com Iodo-Gen-¹³¹I têm 82 - 81, 78 - 77 e 74 - 71 kDa. A intensidade relativa de cada polipeptídio após a imunoprecipitação varia no entanto de experimento para experimento. A eletroforese bidimensional de formas tripomastigotas metacíclicas do clone CL-14 previamente marcado com ¹³¹I mostra um polipeptídio principal distribuído em uma ampla faixa de ponto isoelétrico, como a Tc-85, embora de peso molecular menor (FIGURA 15). É interessante ressaltar que embora os polipeptídios sejam glicoproteínas, devido à sua ligação específica a colunas de Con A-Sepharose, sua ligação a colunas de WGA-Sepharose é praticamente inexistente (FIGURA 16). Esses resultados mostram uma heterogeneidade nos antígenos reconhecidos pelo anticorpo monoclonal nos dois estágios infectantes do parasita.

Figura 15. Autoradiograma dos polipeptídios de superfície reconhecidos pelo anticorpo monoclonal H1A10 em formas tripomastigotas metacíclicas do clone CL-14 (obtidas em meio M-16). A superfície dos parasitas foi marcada com ¹³¹I-Iodo-Gen, o extrato imunoprecipitado com o monoclonal e submetido a eletroforese bidimensional. (Abuin, Gonçalves, Alves & Colli).

Figura 16. Antígenos de superfície reconhecidos pelo anticorpo monoclonal H1A10 de formas tripomastigotas metacíclicas submetidos a cromatografia de afinidade com lectinas (WGA e Con A). As formas tripomastigotas metacíclicas (CL-14) foram marcadas com ¹³¹I-Iodo-Gen e seu extrato submetido a cromatografia em WGA-Sepharose. O material não ligado à coluna foi cromatografado em colunas de Con A-Sepharose. O material não retido (PI) assim como o ligado especificamente (PII) foram imunoprecipitados com o H1A10. 1. PII de WGA-Sepharose; 2. PI de Con A-Sepharose; 3. PII de Con A-Sepharose. (Abuin, Gonçalves, Alves & Colli).

A capacidade do anticorpo monoclonal inibir *in vitro* a penetração de formas tripomastigotas metacíclicas foi verificada utilizando-se o clone CL-14, já que a cepa Y, utilizada nos demais experimentos, apresenta baixa porcentagem de diferenciação em meio axênico (20-30%). Nesse experimento utilizou-se como controle um anticorpo não relacionado (anti-esporozoíto de *P. knowlesi*). Os resultados apresentados na FIGURA 17 mostram uma inibição de penetração máxima da ordem de 80-90%.

Os anticorpos monoclonais obtidos contra o *Trypanosoma cruzi* mostram a presença de epitopos específicos das formas infectantes e comuns a outros estágios do parasita. A existência de antígenos comuns e estágio-específicos já foi largamente descrita na literatura (Snary et al, 1981; Nogueira et al, 1981; Zingales et al, 1982; Araújo et al, 1982; Alves, Aikawa & Nussenzweig, 1983; Katzin & Colli, 1983; Andrews, Katzin & Colli, 1984; Orozco et al, 1984; Subias et al, 1984; Leon, Wrigstman & Manning, 1985; Beard, Wrigstman & Manning, 1985; Teixeira & Yoshida, 1986).

Os ensaios de invasão do parasita *in vitro* realizados na presença de anticorpos monoclonais mostram que três deles (H1A10, 6A2 e 3D11) são capazes de inibir parcialmente a penetração de formas tripomastigotas de cultura de tecido. Os anticorpos H1A10 e 6A2 reconhecem uma glicoproteína de 85 kDa, com ponto isoelétrico entre 6,3 a 7,5 e que se liga parcialmente a WGA-Sepharose, evidenciando uma heterogeneidade na sua composição de carboidratos, devidas a N-acetil-D-glucosamina e/ou ácido siálico. A glicoproteína Tc-85 específica de formas

Figura 17. Efeito da concentração de anticorpo monoclonal H1A10 na invasão de células LLC-MK2 por formas tripomastigotas metacíclicas do clone CL-14. As condições experimentais são as mesmas da Tabela IV. (○) H1A10; (●) anti *P. knowlesi*. (Abuin, Gonçalves, Alves & Colli).

tripomastigotas descrita anteriormente (Katzin & Colli, 1983) apresenta também 85 kDa, pI amplo (6.3 - 7.5) e ligação específica com WGA-Sepharose. Esta ligação, no entanto, não pode ser utilizada para mostrar a presença ou não da Tc-85 em um determinado estágio. A ressalva passa a ser importante, uma vez que se sugeriu um papel para a Tc-85 no processo de invasão do parasita na célula hospedeira. No entanto, havia sido impossível até o momento, utilizando anticorpos policlonais contra o *T. cruzi*, identificar a Tc-85 na superfície de formas tripomastigotas metacíclicas, uma vez que nenhuma glicoproteína de superfície se ligava (ou se ligava muito pouco em alguns experimentos) às colunas de WGA-Sepharose. Os anticorpos monoclonais H1A10 e 6A2 reconhecem 3 polipeptídios na superfície de formas tripomastigotas metacíclicas (82-81, 78-77 e 74-71 kDa) tanto no clone CL-14 e cepa Y, que se ligam a colunas de Con A-Sepharose e não a WGA-Sepharose. Como comentantado, a intensidade de cada polipeptídio varia de experimento para experimento, refletindo ou uma diferença no grau de processamento da glicoproteína ou mesmo a diferenças devidas a algum componente no meio de cultura.

Os estudos de inibição de penetração com o monoclonal H1A10 e seus fragmentos Fab sugerem que essa inibição é específica, embora parcial nas formas tripomastigotas de cultura de tecido da cepa Y (em torno de 50%). É interessante notar que, por imunofluorescência indireta ou por microscopia eletrônica, se observou reação do monoclonal somente com parte da população. Já a inibição de penetração de formas tripomastigotas

metacíclicas (clone CL-14) com o monoclonal H1A10 atinge níveis mais altos, em torno de 80-90%. Neste caso, a reação de imunofluorescência indireta com o monoclonal é mais homogênea entre a população do parasita. Os resultados obtidos com as formas tripomastigotas metacíclicas, em relação às de cultura de tecido, poderiam ser devidos ao emprego neste caso de uma população clonada (CL-14). Esta, no entanto, não parece ser a explicação mais provável, uma vez que obtivemos recentemente com uma mesma cepa (YuYu), resultados de inibição de penetração com o anticorpo monoclonal H1A10 mais acentuados nas formas tripomastigotas metacíclicas do que nas isoladas de cultura de tecido.

A invasão de uma célula por um parasita é provavelmente um mecanismo bastante complexo, com uma fase de adesão (com a interação molecular entre as duas células), seguida de penetração. Não foi possível ainda estabelecer se os anticorpos monoclonais que reconhecem a Tc-85 interferem com alguma dessas duas etapas. É interessante que se descreveu recentemente um receptor para fibronectina de 85 kDa na superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Coutinho, Alves & Colli, 1985; Ouaisi, Cornette & Capron, 1986). Uma possível identidade entre esse receptor e a Tc-85 ainda não foi estabelecida.

Algumas hipóteses poderiam ser formuladas para explicar as diferenças de inibição observadas entre os dois estágios do parasita ou mesmo da variação entre a população de um estágio: mais de um mecanismo de adesão e/ou penetração; diferenças fisiológicas; diferentes afinidades de anticorpo pelo

antígeno ou mesmo diferentes capacidades da população de eliminar o complexo antígeno-anticorpo de sua superfície. Na verdade, a eliminação do complexo antígeno-anticorpo foi relacionado com a capacidade de evasão do parasita ao sistema imune do hospedeiro (Schmunis et al, 1978).

Como os antígenos reconhecidos pelo anticorpo monoclonal H1A10 nos dois estágios têm um peso molecular próximo e diferem na sua ligação a colunas de WGA-Sepharose, essas diferenças talvez possam ser atribuídas tão somente ao seu conteúdo de ácido siálico e/ou N-acetil-D-glicosamina. A presença de ácido siálico foi descrita na Tc-85 (isolada de cepa Y) fazendo parte de oligossacarídeos contendo manose, galactose e glicosamina, ligados à proteína por ligações N-glicosídicas (Couto et al, 1986). A importância dos açúcares na superfície das células está, em alguns casos, bem estabelecida (cf. Feizi, 1984; Feizi & Childs, 1985; Finne, 1985), embora nem sempre seja essencial que essa glicosilação esteja completa (Hongo et al, 1985). É interessante notar que em *T. cruzi* foi descrita uma neuraminidase com atividade específica de 6 a 15 vezes maior nas formas tripomastigotas do que nas epimastigotas e totalmente ausente nas formas amastigotas (Pereira, 1983). Também foi descrita uma atividade de transglicosidase (Pessolani et al, 1984; Andrade et al, 1984). A relação entre essas duas enzimas ainda é desconhecida, mas os anticorpos monoclonais obtidos contra a neuraminidase talvez possam auxiliar a estabelecê-la (Harth, Haidaris & So, 1986). Aparentemente o ácido siálico não é sintetizado pelo parasita (Schauer et al, 1983), sendo

possivelmente retirado de macromoléculas existentes no meio (Schotellius, 1984; Pessolini et al, 1984). Como as formas tripomastigotas metacíclicas utilizadas para os experimentos foram obtidas em meios sem macromoléculas (TAU-3AG) ou com soro (M-16) e as formas tripomastigotas de cultura de tecido em meio contendo soro e na presença de monocamada de células, a(s) glicoproteína(s) reconhecida (s) pelo anticorpo monoclonal poderia (m) conter maior ou menor quantidade de ácido siálico, dependendo do meio utilizado. Deve-se ressaltar que os experimentos de inibição de penetração foram realizados com formas tripomastigotas metacíclicas obtidas em meio TAU-3AG.

Apesar das heterogeneidades detectadas pelos anticorpos monoclonais na superfície das formas infectantes do *T. cruzi* e nos ensaios de inibição de penetração, é mais simples supor que haja um único mecanismo envolvido na invasão do *T. cruzi*. A continuação dos estudos apresentados talvez possam nos aproximar do entendimento desse mecanismo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cultivo de *T. cruzi*

a. Formas epimastigotas

As cepas e clones de *T. cruzi* utilizadas encontram-se relacionadas no anexo, com sua origem geográfica, hospedeiro de origem e referência bibliográfica.

As formas epimastigotas foram crescidas em meio LIT (Liver Infusion - Tryptose), conforme descrito em Camargo (1964) e Castellani et al (1967) (TABELA V). Esse meio produz até 2.10⁸ formas epimastigotas por ml quando o parasita é mantido a 28 °C, sob agitação suave (no nosso caso, agitador rotatório, 120 rpm). Outros fatores importantes são a infusão de fígado e a fonte de hemina utilizadas. Os melhores resultados têm sido obtidos com a infusão preparada no laboratório a partir de fígado fresco e a hemoglobina, a partir de hemácias, obtidas durante a preparação de soro de boi, um componente do meio LIT.

Esse meio, assim preparado, tem como desvantagem o problema da esterilização. Até pouco tempo atrás, era possível encontrar no mercado filtros EKS (Zeiss), de 22 cm de diâmetro, que esterilizavam rapidamente 10 l de meio. Este sistema funcionou em nosso laboratório, sem qualquer problema por mais de 15 anos. Cerca de 5 meses atrás, iniciamos a esterilização com filtros Millipore. No entanto, mesmo com a utilização

de pré-filtros, não foi possível obter bons resultados (filtração rápida e volume razoável/filtração). Estamos no momento iniciando um novo sistema, que é a esterilização em autoclave da solução de glicose (2g em 500ml H₂O) e dos demais componentes (infusão de fígado, triptose, hemina e os sais) em 500 ml de água bidestilada. Neste caso substituímos a hemoglobina por uma solução de hemina.

A infusão de fígado foi preparada a partir de fígado fresco, limpo e moído. A cada 750g de massa moída, adicionou-se 1l de água destilada. Esse material foi colocado em um banho-maria a 50°C por 1 hora com homogeneizações eventuais, seguido de fervura por 5 minutos, filtrado em gaze e deixado a 4°C . A seguir foi novamente filtrado em tecido fino e congelado.

A hemoglobina foi obtida a partir de hemácias, previamente lavadas com PBS (2x), adicionando-se 1 volume de água. Depois de 30 minutos, o material foi centrifugado e diluído 2-3 vezes com água e guardado congelado.

As formas epimastigotas foram mantidas por subcultivos iniciados com um inóculo de aproximadamente $20 \cdot 10^6/\text{ml}$ e sub-cultivadas a cada 3 dias, para a cepa Y e semanalmente no caso das demais cepas, que foram cultivadas sem agitação.

Quando necessário, as formas epimastigotas foram centrifugadas e lavadas com NaCl 0,9% ou meio DME (1000g, 15min.).

b. Formas tripomastigotas metacíclicas (meio axênico)

A obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas em

meio axênico está associada aparentemente à ausência de nutrientes (meio "pobre"): observa-se um aumento de formas tripomastigotas metacíclicas na fase estacionária do crescimento do parasita em meio LIT. Isso no entanto é cepa-dependente.

Para a obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas utilizamos o meio M-16 (Chiari & Camargo, 1984) ou o meio TAU-3AG (Contreras, Morel & Goldenberg, 1985) (TABELA V). Ambos oferecem bons resultados. No entanto, nem todas as cepas apresentam boa diferenciação. A cepa Y é uma delas. Há necessidade de várias passagens no meio de diferenciação para aumentar o rendimento (no nosso caso, máximo de 20-30%). Outras cepas e/ou clones alcançam níveis de diferenciação de quase 100% e os resultados são semelhantes, de experimento para experimento. No caso da cepa Y, aparecem, embora raramente, no próprio meio LIT, formas tripomastigotas metacíclicas (até 50% da população), sem qualquer explicação aparente.

Para a obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas
6
25.10⁶ formas epimastigotas por ml foram inoculadas em meio M-16. No caso do clone CL-14 após 7 dias, observou-se de 30 a 60%
8
de formas metacíclicas. No meio TAU, 2 x 10⁸ formas epimastigotas por ml são submetidas a um tratamento prévio de 2 horas no meio, seguido de incubação no meio TAU-3AG (TABELA V) na concentração
7
2,5 x 10⁷ células/ml. Ao fim de 4-5 dias obtem-se cerca de 50-70% de diferenciação para o clone CL-14. Quando necessário, as formas metacíclicas foram separadas das formas epimastigotas em colunas
9
de DEAE celulose, DE-52 (Whatmann). Entre 1 a 2.10⁹ parasitas foram purificados em 8 ml de resina (colocadas em seringas

descartáveis de 10 ml), equilibrada em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0, contendo NaCl 70 mM e 5,4% de glicose. As formas epimastigotas são ligeiramente retidas na coluna, ao contrário das formas metacíclicas. Coletaram-se cerca de 3ml por tubo e por observação ao microscópio óptico, selecionaram-se aqueles contendo as formas tripomastigotas metacíclicas. Desta maneira foram obtidas de 96 a 100% de formas tripomastigotas. O rendimento da coluna é variável (de 30 a 50%).

As formas tripomastigotas metacíclicas, quando necessário, foram centrifugadas e lavadas em meio DME ou PBS (1000g, 10 min.)

c. Formas tripomastigotas de cultura de tecido

As formas tripomastigotas de cultura de tecido foram obtidas inicialmente pelo inóculo de 1.10^6 formas sanguícolas, (de camundongos infectados, fase aguda) em garrafas de 36 cm² contendo monocamadas confluentes de células LLC-MK2 em meio DME suplementado com 2% de soro de vitelo. Após 48 horas, o meio foi retirado e adicionado novamente DME contendo 2% de soro de vitelo (Andrews e Colli, 1984). As formas tripomastigotas começam a ser liberadas no meio em torno do quinto dia após a infecção, sendo utilizados nos experimentos, parasitas liberados até o sétimo dia (no caso da cepa Y). A infecção de novas garrafas foi feita a partir de formas tripomastigotas de cultura de tecido, (10×10^6) até aproximadamente a 13^a infecção sucessiva. Reinicia-se então o processo a partir de formas sanguícolas. No

meio, são liberadas além das formas tripomastigotas, também formas amastigotas em proporções variadas (0-50%). Quando necessário, as formas tripomastigotas foram purificadas por centrifugação dos parasitas (1000g, 10 min.). Após 1 hora a 37 °C, o sobrenadante contendo a maioria das formas tripomastigotas foi separado. A porcentagem de formas tripomastigotas de cultura de tecido obtida depende da cepa empregada, entre outros fatores. Por exemplo para a cepa Y foram obtidas de 3 a 5 $\times 10^6$ formas tripomastigotas por ml, em média, com 0 a 30% de amastigotas. Já no caso do clone CL-14 foram obtidas praticamente só formas amastigotas, nas tentativas realizadas até o momento.

As células LLC-MK2 foram mantidas no laboratório em meio DME suplementado com 5% de soro de vitelo e o subcultivo foi feito por tratamento com tripsina (0,1% em tampão fosfato 10 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM e 10 mM de EDTA). As culturas foram iniciadas com cerca de 3×10^4 células por cm². Os subcultivos foram feitos a cada 7 dias.

d. Formas amastigotas

As formas amastigotas foram obtidas de fígado e baço de camundongos em fase aguda da infecção com o *T. cruzi* (7^o dia para um inóculo de 1×10^5 parasitas, cepa Y). O fígado e o baço foram macerados em meio isotônico, a 4 °C. Após homogeneização, o material foi filtrado em gaze, centrifugado (450g, 10 min.) e o sobrenadante obtido, novamente centrifugado (800g, 10 min.). O precipitado, contendo as formas amastigotas, foi colocado no topo

de um gradiente descontínuo de metrizamida (10, 15%) e centrifugado a 1000g por 45 min. Os parasitas, localizados na interface do gradiente foram retirados, lavados e submetidos a uma última etapa de purificação em Percoll (30, 60%) e centrifugados a 800g por 15 min.).

2. Obtenção de anticorpos monoclonais

a. Imunização de camundongos

Camundongos Balb/c ou A/snell foram imunizados com formas tripomastigotas de cultura de tecido, cepa Y, previamente tratadas com 8-Metoxipsoralen (8-MOP), como descrito (Andrews et al, 1985). 8-MOP foi dissolvido em dimetil sulfoxido (1 mg/ml) e guardado, na ausência de luz, a -20°C . 1.10^8 formas tripomastigotas de cultura de tecido, lavadas em meio DME (2 vezes) foram ressuspensas em 10 ml de PBS e incubadas com 8-MOP (10 ug/ml, 10 min., temperatura ambiente, na ausência de luz) em uma placa de Petri de 54 cm², forrada externamente com papel alumínio. A seguir, a solução foi submetida a irradiação por luz ultravioleta (365 nm, 20 min), no escuro e sob agitação constante. A potência de irradiação, determinada por um medidor de luz ultravioleta modelo J-221, foi no total de $2,5.10^4$ J.M⁻². Após o tratamento os parasitas foram lavados com DME, ressuspensos entre 0,1 e 0,3 ml de DME e inoculados em camundongos. As condições de tratamento dos parasitas com 8-MOP foram determinadas fixando-se a concen-

tração de 8-MOP e variando-se o tempo de incubação dos parasitas com a luz ultravioleta (5, 10, 15, 20 e 40 minutos). A seguir esses parasitas foram inoculados em camundongos e a parasitemia seguida diariamente. A partir de 15 min. de tratamento não se observaram parasitas circulantes no sangue de camundongos inoculados. O tempo de 20 minutos foi então fixado.

Para os experimentos de fusão celular, os camundongos receberam de 3 a 4 doses idênticas de 1.10^8 formas tripomastigotas tratadas com 8-MOP por via endovenosa, em intervalos de 2 semanas. Nessas condições, obtiveram-se títulos de imunofluorescência indireta da ordem de 1:2000 - 1:4000, quando formas tripomastigotas de cultura de tecido, previamente fixadas com formaldeído, foram utilizadas como antígeno. Os mesmos níveis de anticorpos foram obtidos quando os parasitas tratados com 8-MOP foram inoculados nos camundongos por via intraperitoneal.

b. Fusão celular

Todas as técnicas descritas para a obtenção de anticorpos monoclonais estão baseadas, evidentemente, no trabalho descrito por Kohler & Milstein (1975). São em geral variações quanto ao agente fusogênico empregado: vírus Sendai inativado e polietilenoglicol (Revisões em Galfre & Milstein, 1981; Yelton & Scharff, 1981). Também foi descrita na literatura, aparentemente com bons resultados, fusão por pulso elétrico (Teissie et al, 1982). Um avanço significativo foi o desenvolvimento da transformação *in vitro* de linfócitos B por vírus

Epstein-Barr, possibilitando a obtenção de linhagens de células humanas produtoras de anticorpos com especificidade definida (Luzzati, Hengartner, Schreier, 1977; Steinitz et al, 1977; Steinitz et al, 1980). Por facilidade, utilizamos polietilenoglicol (PEG) como agente fusogênico. Os protocolos que utilizam PEG, podem ser reunidos em 2 tipos básicos: os que empregam PEG nas concentrações finais de 35% ou 50%. E a partir daí há uma miríade de pequenas variações, chegando-se ao ponto de cada laboratório ter seu próprio protocolo. Na verdade, para um mesmo protocolo e mesmas soluções originais, o rendimento em híbridos é bastante variado, havendo as boas e as péssimas fusões. O protocolo utilizado está descrito, com uma série de comentários técnicos, em Lopes & Alves (1984).

Quatro dias após a última injeção endovenosa de formas tripomastigotas de cultura de tecido tratadas com 8-MOP, o camundongo foi sacrificado, seu baço removido e colocado em uma placa de Petri contendo uma solução estéril, que pode ser o meio de cultura sem soro (DME, por exemplo) ou uma solução salina. O baço foi transferido sucessivamente por 5 placas de Petri, contendo meio estéril e na última foi submetido a 3 ou 4 incisões. Por pressão suave com uma pinça, as células foram liberadas no meio. O conteúdo da placa foi removido para um tubo de ensaio cônico (volume em torno de 10 ml) e deixado em repouso por 10 min. O sobrenadante foi removido, transferido para outro tubo e centrifugado (700 g, 10 min). As células obtidas foram então ressuspensas em 1 - 2 ml de DME. A esse tubo foram acrescentadas

7
1.10 células de mieloma utilizadas para a fusão (viabilidade

acima de 95%). A mistura de células foi então centrifugada (500 g, 10 min) e o sobrenadante cuidadosa e totalmente retirado. Ao tubo, colocado sob agitação rotatória suave, foi adicionado, gota a gota, 1 ml da solução de 35% de PEG (4000 Sigma) ao longo de 1 minuto. Após 90 segundos adicionais de incubação, adicionaram-se, lentamente, 3 ml de DME (durante 3 min), seguidos de 10 ml de DME contendo 20% de soro fetal (durante 3 min). As células foram então deixadas em repouso por cerca de 10 minutos e centrifugadas (500 g, 10 min). O precipitado, ressuspensão em 50 ml de meio HT (DME suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10^{-4} M de hipoxantina e $1,6 \cdot 10^{-5}$ M de timidina), foi distribuído em 4 a 5 placas de plástico de 96 poços por placa (100 μ l/poço) e colocadas na estufa a 37 °C, com atmosfera de 5-7% de CO_2 . Principalmente após a fusão, reduz-se ao mínimo o número de vezes em que as células são pipetadas. 24 horas após a fusão, adicionou-se igual volume do meio HAT (meio HT contendo $4 \cdot 10^{-7}$ M de aminopterina) para a seleção dos híbridos (Littlefield, 1964). De maneira geral, os primeiros híbridos surgem entre o 7^o e o 10^o dia. Nessa etapa inicia-se a retirada de parte do meio HAT e a adição de igual volume de meio HT. Quando o híbrido ocupou aproximadamente 1/4 do poço, iniciaram-se os testes para a presença de anticorpos.

Existem várias linhagens de mieloma derivadas de camundongos Balb/c, produtoras ou não de imunoglobulinas (cadeias inteiras ou parte delas, excretoras ou não dessas moléculas). Preferencialmente a linhagem a ser utilizada não deve produzir imunoglobulinas, ser de fácil cultivo e fornecer, após a fusão,

boa quantidade de híbridos estáveis. Nem sempre estas características estão todas associadas. Utilizamos normalmente a linhagem P3U1, secretora de cadeia k (Potocnjak et al, 1980), deficientes na enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (8-azaguanina resistentes). Foram mantidas em meio DME suplementado com 10% de soro fetal bovino e subcultivadas a cada 3 dias, a partir de um inóculo de 50×10^3 células/ml. Nestas condições a viabilidade, por contagem ao microscópio óptico das células incubadas com azul de trypan (0,1% em PBS), mantém-se acima de 95 %. O camundongo a ser utilizado na fusão deve ser preferencialmente da linhagem Balb/c. Realizamos uma fusão também com camundongos A/snell, com resultados semelhantes. O problema surge quando se tenta obter líquido ascítico.

c. Seleção e expansão de híbridos positivos

Este é o ponto crucial na etapa de obtenção de anticorpos monoclonais. É necessário que se tenha um método rápido e fácil, de preferência que selecione o híbrido já para a propriedade que se está buscando. Optamos por selecionar os híbridos por imunofluorescência indireta, utilizando como antígeno formas tripomastigotas de cultura de tecido previamente fixadas com formaldeído. Os híbridos positivos foram expandidos e clonados por diluição limitante (0,5 células por poço) em placas de 96 poços. Durante o processo de expansão e clonagem utilizaram-se timócitos, que foram obtidos de camundongos

de 4 a 6 semanas de idade. O animal foi sacrificado, o timo removido assepticamente, as células, liberadas por pressão com uma pinça, separadas de restos de tecido por decantação, centrifugadas e ressuspensas em meio DME suplementado com 10% de soro fetal bovino ($4 \cdot 10^6$ células por ml). Aproximadamente, 50 μ l foram utilizados por poço para as placas de 96 poços e 200 μ l para as de 24. Como a etapa de expansão é bastante crítica, deve ser feita paulatinamente e a positividade dos híbridos acompanhada. A seleção dos clones positivos e sua expansão segue as mesmas etapas já descritas para os primeiros híbridos obtidos. Quando se obtém um certo número de células positivas, a primeira providência é congelá-las. Para tanto, aproximadamente $3 \cdot 10^6$ células foram ressuspensas em 1 ml de meio DME, contendo 10% de soro fetal bovino e 10% de DMSO, colocadas a 4°C por 1 hora, a -70°C durante aproximadamente 12 horas e transferidas para nitrogênio líquido. Todo o processo foi feito em tubos de congelamento (em média de 2 a 3 tubos por híbrido). O descongelamento deve ser feito rapidamente a 37°C , as células transferidas para um tubo contendo DME com 10 % de soro (cerca de 10 ml), centrifugadas (500 g, 10 min) e colocadas nas condições de cultivo.

d. Obtenção de anticorpos monoclonais em larga escala

O líquido ascítico foi obtido inoculando-se 0,5 ml de pristine (2,4,6,14-tetrametilpentadecano) no peritônio de camundongos, seguido (1 hora a 15 dias depois) de $1-3 \cdot 10^6$ células

híbridas. Não observamos qualquer diferença na obtenção de líquido ascítico nesse intervalo testado, de 1 h a 15 dias. O tumor ascítico atinge crescimento máximo entre 1 a 4 semanas, dependendo da velocidade de crescimento do híbrido e do número de células inoculado. O líquido ascítico foi retirado, as células separadas por centrifugação (500 g, 10 min) e o sobrenadante contendo o anticorpo monoclonal foi guardado em pequenas alíquotas a -20°C . Alguns monoclonais não produziram ascites. Nesse caso, os hibridomas foram crescidos em meio de cultura e o anticorpo concentrado, a partir do sobrenadante de cultura de células, com 50% de sulfato de amônio. O sulfato de amônio, em solução saturada ou em pó, foi adicionado lentamente, sob agitação constante. A mistura foi equilibrada a 4°C por 1 h. e centrifugada (10000 g, 20 min). O sobrenadante foi removido, o precipitado dissolvido em água (cerca de 1/20 vezes o volume original) e dializado contra água por 24 horas, com várias trocas durante a diálise.

e. Determinação das classes e subclasses das imunoglobulinas

A determinação foi feita por dupla difusão em 1% de gel de agarose em Tris 10 mM, pH 7,5, contendo 0,1% de azida sódica, a 37°C , por 24 - 72 hs, em câmara úmida. Os anticorpos monoclonais utilizados foram previamente concentrados (5 - 10 vezes) com 50% de sulfato de amônio a partir do sobrenadante de cultura dos híbridos. Os antisoros específicos para cada classe e subclasse de imunoglobulina foram obtidos em coelhos e adquiridos

comercialmente. De maneira geral, a reação de precipitação neste sistema é facilmente detectada. Quando necessário, o gel foi corado. Para tanto, foi imerso em cloreto de sódio 0,9% e após 20 minutos, foi colocado sobre o gel uma camada de papel de filtro molhado com água. Sobre a mesma colocaram-se mais folhas de papel de filtro (7-8) e um pequeno peso, por aproximadamente 3 minutos. O gel foi novamente colocado na solução de NaCl por 20 minutos. Todo o processo foi repetido por cerca de 8 vezes. Alternativamente, o gel foi deixado na solução de cloreto de sódio por 3 dias, com trocas eventuais. Para a coloração, colocou-se papel de filtro embebido em água sobre o gel, sendo a secagem feita com secador de cabelo ou em estufa. O papel foi removido e o gel colocado em uma solução de 0,25% de azul de Coomassie, em 45,4% de metanol e 9,2% de ácido acético, por 10 minutos à temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido com uma solução de 30% de metanol e 7% de ácido acético.

3. Obtenção de anticorpos policlonais

Os anticorpos contra formas tripomastigotas de cultura de tecido, cepa Y, foram obtidos pelo inóculo subcutâneo (em vários pontos) de 1.10^8 formas tripomastigotas tratadas com 8-MOP, em coelhos de 2 a 3 meses de idade. Os animais receberam pelo menos 3 doses, com intervalos de 15 a 20 dias, sendo que a primeira dose fornecida foi misturada com adjuvante completo de Freund e as demais com adjuvante incompleto (volume a volume,

final de 1 ml). A partir da segunda dose, os coelhos apresentaram, por imunofluorescência indireta, títulos de 1:1000 a 1:2000, utilizando-se como antígeno formas tripomastigotas. Sete dias após a última dose, o sangue dos animais foi retirado, incubado a 37 °C por 30 minutos, seguido de 18 horas a 4 °C. A seguir, foi centrifugado (10000 g, 30 min) e o soro obtido foi distribuído em alíquotas e guardado a -20 °C.

O soro anti-Y foi obtido inoculando-se intraperitonealmente formas viáveis do parasita em camundongos Swiss. Inicialmente inocularam-se $2,7 \cdot 10^3$ formas de cultura, (92% de formas epimastigotas e 8% de formas tripomastigotas metacíclicas). A segunda dose, 15 dias depois, foi de $2,3 \cdot 10^5$ formas tripomastigotas metacíclicas de meio axênico, purificadas em colunas de DEAE-celulose DE-52 e 15 dias depois, os camundongos receberam dose idêntica. A última dose, foi de $1 \cdot 10^5$ formas tripomastigotas sanguícolas. O sangue dos camundongos foi coletado 7 dias depois, o soro preparado da maneira descrita acima e guardado a -20 °C.

Os anticorpos contra um antígeno específico foram obtidos por cromatografia do extrato celular em colunas de anticorpo monoclonal-Sepharose. O anticorpo foi ligado a colunas de Sepharose-4B ativada, de acordo com as instruções do fabricante (Pharmacia) e incubado com o extrato do parasita (formas epimastigotas das cepas Y ou Guafitas) por 1 hora, à temperatura ambiente. A seguir o material foi exaustivamente lavado com PBS. Todo o complexo antígeno-anticorpo monoclonal - epharose foi inoculado em camundongos Balb/c (3 doses iguais,

com intervalos de 15 dias). O extrato dos parasitas (1.10⁸) foi obtido incubando-se o parasita com Tris 10 mM, pH 7,5, contendo 1% de Nonidet P-40, 1 mM de TLCK e 1mM de PMSF por 30 minutos a 37 °C e centrifugado a 10000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi então incubado com 1 ml de anticorpo monoclonal - Sepharose.

4. Purificação de anticorpos e obtenção de fragmentos Fab.

Os anticorpos foram inicialmente concentrados com 50% de sulfato de amônio, como descrito, e cromatografados em coluna de DEAE-celulose (20 mg de proteína por ml de resina). Os anticorpos eluídos da coluna com tampão fosfato 15 mM, pH 8.0, foram dializados contra água (3 trocas), concentrados por liofilização e ressuspensos em 1 ml de tampão Tris 25 mM, pH 7,5, com 150 mM NaCl. A seguir, foram recromatografados em colunas de Sephadex G-200 (1x 90 cm) e eluídos com o mesmo tampão. Os picos contendo a imunoglobulina (classe IgG) foram coletados e concentrados por liofilização.

Para a obtenção dos fragmentos Fab, 40 mg de imunoglobulina em tampão fosfato 0.1 M, pH 7,5 EDTA 2 mM, L-cisteína 10 mM, foram tratadas com 0,2 mg de papaína, por 2 h a 37 °C. (Nisonoff, 1964). Ao término da reação, os fragmentos Fab foram separados por cromatografia em Sephadex G-200 e as frações contendo os fragmentos Fab foram concentradas por liofilização.

5. Reatividade de anticorpos com *T. cruzi*

a. Imunofluorescência indireta

Os parasitas foram lavados 2 vezes com PBS contendo 1% de albumina bovina, ressuspensos no mesmo tampão e fixados com 2% de formaldeído por 12 horas a 4 ° C. A seguir foram novamente lavados (2 vezes), ressuspensos na concentração de 10 - 20.10⁶ parasitas por ml e colocados em lâminas adequadas para imunofluorescência (cerca de 5 ul por poço). Após secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram colocadas a -20 ° C. Essas lâminas assim preparadas têm sido guardadas e utilizadas por tempo superior a 1 ano. Para a reação de imunofluorescência, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e colocadas em PBS por 10 minutos. Após a remoção do excesso de PBS, colocou-se em cada poço 10 ul do anticorpo a ser testado, além dos controles (um soro positivo e um negativo) e a incubação foi feita a 37 ° C por 30 minutos em câmara úmida. As lâminas foram novamente lavadas em PBS e incubadas com 10 ul do segundo anticorpo marcado com isotiocianato de fluoresceína, diluído na concentração adequada em PBS e na presença de azul de Evans (1% em água), na mesma diluição do anticorpo fluorescente. O segundo anticorpo, dependendo do animal de origem do primeiro anticorpo (anti - imunoglobulina de camundongo, obtido em coelho ou cabra ou anti-imunoglobulina de coelho, obtido em cabra) foi utilizado em diluições previamente determinadas (1:40 ou 1:80). Após a incubação (37 ° C, 30 min), as lâminas foram lavadas (10 min. em PBS) e montadas sob lamínula

com glicerol, pH 9,0 para observação ao microscópio.

A imunofluorescência *in vivo* foi realizada da mesma maneira, exceto que todo o processo foi feito na presença de PBS contendo albumina e 0,01% de NaN₃ e em geral, 1.10^6 parasitas incubados com 50 μ l do anticorpo por 30 minutos a 4 °C. Os parasitas foram então lavados 3 vezes com o mesmo tampão, incubados com 50 μ l do segundo anticorpo marcado com fluoresceína por 30 minutos a 37 °C. Os parasitas foram novamente lavados, ressuspensos em glicerol, pH 9,0 e observados ao microscópio.

b. Aglutinação

Os parasitas foram lavados com DME (2 vezes) e ressuspensos em PBS contendo 1 mM de CaCl₂ e 1 mM de MgCl₂ na concentração de 6.10^6 parasitas/ml. 50 μ l dessa suspensão foram incubados com diluições crescentes dos anticorpos, em um volume final de 100 μ l. Após 1 hora a 28 °C, a aglutinação das formas epimastigotas foi observada em microscópio óptico invertido.

c. Microscopia eletrônica

As formas tripomastigotas foram lavadas em DME (2 vezes) e fixadas em 0,25% de glutaraldeído, mais 4% de paraformaldeído, em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2, por 30 minutos à temperatura ambiente. Foi feita uma solução estoque de 8% de

paraformaldeído, guardada a 4 °C e utilizada no intervalo de uma semana. Para tanto, o paraformaldeído foi dissolvido em água e adicionou-se gota a gota uma solução de NaOH até sua completa dissolução (60 °C).

Após a fixação, os parasitas foram incubados com o anticorpo monoclonal por 1 h, lavado 3 vezes com PBS, incubados com anti-imunoglobulina de camundongo ligada a ouro coloidal (400 Å) e processados para microscopia eletrônica pelo Dr. Wanderley de Souza (UFRJ).

6. Invasão de cultura de células pelo parasita. Efeito de anticorpos.

A metodologia empregada é a mesma descrita em Andrews & Colli (1982, 1984). 4 x 10⁴ células LLC-MK2 /cm² foram colocadas em placas de Petri contendo 3 lamínulas de vidro. As células foram cultivadas por 24 hs a 37 °C em estufa úmida com 5% de CO₂ em meio DME suplementado com 5% de soro de vitelo. As monocamadas foram lavadas com PBS estéril e incubadas com o tripanossoma por 2 a 3 horas em meio DME contendo 2% de soro a 37 °C. Após o período de incubação do *T. cruzi* com a monocamada de células, a maioria dos parasitas extracelulares foi removida por 3 lavagens com PBS, seguidas de um tratamento com água destilada por 2 minutos. As células foram fixadas com Bouin por 30 minutos e corados com Giemsa (solução comercial diluída 1:5), lavadas com água e acetona, secas ao ar e montadas na lâmina com Permount. O número de parasitas intracelulares foi

determinado no microscópio óptico. Foram contadas pelo menos 200 células para cada uma das 3 lamínulas.

Para verificar o efeito dos anticorpos na penetração, os parasitas foram incubados previamente com o anticorpo, na concentração desejada, por 1 hora a 4 °C, em meio DME com 2% de soro fetal bovino. Como controles, foram utilizados, conforme o caso, soro normal de camundongo (ou fragmentos Fab de suas imunoglobulinas purificadas), anticorpos monoclonais não relacionados ou soro normal de coelhos (ou fragmentos Fab).

7. Marcação isotópica. Identificação de antígenos

A superfície do *T. cruzi* foi marcada pela técnica de Iodo-Gen - ¹³¹I (1,3,4,6-tetracloro-3- α -6- α -difenilglicoluril, Pierce Bio Research Products) (Fraker & Speck, 1978). 20 μ g de Iodo-Gen em 500 μ l de clorofórmio foram colocadas por tubo de ensaio. Após a evaporação do solvente (feita na ausência de luz e a 37 °C, sob agitação) os tubos foram guardados sob vácuo e na ausência de luz até o momento de uso. 1.10⁸ parasitas, previamente lavados (3-5 vezes) com DME (formas tripomastigotas) ou PBS (formas epimastigotas) foram ressuspensos em 500 μ l de PBS e colocados no tubo contendo Iodo-Gen, no gelo. A reação foi iniciada pela adição de 200 a 300 μ Ci de ¹³¹I e processada por 10 minutos, no gelo. Os parasitas foram então lavados mais 2 ou 3 vezes.

A marcação com metionina-³⁵S foi feita pela incubação de 50.10⁶ parasitas (previamente lavados) em meio DME, sem

metionina, com 2% de soro fetal bovino por 30 minutos a 37°C, seguidos da adição de 25 uCi/ml de metionina-³⁵S. A marcação foi verificada por contagem da radiatividade incorporada em 5.10⁶ células precipitadas com 10% de ácido tricloroacético (30 minutos a 4°C) e filtradas em membrana de nitrocelulose.

Os parasitas marcados foram ressuspensos em 1% de Nonidet P-40 em Tris 10 mM, pH 7,5, 1 mM de TLCK e 1 mM de PMSF (0,5 ml dessa solução para 1.10⁸ células), incubados a 37°C por 10 minutos e centrifugados a 12000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado como fonte de antígenos, sendo então adicionado igual volume de tampão NET (150mM de NaCl, 5mM de EDTA, 0,02% de azida sódica em 50 mM de Tris-HCl, pH 8,6), duas vezes concentrado.

Para a imunoprecipitação dos antígenos, o extrato celular foi incubado com o anticorpo desejado (1-2 horas à temperatura ambiente ou 12 horas a 4°C) e o complexo ligado a *Staphylococcus aureus*, Cowan I (20 min, temperatura ambiente), segundo a técnica descrita por Kessler (1975). O material não ligado foi removido por lavagens sucessivas com tampão NET, contendo 0,1% de albumina, seguido do mesmo tampão contendo 0,1% de SDS. Quando os antígenos foram identificados por eletroforese unidimensional, o complexo do *Staphylococcus* contendo o antígeno foi fervido por 5 minutos, com 50 ul de tampão Tris-HCl 160 mM, pH 6,8, contendo 2% de SDS, 0,002 M de EDTA, 20% de glicerol, 0,05% de 2-mercaptoetanol e 0,02% de azul de bromofenol e centrifugado. O sobrenadante foi submetido a eletroforese. Para o padrão total das células marcadas,

utilizou-se o correspondente a $30 \cdot 10^6$ células, o mesmo utilizado para cada ponto de imunoprecipitação.

Para a identificação dos antígenos por eletroforese bidimensional, o complexo *Staphylococcus*-anticorpo-antígeno foi ressuspenso em 80 μ l de uma solução contendo 9,5 M de uréia, 2% de Nonidet P-40, 5% de 2-mercaptoetanol e 2% de anfolitos (0,97% de pH 3-10, 0,64% de pH 3-5, 0,39% de pH 6,5-9) e incubado um mínimo de 2 horas a -70° C. Após centrifugação (8000 g, 10 min), o sobrenadante foi utilizado para a focalização isoelétrica (O'Farrell, 1975).

A eletroforese foi feita em gradiente (5-14%) de gel de poliacrilamida, segundo Laemmli (1970). Após secagem, o gel de poliacrilamida foi submetido a autorradiografia, sendo previamente tratado com intensificadores (Bonner & Laskey, 1974; Laskey, 1980), quando a marcação foi feita com metionina- 35 S.

8. Cromatografia de afinidade (lectinas-Sepharose)

$2 \cdot 10^8$ parasitas foram tratados com 1 ml de tampão Tris 10 mM, pH 7,5, contendo 2% de Nonidet P-40, 1 mM de PMSF, 1 mM de TLCK e 150 mM de NaCl. Após 20 minutos a 37° C, o material foi centrifugado a 8000 g por 30 minutos e o sobrenadante incubado com 1 ml de resina (lectina-Sepharose) por 1 hora à temperatura ambiente. O material ligado foi lavado com tampão Tris 10 mM, pH 7,5, contendo 150 mM de NaCl e 2% de Nonidet P-40 (40 volumes de coluna). A seguir o material foi eluído com os açúcares

específicos, dissolvidos no mesmo tampão de lavagem. Para as colunas de con A-Sepharose, utilizamos 10 ml de uma mistura de 0,1 M de α -metil-D-glucopiranosídio e 0,1 M de α -metil-D-manopiranosose e para as de WGA-Sepharose, 10 ml de 0,1 M de N-acetil-D-glicosamina.

9. Outros métodos

Para a dosagem de proteína, utilizou-se o método de Lowry et al (1951) ou a relação $A_{280}/1,4$, que fornece a quantidade de imunoglobulina/ml. Esse cálculo é baseado no coeficiente de extinção da imunoglobulina pura (Dalchau & Fabre, 1982).

TABELA V - Composição dos meios empregados para o cultivo e diferenciação de *T. cruzi*.

Componentes	LIT	M-16	TAU ³
Triptose ¹	5,0 g	1,25 g	-
Infusão de Fígado ²	5%	-	-
Hemoglobina ²	2%	1%	-
NaCl	4,0 g	4,0 g	11,1 g
KCl	0,4 g	0,4 g	1,27 g
Na HPO _{2 4}	8,0 g	8,0 g	-
MgCl ₂	-	-	0,41 g
CaCl ₂	-	-	0,29 g
Glicose	2,0g	2,0 g	1,98 g
Tampão Fosfato Na 0,2 M	-	-	40 ml
Soro bovino	10%	2.5 %	-
H ₂ O bidestilada			
q.s.p.litro	1	1	1
pH	7,2	6,7	6,0

1. Comercial (Difco ou Oxoid): 5,0 g

2. Pode ser substituída por hemina - 1 mg de hemina dissolvidas em 0,1 N de NaOH (0,75 ml) ou Trietanolamina.

3. TAU-3AG: meio TAU suplementado com glutamato de sódio (7,36 g), ácido aspártico (0,27 g) e prolina (1,15 g). S. Goldenberg, comunicação pessoal.

BIBLIOGRAFIA

Alcântara, A. & Brener, Z. (1978). The *in vitro* interaction of *T.cruzi* blood stream forms and mouse peritoneal macrophages. Acta Trop. 33, 209-219.

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). Glicoproteins 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 localisation of carbohydrate containing macromolecules from epimastigote of *Trypanosoma cruzi* FEBS Lett. 99, 81-85.

Alves, M.J.M.; Aikawa, M. & Nussenzweig, R.S. (1983). Monoclonal antibodies to *Trypanosoma cruzi* inhibit motility and nucleic acid synthesis of culture forms. Infect. Immun. 39, 377-382.

Alves, M.J.M.; Abuin, G.; Gonçalves, M.F.; Kuwajima, V. & Colli, W. (1986). Heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* surface antigens detected by monoclonal antibodies. In: Molecular

Strategies of Parasitic Invasion, UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, New Series, Vol. 42 (N. Agabian; H. Goodman & N. Nogueira, eds). Alan R. Liss. Inc., New York, no prelo.

Alves, M.J.M.; Abuin, G.; Kuwajima, V.Y. & Colli, W. (1986). Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. No prelo.

Andrade, A.F.B.; Mendonça-Previato, L.; Pessolani, M.C.V. & Previato, J.O. (1984). Transglycosylase for sialic acid. A hypothesis for addition of sialic acid residues on cell surface of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. XI Reunião Anual Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu, Resumo BQ 50, 87.

Andrews, N.W. & Colli, W. (1981). Interiorization of *Trypanosoma cruzi* in cultured mammalian cells. Inhibition by N-acetil-D-glucosamine. In: VIII Reunião Anual Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu, 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. & Colli, W. (1984). Adhesion and interiorization of *T.cruzi*. Genes and Antigens of Parasites. (C.M. Morel ed.).

Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, pp. 37-42.

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-methoxypsoralen-inactivated trypomastigotes. Exp. Parasitol. 60, 255-262.

Araújo, 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.

Araújo, F.G.; Handman, E. & Remington, S.S. (1980). Binding of lectins to the cell surface of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool. 27, 397-400.

Araújo, F.G.; Sharma, S.D.; Tsai, V.; Cox, P. & Remington, J.S. (1982). Monoclonal antibodies to stages of *Trypanosoma cruzi*: characterization and use for antigen detection. Infect. Immun. 37, 344-349.

Beard, C.A.; Wrigtsman, R.A. & Manning, J.E. (1985). Identification of McAb against the trypomastigote stage of *T.cruzi* by use of surface polypeptides. Mol. Biochem. Parasitol. 16, 199-212.

Bertelli, M.S.M. & Brener, Z. (1980). Infection of tissue culture cells with blood stream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol. 66, 992-997.

Bongertz, V. & Dvorak, J.A. (1983). *Trypanosoma cruzi*: antigenic analysis of cloned stocks. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32, 716-722.

Bonner, W.M. & Laskey, R.A. (1974). A film detection method for tritium labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 46, 83-88.

Brener, Z. (1980). Immunity to *Trypanosoma cruzi*. Adv. Parasitol. 18, 247-292.

Brener, Z. & Chiari, E. (1963). Variações morfológicas abservadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 5, 220-224.

Budzko, D.B.; Pizzimenti, M.C. & Kierszenbaum, F. (1975). Effects of complement depletion in experimental Chagas disease: immune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 11, 86-90.

Camargo, E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 6, 93-100.

Castellani, O.; Ribeiro, L.V. & Ferreira, J.F. (1967). Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. J. Protozool. 14, 447-451.

Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1, 159-218.

Chapman, M.D.; Snary, D. & Miles, M.A. (1984). Quantitative differences in the expression of a 72,000 molecular weight cell surface glycoprotein (GP72) in *Trypanosoma cruzi* zymodemes. J. Immunol. 132, 3149-3153.

Chiari, E. & Camargo, E.P. (1984). Culturing and cloning of *Trypanosoma cruzi*. In: Genes and Antigens of Parasites. A laboratory manual. (C.M. Morel, ed). Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, pp. 23-26.

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.

Colli, W. (1979). Chagas' disease. In: The membrane pathobiology of tropical disease (D.F.H. Wallach, ed). Schwabe, Basel, pp 131-153.

Colli, W. (1984). Interiorization of *Trypanosoma cruzi* into mammalian host cells in the light of the parasite membrane chemical composition. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 79, 45-50.

Colli, W.; Andrews, N.W. & Zingales, B. (1981). Surface determinants in American trypanosomes. In: International Cell Biology 1980/1981 (H.G. Schweiger, ed). 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. In: New approaches to vaccine development. (R. Bell & G. Torrigiani, eds). Schwabe, Basel, pp 418-441.

Colli, W.; Alves, M.J.M. & Zingales, B. (1985). A superfície celular de *Trypanosoma cruzi*. In: Biologia de células em cultura (R. Meneghini, Coord). Publicação ACIESP 45, 141-173.

Confalonieri, A.N.; Martin, N.F.; Zingales, B.; Colli, W. & Lederkremer, R.M. (1983). Sialoglylipids in *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Int. 7, 215-222.

Contreras, V.T.; Morel, C.M. & Goldenberg, S. (1985). Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Mol.Biochem. Parasitol. 14, 83-96.

Coutinho, M.; Alves, M.J.M. & Colli, W. (1985). Interaction of human serum fibronectin with *Trypanosoma cruzi*. Arq. Biol. Tecnol. 28, 131.

Couto, A.S.; Katzin, A.M.; Colli, W. & Lederkremer, R.M. (1986). Structural studies on the carbohydrate moiety of Tc-85, a glycoprotein from the trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi*. Submetido.

Cox, F.E.G. (1985). Chromosomes of malaria parasites and trypanosomes. Nature 315, 200-281.

Crane, M. St.J. & Dvorak, J.A. (1982). Influence of monosacchrides on the infection of vertebrate cells by

Trypanosoma cruzi and *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 5, 333-341.

Dalchau, R. & Fabre, J.W. (1982). The purification antigens and other studies with monoclonal antibody affinity columns: the complementary new dimension of monoclonal antibodies. In: Monoclonal antibodies in clinical medicine (A.J. McMichael & J.W. Fabre, eds). Academic Press, London, pp. 519-556.

Deane, M.P. & Kloetzel, J. (1974). Lack of protection against *Trypanosoma cruzi* by multiple doses of *Trypanosoma lewisi* culture forms. A discussion on some strains of "lewisi". Exp. Parasitol. 35, 406-410.

De Souza, W. (1983). Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. Int. Rev. Cytol. 86, 197-283.

Dias, J.C.P. & Brener, Z. (1984). Chagas' disease and blood transfusion. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79, 139-147.

Doyle, P.S.; Dvorak, J.A. & Engel, J.C. (1984). *Trypanosoma cruzi*: quantification and analysis of the infectivity of cloned stocks. J. Protozool. 31, 280-283.

Dragon, E.A.; Brothers, V.M.; Wrightsman, R.A. & Manning, J. (1985). A Mr. 90.000 surface polypeptide of *Trypanosoma*

cruzi as a candidate for Chagas disease diagnostic antigen. Mol. Biochem. Parasitol. 16, 213-219.

Dvorak, J. (1984). The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. J. Cell. Biochem. 24, 357-371.

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. & Crane, M.S.J. (1981). Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites. Science 214, 1034-1031.

Engman, D.M.; Kirchhoff, L.V.; Reddy, L.V. & Donelson, J.E. (1986). Different isolates of *Trypanosoma cruzi* exhibit marked chromosome size heterogeneity. UCLA Symposia on Molecular & Cellular Biology. 15th Annual Meetings, Park City, Utah.

Feizi, T. (1984). Monoclonal antibodies reveal saccharide structures of glycoproteins and glycolipids as differentiation and tumour-associated antigens. Biochem. Soc. Trans. 12, 545-549.

Feizi, T. & Childs, R.A. (1985). Carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids as differentiation antigens, tumour-associated antigens and components of receptor systems. TIBS. January. 24-29.

Ferguson, M.A.J.; Allen, A.K. & Snary, D. (1983). Studies on the structure of a phosphoglycoprotein from the parasitic protozoan *Trypanosoma cruzi*. Biochem. J. 213, 313-319.

Ferguson, M.R.J.; Snary, D. & Allen, A.K. (1985). Comparative compositions of cell surface glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Biochim. Biophys. Acta 842, 39-44.

Finne, J. (1985). Polysialic acid- a glycoprotein carbohydrate involved in neural adhesion and bacterial meningitis. TIBS. March. 129-132.

Fraker, F.J. & Speck, J.C. (1978). Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide 1,3,4,6-tetrachloro- 3 ,6 - diphenylglycoluril. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849-857.

Galfre, G. & Milstein, C. (1981). Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. Methods Enzymol. 73 (B), 3-46.

Gonzalez- Cappa, S.M.; Chiale, P.; Del Prado, G.E.; Katzin, A.M.; De Martini, G.W.; De Isola, E.D.; Orrego, L.A. & Segura, E.L. (1980). Aislamiento de una cepa de *Trypanosoma cruzi* de un paciente con miocardiopatía chagásica crónica y su caracterización biológica. Medicina 40, 63-68.

Gottlieb, M. (1977). A carbohydrate containing antigen from *Trypanosoma cruzi* and its detection in circulation of infected mice. J. Immunol. 119, 465-470.

Gottlieb, M. (1978). *Trypanosoma cruzi*: identification of a cell surface polysaccharide. Exp. Parasitol. 45, 200-207.

Harth, G.; Haidaris, C.G. & So, M. (1986). Isolation and characterization of a neuraminidase, a developmentally regulated antigen of *Trypanosoma cruzi*. J. Cell. Biochem. suppl. 10A, 162.

Henriquez, D.; Piras, R. & Piras, M.M. (1981a). The effect of surface membrane modification of fibroblastic cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. Mol. Biochem. Parasitol 2, 359-366.

Henriquez, D.; Piras, R. & Piras, M.M. (1981b). Surface membrane interaction of *Trypanosoma cruzi* and Vero cells: dissociation of the adhesion and penetration steps. J. Cell Biol. 91, 108a.

Hongo, S.; Sugawara, K.; Homma, M. & Nakamura, K. (1985). Effects of glycosylation on the conformation and antigenicity of influenza C viral glycoproteins. Vaccine 3, 223-226.

Hoare, C.A. (1972). The Trypanosomes of Mammals. Blackwell Scientif. Publ. Oxford, pp. 749.

Joiner, K., Hieny, S.; Kirchhoff, L.V. & Sher, A. (1985). gp 72, the 72 kilodalton glycoprotein, is the membrane acceptor site for C3 on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. J. Exp. Med. 161, 1196-1212.

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.

Kemp, D.J.; Corcoran, L.M.; Coppel, R.L.; Stahl, H.D.; Bianco, A.E.; Brown, G.V. & Anders, R.F. (1985). Size variation in chromosomes from independent cultured isolates of *Plasmodium falciparum*. Nature 315, 347-350.

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.; Ivanyi, J. & Budzco, D.B. (1976). Mechanism of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. Immunology 30, 1-6.

Kirchhoff, 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.

Kirchhoff, L.V.; Hieny, S.; Shiver, 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.

Kleinman, H.K.; Klebe, R. & Martin, G.R. (1981). Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. J. Cell Biol. 88, 473-485.

Kohler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497.

Krettli, A.U. & Brener, Z. (1982). Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. J. Immunol. 128, 2009-2012.

Krettli, A.U.; Cançado, J.R. & Brener, Z. (1982). Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas disease. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 76, 334-340.

Kuwajima, V.Y. & Colli, W. (1983). Fatores que determinam a interiorização de *Trypanosoma cruzi* em células de mamífero.

X Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu. BQ 59.

Laemli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227, 680-685.

Laskey, R.A. (1980). The use of intensifying screens or organic scintillators for visualizing radioactive molecules resolved by gel electrophoresis. Meth. Enzymol. 65, 363-371.

Lederkremer, R.M.; Alves, M.J.M.; Fonseca, G.C. & Colli, W. (1976). A Lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* (epimastigote). Isolation, purification and carbohydrate composition. Biochim. 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.; Tanaka, C.T. & Colli, W. (1978). Ceramide and inositol content of the lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 85, 1268-1274.

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.; Confalioni, 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.

Lenzi, H.L.; Jansen, A.M. & Deane, M.P.; (1984). The recent discovery of what might be a primordial escape mechanism for *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79, 13-18.

Leon, W.; Wrigtsman, R. & Manning, J.E. (1985). Identification of stage and strain specific surface antigens of *Trypanosoma cruzi* by use of monoclonal antibodies. XII Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu, BQ 23.

Littlefield, J.W. (1964). Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. Science 145, 709-710.

Lopes, J.D. & Alves, M.J.M. (1984). Production of monoclonal antibodies by somatic cell hybridization. Genes and Antigens of Parasites (C.M. Morel ed). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, pp. 419-431.

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.

Luzzati, A.L.; Hengartner, H. & Schreier, M.H. (1977). Induction of plaque-forming cells in cultured human lymphocytes by combined action of antigen and EB virus. Nature 269, 419-420.

von der Mark, K. & Kühl, V. (1985). Laminin and its receptor. Biochim. Biophys. Acta 823, 147-160.

Martins, M.S.; Hudson, L.; Krettli, V, Cançado, J.R. & Brener, Z. (1985). Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. Clin. Exp. Immunol. 61, 343-350.

McDaniel, J.P; Howard, R.J. & Dvorak, J.A. (1986). Identification and analysis of epimastigote surface and metabolic proteins in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 19, 183-194.

Meirelles, M.N.L.; Chiari, E. & De Souza, W. (1982). 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.; Barbosa, H.S.; De Souza, W. & Araújo Jorge, T.C. (1984). Recent contributions for a better understanding of the *Trypanosoma cruzi* muscle cell interaction. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79, 7-11.

Mello, D.A. & Borges, M.M. (1981). Primeiro encontro do *Triatoma costalimai* naturalmente infectado pelo *Trypanosoma cruzi*: Estudos de aspectos biológicos da amostra isolada. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 76, 61-69.

Mello, D.A.; Valin, E. & Teixeira, M.L. (1979). Alguns aspectos do comportamento de cepas silvestres de *Trypanosoma cruzi* em camundongos e *Colomys callosus* (Rodentia). Rev. Saúde Publ. São Paulo 13, 314-325.

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.

Muniz, J. & Borriello, A. (1945). Estudo sobre a ação lítica de diferentes soros sobre as formas de cultura e sangüícola de *Schizotrypanum cruzi*. Rev. Bras. Biol. 5, 563-572.

Newark, P. (1985). The many merits of monoclonals. Nature 316, 387.

Nisonoff, A. (1964). Enzymatic digestion of rabbit gamma globulin antibody and chromatography of digestion products. Meth. Med. Res. 10, 134-141.

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. Tydings, J.D. & Cohn, Z. (1981). *Trypanosoma cruzi*: surface antigens of blood and culture forms. J. Exp. Med. 153, 629-639.

Nussenzweig, V.; Deane, L.M. & Kloetzel, J. (1963). Differences in antigenic constitution of strains of *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 14, 221-232.

O'Farrel, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol.Chem. 250, 4007-4021.

Orozco, O.; Afchain, D.; Dissous, C.; Rodriguez, C.; Ovlaque, G.; Lemerre, J.L.; Lyens, M. & Capron, A.(1984). Different monoclonal antibodies against the component 5 specific for *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33, 560-568.

Ouaisi, M.A.; Afchain, D.; Capron, A. & Grimaud, J.A. (1984). Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. Nature 308, 380-382.

Ouaissi, M.A.; Cornette, J. & Capron, A. (1985a). *Trypanosoma cruzi*: modulation of parasite-cell interaction by plasma fibronectin. Eur. J. Immunol. 15, 1096-1101.

Ouaissi, M.A.; Dutoit, E.; Vernes, A.; Guerret-Stocker, S. & Capron, A. (1985b). *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* merozoite invasion by human plasma fibronectin. Parasitology 90, 227-236.

Ouaissi, M.A.; Cornette, J. & Capron, A. (1986). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. Mol. Biochem. Parasitol. 19, 201-211.

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, M.C.V.; Andrade, A.F.B.; Mendonça-Previato, L. & Previato, J.O. (1984). Chemical analysis of sialogalactomann-protein from *Trypanosoma cruzi*: evidence that the sialic acid residues are taken up from the culture medium. Arq. Biol. Tecnol. 27, 159.

Piras, R.; Henriquez, D. & Piras, M.M. (1980). Studies on host-parasite interactions: role of fibroblastic cell surface functions *Trypanosoma cruzi* forms in the infective process.

In: Host-invader interplay (H. van der Bosche, ed.)
Elsevier/North-Holland Biomedical, Amsterdam, pp. 131-134.

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, M.M.; Henriquez, D. & Piras, R. (1985). The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction *Trypanosoma cruzi*-fibroblasts. Mol. Biochem. Parasitol. 14, 151-163.

Piras, R.; Piras, M.M. & Henriquez, D. (1984). Studies on *in vivo* interaction *Trypanosoma cruzi*-fibroblastic cells In: Abstracts IV Pan American Congr. Biochem. Soc., Buenos Aires, Abst. 93.

Pizzi, T. (1956). Inmunologia de la Enfermedad de Chagas. Universidad de Chile, Santiago, pp. 37.

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.

Potocnjak, P.; Yoshida, N.; Nussenzweig, R.S. & Nussenzweig, V. (1980). Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. J. Exp. Med. 15, 1504-1513.

Repka, D.; Camargo, I.J.B.; Santana, E.M.; Cunha, W.M.; de Souza, D.C.; Sakurada, J.K. & Rangel, H.A. (1980). Surface antigenic determinant of epimastigote forms common to trypomastigote and amastigote forms of different strains of *Trypanosoma cruzi*.

Tropenmed. Parasit. 31, 239-246.

Rezende, J.M. (1979). Clínica: manifestações digestivas. In: *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. (A. Brener & Z. Andrade, eds). Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, pp. 312-361.

Romanha, A.J.; Pereira, A.A.S.; Chiari, E. & Kilgour, V. (1979). Isoenzyme pattern of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. Comb. Biochem. Physiol. 62b, 139-142.

Rothhammer, F. (1985). Chagas disease in chilean mummies. Parasitol. Today 1, 3.

Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M.D. (1986). Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. Cell 44, 517-518.

Scharfstein, J.; Rodrigues, M.M.; Alves, C.A.; De Souza, W.; Previato, J.O. & Mendonça-Previato, L. (1983). *Trypanosoma cruzi*: description of highly purified surface antigen defined by human antibodies. J. Immunol. 131, 972-976.

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.

Schechter, M.; Flint, J.E.; Voller, A.; Guhl, F.; Markinkelle, C.J. & Miles, M.A. (1983). Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American trypanosomiasis (Chagas disease). Lancet 2, 939-941.

Schmunis, G.A.; Szarfman, A.; Lambembach, 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.

Schottelius, J. (1982). The identification by lectins of two strain groups of *Trypanosoma cruzi*. Z. Parasiten. 68, 147-154.

Schottelius, J. (1984). Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the basis of their sialic acid content. Tropenmed. Parasit. 35, 160-162.

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.

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. (1985). Biochemistry of surface antigens of *Trypanosoma cruzi*. Brit. Med. Bull. 41, 144-148.

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.

Scott, M.T. & Snary, D. (1979). Protective immunisation of mice using cell surface glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. Nature 282, 73-74.

Scott, M.T. & Neal, R.A. (1984). The vaccine potential of cell surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 307, 63-72.

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.

Sher, A.; Hieny, S. & Joiner, K. (1986). Evasion of complement lysis by *Trypanosoma cruzi*. Submetido.

Steinitz, M.; Klein, G.; Koskimies, S. & Makel, O. (1977). EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. Nature 269, 420-422.

Steinitz, M.; Isak, G.; Cohen, S.; Ehrenfeld, M. & Flechner, I. (1980). Continuous production of monoclonal rheumatoid factor by EBV-transformed lymphocytes. Nature 287, 443-445.

Subias, E.; Esteva, M.; Ruiz, A.M.; Morena, M.; Campanini, A.R.; Cazzulo, J.J. & Segura, E.L. (1984). Anticuerpos monoclonales anti-*Trypanosoma cruzi*: II Caracterizacion de su actividad biologica. Congreso Argentino de Protozoologia y Reunion sobre Enfermedad de Chagas. Huerta Grande. Cordoba, Argentina.

Teissie, J.; Knuton, V.P.; Tsong, T.Y. & Lane, M.D. (1982). Electric pulse-induced fusion 3T3 cells in monolayer culture. Science 216, 537-538.

Teixeira, M.M.G. & Yoshida, N. (1986). Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. Mol. Biochem. Parasitol. 18, 271-282.

Tibayrenc, M.; Ward, P.; Moya, A. & Ayala, F.J. (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 115-119.

Villalta, F. & Kierszenbaum, F. (1983). Role of cell surface mannose residues in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. Biochim. Biophys. Acta 736, 39-44.

Villalta, F. & Kierszenbaum, F. (1984). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: role of cell surface galactose residues. Biochem. Biophys. Res. Commun. 119, 228-235.

- Villalta, F. & Kierszenbaum, F. (1985). Role of surface N-acetylglucosamine residues on host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. Biochim. Biophys. Acta 845, 216-222.
- Wirth, J.J. & Kierszenbaum, F. (1984). Fibronectin enhances macrophage association with invasive forms of *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. 133, 460-464.
- Wyler, D.J.; Sypek, J.P. & McDonald, J.A. (1985). *in vitro* parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment. Infect. Immun. 49, 305-311.
- Yelton, D.E. & Scharff, M.D. (1981). Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. Ann. Rev. Biochem. 50, 657-680.
- Yoshida, N. (1983). Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 40, 836-839.
- Zingales, B. & Colli, W. (1985). *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. In: Current topics in microbiology and immunology 117 (L. Hudson, ed). Springer. Verlag Berlin-Heidelberg. pp. 129-152.

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 stock and clones of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans. Acta Trop. 41, 5-16.

Zingales, B.; Katzin, A.M.; Arruda, M.W. & Colli, W. (1985). Correlation of tunicamycin sensitive surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* with parasite interiorization into mammalian cells. Mol. Biochem. Parasitol. 16, 21-34.

ANEXO 1. CEPAS E CLONES DE T. cruzi empregadas.

Cepa/ clone	origem geográfica	Hospedeiro de origem	observações	Referência
Y	SP	Homem		Silva & Nussenzweig (1953)
M1	SP		clone de Y	M.F. Gonçalves (com. pess.)
M1	SP		clone de Y	M.F. Gonçalves (com. pess.)
CL	RS	<u>T. infestans</u>		Brener & Chiari (1963)
CL-14	RS		clone de CL	Chiari (1981)
W	PE	prea		Garcia, E.S. (com. pess.)
229-7A	MG	Homem	clone, zimodema A	Romanha et al (1979)
167-13B	MG	Homem	clone, zimodema B	Romanha et al (1979)
181-1C	MG	Homem	clone, zimodema C	Romanha et al (1979)
143-D	MG	Homem	Zimodema D	Romanha et al (1979)
Costalimai	GO	<u>T. costalimai</u>		Mello & Borges (1981)
Guafitas	Venezuela	<u>R. prolixus</u>		Contreras, V. (com.pess.)
MD	RJ	Gambá		Deane, M. (com. pess.)

ANEXO 3. CLASSIFICAÇÃO DE *T. cruzi*

(The committee on systematics and evolution of the Society of the Protozoa- J. Protozool. 27, 1980, pp 37-58)

Sub-reino - Protozoa

Phyla: Sarcomastigophora, Labyrinthomorfa,
Apicomplexa, Microspora, Ascetospora, Myxozoa,
Ciliophora.

Phylum I - Sarcomastigophora

Subphyla: Mastigophora, Opalinata, Sarcodina.

Subphylum I - Mastigophora

1 ou mais flagelos, reprodução assexuada por
divisão binária, sexuada em alguns casos.

Classe 1 - Phytomastigophorea

Classe 2 - Zoomastigophorea

Sem cloroplasto, 1 ou mais flagelos, formas amebóides
com ou sem flagelo em alguns grupos, reprodução
sexuada em alguns. Ordens: Choanoflagellida,
Kinetoplastida, Proteromonadida, Retortamonadida,
Diplomonadida, Oxymonadida, Trichomonadida,
Hypermastigida.

Ordem 2 - Kinetoplastida

1 ou 2 flagelos provenientes de uma depressão; mitocôndria única contendo DNA; aparelho de Golgi na região do bolso flagelar; maioria parasitas.

Sub-ordem 1 - Bodonina

Sub-ordem 2 - Trypanosomatina

1 flagelo livre ou ligado ao corpo por membrana ondulante. Cinetoplasto relativamente pequeno e compacto. Parasitas.