

SÍLVIA BRANDÃO BERTAZZOLI BELLUCCI

INVESTIGAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UMA FRAÇÃO SOLÚVEL DE LISADOS DE Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909)

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel.

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Campinas

São Paulo - Brasil

1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais

Ao Sérgio

Ao Maurício, à Cecília e à Mariana.

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Drs. Antonio F. Pestana de Castro, Antonio Carlos Corsini, Daria Repka, Julia P. Franceschi e Gun B. Bergstein Mendes, pelo auxílio e pela análise crítica do trabalho.

À D. Alzira C. Castro e ao Sr. Gildo Bernardo Leite, pelo auxílio inestimável na execução deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós Graduação, especialmente Ajax M. Atta e Wirla M. S. Cunha Tamashiro, pelo companheirismo sem reservas.

De modo especial ao Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel e ao Prof. Dr. Rubem A. Alves, que pacientemente, tem me ensinado a descobrir o mundo.

Este trabalho foi realizado com recursos fornecidos ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia da UNICAMP pelas seguintes instituições:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO
E TECNOLÓGICO - CNPq

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO
PAULO - FAPESP

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DE EN
SINO SUPERIOR - CAPES

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (Divisão de Imunologia)

BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA - BIREME

Durante parte deste trabalho a autora foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior - CAPES.

Í N D I C E

Introdução	1
Material e Métodos	7
Reação de aglutinação	15
Reação de inibição da aglutinação	15
Reação de imunofluorescência	16
Reação de inibição da imunofluorescência	16
Atividade enzimática da fração FS	17
Inibição da atividade enzimática de FS por dife rentes soros	18
Atividade de FS sobre o complemento humano	19
Atividade de FS sobre preparações isoladas de <u>í</u> leo de cobaia	19
Atividade de FS sobre a permeabilidade capilar .	19
Resultados	21
Atividade enzimática de FS	21
Reações de FS com diferentes soros	22
Atividade da fração FS sobre complemento humano.	30
Atividade da fração FS sobre a permeabilidade ca pilar	32
Ação de FS sobre preparações isoladas de íleo de cobaia	35
Inibição da atividade enzimática de FS por cons tituintes plasmáticos	37

Discussão	43
Resumo e Conclusões	52
Bibliografia	54

INTRODUÇÃO

A participação de substâncias excretadas por mi
croorganismos na instalação ou manutenção de processos infec
ciosos é bem conhecida, particularmente entre as bactérias . Assim, os efeitos da infecção pelo Vibrio cholerae, tanto no homem como em animais de laboratório, são dependentes de uma toxina secretada por esta bactéria, cuja ação, atualmente bem esclarecida, se faz através da alteração do nível de AMP cí
clico no interior das células intestinais (4, 20, 43). Este parece ser também o mecanismo através do qual certas toxinas secretadas por cepas enterotoxigênicas de Escherichia coli atuam sobre o hospedeiro (18, 45). Também as lesões de cará
ter agudo nas infecções estafilocócicas e estreptocócicas são decorrentes da excreção de produtos, especialmente de natureza
enzimática, por aqueles microrganismos (24, 50).

Entre protozoários, são descritos alguns produ
tos de excreção que auxiliam a penetração de parasitas in
tracelulares em suas células hospedeiras. Norby et al. (34), em 1967, apresentaram evidências de que o Toxoplasma gondii penetra nas células hospedeiras através da eliminação de en
zimas proteolíticos contidos na região conóide. Estes enzi
mas seriam, pois, responsáveis pela ruptura da membrana das hemácias, observada à microscopia eletrônica durante a fase de penetração dos parasitas. Jadin (26), em 1968, baseado tam

bém em estudos ultraestruturais, admite a possibilidade de que os vacúolos presentes nos merozoítas após sua penetração pudessem conter substâncias utilizadas no processo de infecção celular.

Em 1969, Ladda et al. (31), realizando estudos sobre a penetração de Plasmodium berghei yoeli e Plasmodium gallinaceum em hemácias, não encontraram ruptura de membrana à semelhança do que ocorre na infecção pelo Toxoplasma, porém consideraram possível que a região conóide daqueles parasitas contenha agentes ativos que alterem a estabilidade da membrana das hemácias, sem contudo rompê-la. Sob este aspecto, Herman (25) estudou os efeitos de extratos de Plasmodium lophurae, obtidos em diferentes fases da infecção em gansos, sobre a fragilidade osmótica de hemácias normais. As hemácias se tornaram mais susceptíveis à lise, particularmente, quando tratadas com extratos obtidos em uma fase imediatamente anterior à ruptura das hemácias parasitadas e à infecção de novas células. Entre outras possibilidades, o autor discute a participação de produtos solúveis do parasita neste mecanismo.

Em relação às helmintíases de longa evolução, foi descrita, mais recentemente, a participação de sistemas enzimáticos na instalação de parasitas em hospedeiros. Dresden e Asch (15) demonstraram que a penetração de Schistosoma mansoni na pele dos hospedeiros vertebrados está relacionada à

excreção por parte das cercárias, de produtos ricos em enzimas.

Quanto à tripanosomíase americana, praticamente, não há informações a esse respeito.

A possibilidade de que produtos do Trypanosoma cruzi tivessem alguma participação no mecanismo patogênico da moléstia de Chagas foi primeiramente considerada por Carlos Chagas (8, 9), que atribuía a um certo poder tóxico as manifestações clínicas da doença. Também Klyuev e Roskin(29) atribuíram a uma toxina secretada pelos parasitas a ação destruidora que suspensões de T. cruzi demonstravam sobre as células de certos tumores. Mais tarde, este poder tóxico foi atribuído à ação enzimática do parasita (33), sem contudo ter sido demonstrado o sistema responsável por esta ação.

Em 1956, Köberle (30) propôs novamente a possibilidade de uma ação tóxica do parasita, ao discutir a existência de uma toxina com acentuada especificidade para a célula nervosa; seria uma neurotoxina a responsável pela destruição dos neurônios intramurais das vísceras ocas, especialmente do tubo digestivo. No entanto, algumas experiências realizadas com a finalidade de demonstrar a existência desse fator não obtiveram êxito (16, 27, 36).

Apesar do grande número de informações obtidas nos últimos anos, particularmente as referentes aos aspectos imunológicos da infecção pelo T. cruzi, os aspectos fundamentais da relação parasita hospedeiro ainda não estão esclare

cidos. Isto se deve, principalmente, ao fato de que os cons
tituintes do parasita não estão, até o momento, bem caracte
rizados. A despeito das frequentes recomendações da OMS a es
se respeito (37, 54), ainda não foi possível abordar o pro
blema, devido provavelmente à complexidade do parasita e do
seu ciclo evolutivo.

No hospedeiro vertebrado esta complexidade se tor
na mais relevante, porque nele estão presentes pelo menos
duas formas do parasita, amastigotas (intracelulares) e tripo
mastigotas (circulantes). Embora seja muito provável a exis
tência de diferenças fundamentais entre estas duas formas ,
particularmente metabólicas, diferentes autores têm assinala
do, entre elas, uma intensa reação cruzada de natureza imuno
lógica (19, 21, 28, 39, 52). Este fato indica a existência de
constituíntes comuns às duas formas.

Por outro lado, reações cruzadas também têm sido
detectadas entre formas de cultivo e formas encontradas no
hospedeiro vertebrado. Desde Guerreiro e Machado (22) as rea
ções diagnósticas para a Doença de Chagas utilizam extratos
ou formas íntegras do parasita, obtidos a partir de culturas,
para a detecção de anticorpos em soros humanos. Outros auto
res (1, 28), através de técnicas de absorção de soros imunes
com as diferentes formas do parasita, tem demonstrado suces
sivamente a presença de constituíntes antigênicos comuns. Ma
is recentemente, Fruit et al. (19) localizaram um antígeno

de superfície comum às formas epi e tripomastigotas, enquanto que Gotlieb (21) encontrou no sangue circulante de camundongos infectados um carboidrato com atividade antigênica, anteriormente isolado das formas de cultivo. No entanto, a constituição química ou a ação biológica desses constituintes comuns não estão bem definidos.

Em relação à ação biológica de produtos secretados pelo T. cruzi, os dados positivos praticamente se restringem aos trabalhos de O'Daly (35). Este autor sugere que as formas epimastigotas degradam os constituintes do soro de vitelo utilizado nos meios de cultura. Frações obtidas durante este processo de degradação, quando adicionados a meios sintéticos, parecem incrementar a multiplicação dos parasitas e a diferenciação das formas epi e tripomastigotas.

Para definir alguns constituintes das formas de cultivo do T. cruzi, nosso laboratório tem realizado desde 1972, uma investigação sistemática sobre antígenos do parasita, particularmente o estudo imunoquímico de lisados obtidos daquelas formas do T. cruzi (11, 40, 41, 42, 46). No decorrer dessa investigação, Repka et al. (43) demonstraram que o sobrenadante desses lisados era rico em atividade proteolítica. Costa (12), posteriormente, demonstrou que este sobrenadante - fração solúvel (FS) - apresentava uma atividade proteolítica numa ampla faixa de pH, ocorrendo picos de atividade na zona ácida (pH 2.6 - 3,6), na zona alcalina (pH 8.5) e

neutra. A atividade proteolítica na região neutra apresentou um ótimo de atividade em pH 7.0, quando hemoglobinas bovina e humana eram empregadas como substrato.

Em função desta atividade sobre substratos biológicos e das informações existentes na bibliografia sobre atividade biológica de produtos de microrganismos, o estudo da Fração FS prosseguiu abordando dois aspectos distintos, porém, complementares. O primeiro deles se refere ao isolamento e caracterização de constituintes de FS, trabalho desenvolvido por Araújo (3). O segundo se relaciona ao estudo do significado biológico da atividade enzimática de FS e de seus constituintes.

Este trabalho foi desenvolvido dentro da segunda perspectiva, e teve como objetivos principais:-

a) verificar se constituintes da fração FS estão presentes também nas formas circulantes do parasita, utilizando basicamente, reações imunológicas.

b) Obter informações a respeito do efeito da atividade enzimática da fração FS sobre sistemas utilizados habitualmente na investigação de atividade biológica de diferentes substâncias. Foram empregados os seguintes modelos: ação de FS sobre o sistema complemento humano, sobre a permeabilidade capilar em pele de cobaia e sobre preparações de íleo de cobaia.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra de *T. cruzi*

A amostra Y de *T. cruzi* (Pereira da Silva e Nussensweig) utilizada no presente trabalho foi-nos cedida pelo Prof. Zigmar Brener. O meio de Yeager (LIT) preparado de acordo com as indicações de Fernandes e Castellani (18) foi utilizado para cultivo do parasita. Porções de 20 ml de inóculo eram semeados em 100 ml de meio de cultura e mantidos em estufa a 28° durante uma semana.

Obtenção do extrato bruto (EBC)

Os parasitas contidos em 100ml de cultura eram lavados com solução gelada de NaCl 0,15M tres vezes a 1400 g, durante 15 minutos a 4° e o sedimentos ressuspensos em 10 ml de água destilada gelada. Essa suspensão era imediatamente, congelada e liofilizada. O EBC liofilizado era mantido a -20° até o momento do uso.

Obtenção da fração solúvel - FS

A fração solúvel foi obtida segundo indicações de

Costa (13). Porções de 250 mg do EBC liofilizado eram sucessivamente lavadas a 3020g durante 15 minutos a 4°, com 25 ml de: acetona (duas vezes), mistura em partes iguais, eter acetona (duas vezes) e eter (duas vezes). O sedimento era secado com jato de ar e mantido a 4° em vácuo até o momento de uso. O material delipidado era tratado com 25 ml de solução NaCl 0,15M gelada. A mistura, mantida em banho de gelo durante 10 minutos com agitação ocasional, era a seguir centrifugada a 12.000 g durante 30 minutos. O sobrenadante obtido era concentrado em membrana ultra filtrante PM 10 sob atmosfera de Nitrogênio de 10 libras/polegada². O material concentrado (FS) era liofilizado e mantido a -20° até o momento do uso.

Obtenção da fração contendo antígenos de superfície (FA)

A fração FA utilizada para a obtenção de soros imunes nos foi cedida por Santana (46), e preparada como se segue. Porções de 25 mg de EBC após delipidação foram tratados com 25 ml de NaCl 0,15M durante 10 minutos em banho de gelo com agitação ocasional. O sedimento obtido após centrifugação a 12100 g durante 30 minutos a 4° foi tratado com 25 ml de solução de NaOH 0,1 M e mantido em banho de gelo durante 10 minutos. A seguir, a suspensão foi centrifugada nas condições descritas e o sobrenadante obtido, precipitado a

pH 5,5 com HCl 0,1M, mantendo-se em banho de gelo 15 a 20 minutos. O precipitado formado foi separado por centrifugação nas condições usuais e o sedimento foi dissolvido em tampão TRIS-HCl 0,05M pH 8,1. Esta fração dissolvida foi centrifugada a 4°, a 12.100g durante 30 minutos, e o sobrenadante limpo, rotulado FA, foi concentrado em membrana ultrafiltrante Diaflo pM 10 (Amicon), sob pressão de Nitrogênio e imediatamente liofilizada.

Suspensão de epimastigotas

As formas de cultura de *T. cruzi* com 7 dias de cultivo em meio LIT foram lavadas tres vezes a 1085g durante 15 minutos a 4° com tampão TRIS-HCl pH 7.4 0.05M contendo 0,5% de glicose. A suspensão de parasitas era filtrada em papel e o número de parasitas ajustado para 3×10^6 , por contagem em câmara de Neubauer. Estas formas eram utilizadas nas reações de aglutinação e de imunofluorescência.

Suspensão de tripomastigotas

As formas tripomastigotas foram obtidas de sangue de camundongos no 7° dia de infecção pelo *T. cruzi*, segundo método desenvolvido por Costa (Corsini e Costa, em preparação). O sangue dos animais era colhido em presença de citrato de sódio 3,8%, através de punção cardíaca. O sangue de

todos os animais era reunido e o volume total centrifugado durante 15 minutos a 1200 rpm a 4°. O material era então deixado em repouso por 1 hora à temperatura ambiente, e após esse tempo o sobrenadante, rico em tripomastigotas, era recolhido e mantido em banho de gelo. O sedimento era ressuspensão em Meio Mínimo Essencial (MEM), pH neutro, e centrifugado nas condições anteriores. Este material era agora deixado em repouso por 40 minutos. O sobrenadante era então recolhido e reunido ao primeiro. Esta mistura era centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos a 4°. O sobrenadante era desprezado e o sedimento lavado duas vezes em solução salina fisiológica gelada. O sedimento final, contendo tripomastigotas, era ressuspensão em pequeno volume daquela solução. Usualmente o rendimento final era de 60 a 70%. Os tripomastigotas eram fixados com formol neutro na concentração final de 0,1% e utilizados nas reações de imunofluorescência.

Imune soros

1. Soros anti - EBC

Suspensões lavadas de formas de cultivo do T. cruzi contendo 30×10^6 parasitas por ml, lisados por congelamento e descongelamento sucessivos (tres vezes) foram utilizados na imunização de 4 coelhos. Estes animais receberam inicialmente 1 ml do lisado por via intraperitoneal. Após 7

dias, receberam inoculações intradérmicas de 0,5 ml da mesma suspensão a intervalos de 3 dias, durante 3 meses. Uma semana após a última inoculação, os animais foram sangrados e os soros obtidos, após inativação a 56° por 30 minutos, foram mantidos a -20° até o momento do uso.

2. Soros anti - FS

Coelhos foram imunizados por via subcutânea na região lombar, através de quatro injeções de 2 ml da mistura em partes iguais do antígeno (1,0 mg prot/ml) em adjuvante completo de Freund, com intervalos de 30 dias entre cada inoculação. Após 15 dias da última inoculação os coelhos foram sangrados e o soro obtido mantido a -20° até o momento de uso.

3. Soros anti-fração FA

Coelhos foram inoculados no coxim plantar com 0,5 ml de uma mistura, em partes iguais de uma fração contendo antígeno de superfície - FA (46), com 2,0 mg prot/ml e adjuvante completo de Freund. Vinte dias após, foram inoculados por via intraperitoneal com 1 ml de FA suspensa em 1 ml de NaCl, 0,15M. Após 7 dias foram feitas, semanalmente, durante 20 semanas consecutivas, injeções intradérmicas de 0,5 ml de FA (1 mg prot/ml) com intervalos de 3 dias durante 2

meses. Decorridos 10 dias da última inoculação os animais foram sangrados. Os soros obtidos foram inativados e mantidos a -20° até o momento do uso.

4. Soros anti-T. cruzi obtidos de camundongos com infecção experimental

15 camundongos Swiss, com peso médio de 20 gramas, foram inoculados intraperitonealmente com 0,1 ml de sangue contendo 120.000 formas tripomastigotas, provenientes de animais em pico de parasitemia (7º dia após a inoculação). A determinação do número de parasitas foi realizada através do método de Pizzi, modificado por Brener (5), e a diluição final, foi feita em salina fisiológica estéril. Após 7 dias estes animais foram sangrados e o sangue obtido centrifugado separadamente a 1200 rpm por 10 minutos a 4° . Os soros obtidos, livres de parasitas, foram reunidos em grupos de 3, inativados e utilizados na investigação de inibidores plasmáticos da atividade enzimática da fração FS. Os soros anti amostra Y utilizados nas reações de imunofluorescência nos foram cedidos pelo Prof. E. Salata, da UNESP, e foram obtidos pela inoculação de 0,2 ml de sangue contendo 200 tripomastigotas, em camundongos normais. A cada 7 dias, durante 8 semanas, um lote de 15 animais era sangrado a branco. Os soros livres de parasitas foram misturados, inativados a 56° por 30 minutos e mantidos a -20° até o momento de uso.

5. Soros humanos de pacientes chagásicos

Estes soros foram obtidos no laboratório de Imu-
nologia Clínica e Alergia da Faculdade de Ciências Médicas
da Unicamp e cedidos gentilmente pelo Dr. Celso Paulino da
Costa. Todos os soros apresentaram reações de Guerreiro e Ma-
chado fortemente positivas.

Soros normais

1. Soros humanos normais

Obtidos de indivíduos aparentemente sadios, e com
reações negativas de imunofluorescência e Guerreiro Machado.
Quando utilizados como fonte de complemento representaram a
mistura de pelo menos 5 amostras, mantida a -20° até o momen-
to de uso. Os soros utilizados nas experiências de inibição
de atividade enzimática foram previamente inativados e manti-
dos também, a -20° .

2. Soros de camundongos normais

15 camundongos Swiss, mantidos em nosso biotério
foram sangrados e os soros obtidos, reunidos em grupos de 3,
foram inativados e mantidos a -20° até o uso.

Hemoglobina bovina

Obtida segundo indicações de Costa (13). Hemácias provenientes de 1000 ml de sangue bovino foram lavadas com NaCl 0,15M a 1000g durante 15 minutos a 4°. A papa de hemácias obtida foi dializada com agitação constante contra 5000 ml de água destilada durante 48 horas a 4°. O material dializado foi centrifugado a 12.000g durante 30 minutos e o sobrenadante (hemoglobina), liofilizado e mantido a -20° até o uso.

Solução de caseína

Preparada em tampão fosfato 0.05M pH 7,0, contendo 6,0 mg prot/ml, mercaptoetanol na concentração final de 15mM e EDTA na concentração final de 5 mM, segundo indicações de Araújo (3).

Inibidor enzimático

Como inibidor de atividade enzimática foi utilizada a Iodacetamida obtida da National Biochemical Company.

Solventes Orgânicos

Os solventes orgânicos continham a designação de quimicamente puros. A acetona foi redestilada a 56° em nosso laboratório. O eter, livre de peróxidos por lavagens sucessivas com solução saturada de sulfato ferroso e livre de ál

coois e de água pela adição de sódio metálico, foi redestilada a 35° em presença de sulfato ferroso seco. Os solventes eram mantidos a -20° até o momento de uso.

Dosagem de proteínas

As proteínas totais foram dosadas utilizando-se a técnica do biureto, segundo Weichselbaun (53). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Zeiss PMQII em cubas de quartzo com 1 cm de caminho ótico.

Reação de aglutinação

Alíquotas de 20 µl de suspensão padronizadas de formas de cultivo do T. cruzi foram misturados, em lâminas escavadas, a igual volume das diluições seriadas de soros anti-FS e a 20 µl de tampão TRIS-HCl 0.05M pH 7.2 adicionado de 0,5% de glicose. As misturas foram agitadas suavemente com movimentos rotatórios e deixadas em câmara úmida durante 1 hora à temperatura ambiente. A leitura da reação foi realizada ao microscópio ótico com objetiva 40/0,65 e ocular 8X. Como controle foram incubados nas mesmas condições, 20 µl de suspensão e 40 µl de tampão.

Inibição da reação de aglutinação

Alíquotas de 20 µl de FS em concentrações conhe

cidas foram incubadas com 20 µl das diferentes diluições dos soros anti - EBC e anti - FA, por 1 hora à temperatura ambiente. A seguir, 20 µl da mistura foram transferidos para lâminas escavadas que continham 20 µl da suspensão padronizada de formas de cultivo e volume semelhante de tampão. Após incubação de 1 hora à temperatura ambiente em câmara úmida, a leitura da reação foi realizada em condições semelhantes à da reação de aglutinação. Os controles consistiram de reações que utilizaram tampão em lugar do soro.

Reação de Imunofluorescência

Foi empregada a técnica de imunofluorescência segundo Camargo (7), alterando-se o tempo de incubação indicado, para 30 minutos. Os conjugados utilizados foram: soro de carneiro anti IgG de coelho, obtido em nosso laboratório, e soro de cabra anti IgG de camundongo, obtido da Hyland Laboratories (USA). Os conjugados foram previamente titulados em reações em bloco. As formas epimastigotas foram fixadas com formol na concentração final de 1% enquanto que as tripomastigotas em formol na concentração de 0,1%.

Inibição da reação de imunofluorescência

As reações de inibição foram realizadas incubando à temperatura ambiente, durante 1 hora, 20 µl de FS em

concentrações conhecidas com 20 μ l das diluições dos diferentes soros. A seguir as misturas foram transferidas para lâminas contendo formas epimastigotas ou tripomastigotas tratadas pelo formol. A reação para a verificação da imunofluorescência foi processada segundo indicações de Camargo (7).

Atividade enzimática da fração FS

A determinação da atividade enzimática foi realizada segundo a técnica de Anson modificada (2). Aliquotas de 0,5 ml de FS (0,7 mg prot/ml) e 0,5 ml de hemoglobina bovina (80 mg prot/ml) foram misturadas e incubadas a 37°, por 2 horas. Como controles de reação foram incubados 2 tubos, 1 dos quais continha somente hemoglobina bovina e o outro apenas FS e tampão fosfato 0,05 M pH 7,0. Após a incubação, foi adicionado a todos os tubos 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5%. A seguir, aos tubos controles foram adicionados FS ou hemoglobina. Como branco da reação, foi preparado um tubo contendo 1 ml de TCA, 0,5 ml de hemoglobina e 0,5 ml de FS. Todos os tubos foram incubados por 15 minutos a 45°. Após este tempo, foram centrifugados a 1700 g durante 15 minutos a 4° e determinada a absorbância do sobrenadante, a 280 nm. O resultado da atividade enzimática foi expresso em Δ DO, diferença da leitura entre o tubo de reação e o tubo contendo FS.

Inibição da atividade enzimática

A inibição da atividade enzimática foi realizada incubando-se 0,1 ml de inibidor com 0,4 ml de FS em concentração conhecida. A atividade enzimática residual foi determinada como descrito acima. Controles foram realizados utilizando-se tampão fosfato 0,05M pH 7,0 em lugar do inibidor. Os resultados foram expressos em termos de porcentagem de inibição em relação ao tubo controle.

Inibição da atividade enzimática da FS por diferentes soros

Porções de 0,1 ml de diferentes soros em diluições conhecidas foram adicionadas a 0,2 ml de FS (0.5 mg prot/ml) em tampão fosfato 0,05M pH 7.0 e as misturas mantidas por 1 hora à temperatura ambiente. Os controles consistiram da mistura da fração com tampão. A seguir, a cada mistura foi adicionado 1,0 ml de caseína (6,0 mg prot/ml) e incubada a 37° por 2 horas. Após esse tempo, às misturas foram adicionados 1,3 ml de TCA 5% seguindo-se uma incubação de 15 minutos a 45°. Os tubos foram então centrifugados a 1700 g por 20 minutos a 4° e os sobrenadantes submetidos à leitura a 280 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da atividade caseinolítica.

Atividade da fração FS sobre complemento humano

Para a determinação desta atividade 0,5 ml da fração FS (0,7 mg prot/ml) em tampão veronal pH 7,4 foram adicionados a 0,5 ml de soro humano normal contendo 2,5 e 10 UCH50. As misturas foram mantidas a 37° por 1 hora. Os controles consistiram das misturas de: complemento e tampão, e complemento e fração FS, previamente aquecida a 56° por 30 minutos. Após a incubação todas as misturas foram centrifugadas a 365g por 15 minutos a 4° e os sobredadantes adicionados ao sistema hemolítico. A detecção da atividade residual do complemento foi realizada através das indicações de Meyer et al. (32).

Atividade da fração FS sobre preparações isoladas de íleo de cobaia

Diferentes concentrações da fração FS foram aplicadas em preparações isoladas de íleo de cobaia (38). As preparações foram mantidas em solução de Tyrode e estimuladas em intervalos convenientes com as amostras a serem testadas.

Atividade da fração FS sobre permeabilidade capilar

Este teste consistiu basicamente da injeção sub

cutânea de 0,1 ml de diferentes concentrações da fração FS no ventre previamente depilado de cobaias normais, seguida da injeção endovenosa de Azul de Evans a 1%. Os controles consistiram da injeção de 0,1 ml de solução salina e de 0,1 ml de soro normal de coelho. Os testes eram considerados positivos quando ocorria extravazamento do corante no local da aplicação, medido e expresso em mm.

RESULTADOS

I. Determinação da atividade enzimática da fração FS

Como um dos objetivos do trabalho era verificar o efeito da atividade enzimática da fração FS sobre substratos de origem biológica, foi necessário determinar, previamente, a presença desta atividade na fração utilizada nos testes. Para isto, diferentes partidas da fração foram reunidas. A atividade enzimática da mistura obtida foi determinada utilizando-se a hemoglobina bovina como substrato (80 mg prot/ml) e FS na concentração de (700 ug prot/ml).

Os dados da Tabela 1, representam a atividade proteolítica determinada.

Tabela 1 - Atividade proteolítica da fração FS (350 g prot/ml) sobre hemoglobina bovina (40 mg prot/ml). Concentrações finais nos tubos de reação

Material	A_{280}	ΔA_{280}
FS + hemoglobina	0.74	0.69
FS + tampão	0.05	
hemoglobina + tampão	0.0	

A atividade proteolítica de FS se reduziu quando a fração foi previamente tratada com a Iodacetamida 20 mM, como indicado na Tabela 2.

Tabela 2 - Inibição da atividade proteolítica da fração FS (350 mg prot/ml) sobre a hemoglobina bovina (80 mg prot/ml), pela ação da Iodacetamida 20 mM.

Material	A ₂₈₀	Porcentagem de inibição
FS % tampão + Hb	0.68	
FS + Iodacetamida + Hb	0.16	77 %

II. Reações de FS com diferentes imune-soros

Costa (13) havia demonstrado que a fração FS, quando inoculada em coelhos, induzia a formação de anticorpos precipitantes. No entanto, não havia informações sobre a presença de outros tipos de anticorpos nesses soros ou contra quais estruturas do parasita eles seriam dirigidos. Para tentar obter informações a esse respeito investigou-se, inicialmente, a capacidade destes imune-soros de aglutinar as formas de cultivo do T. cruzi. Nenhum dos soros anti-FS testados apresentou resultados positivos, o que sugeria de imediato, a ausência de anticorpos aglutinantes nesses soros,

detectáveis pela técnica empregada. Por outro lado, a própria fração FS foi incapaz de inibir reações de aglutinação habitualmente positivas quando soros anti-EBC ou anti-FA eram utilizados.

Embora estes dados possam sugerir a inexistência de constituintes de superfície na fração FS, seria necessário o emprego de outras técnicas, talvez mais sensíveis, para se obter resultados conclusivos.

Empregou-se então a reação de imunofluorescência com o fim de se investigar a presença de anticorpos capazes de reagir com outras estruturas do parasita ou mesmo contra constituintes localizados mais profundamente na superfície. Todos os soros anti-FS testados apresentaram reações positivas, com títulos que variavam de 1:80 a 1:320, como apresentado na Tabela 3. Os parasitas apresentaram-se uniformemente fluorescentes, não se detectando anticorpos dirigidos preferencialmente contra determinadas estruturas.

Desde que era possível se detectar estes anticorpos no soro anti-FS, pesquisou-se sua presença em imunesoros obtidos quando outras frações eram utilizadas em imunizações. Esta investigação foi realizada através da reação de inibição da imunofluorescência. Para isto, soros de coelhos imunizados contra o extrato bruto (EBC) ou contra uma fração rica em antígenos de superfície (FA) foram titulados na ausência ou em presença de FS na concentração de 1 mg prot/ml. Os da

dos da Tabela 3 indicam que a inibição total da reação só foi obtida quando empregados soros provenientes de coelhos imunizados com a própria fração. Dois dos soros obtidos através da imunização, com EBC tiveram sua reação de imunofluorescência parcialmente inibida, observando-se o mesmo em relação a FA.

Tabela 3 - Inibição pela fração FS (1 mg prot/ml) da reação de imunofluorescência de imune-soros de coelho.

Soros		Título dos imunesoros §	
		na ausência de FS	em presença de FS
a-FS	1	160	20
	2	80	20
	3	160	10
	4	160	10
	5	320	10
a-EBC	1	320	80
	2	320	80
	3	160	160
	4	640	640
a-FA	1	80	40
	2	320	160
	3	320	80
	4	320	320

§ - Soro normal de coelho - 1:10.

Alguns autores têm demonstrado a existência de antígenos comuns às formas *epi* e *tripomastigotas* (23,30). Como os soros anti-EBC habitualmente apresentam imunofluorescência positiva quando testados com as formas circulantes do *T. cruzi*, investigou-se a possibilidade de que parte desta imunofluorescência fosse devida a anticorpos dirigidos a algum dos constituintes de FS. Assim, procurou-se verificar se a fração FS era capaz de negatizar a imunofluorescência de soros anti-EBC quando empregados em reações cujo substrato eram as formas *tripomastigotas*. De fato, aquela fração inibiu significativamente a imunofluorescência de um dos soros testados, obtido através da imunização de coelhos com o EBC previamente delipidado. A Figura 1 apresenta esta inibição de imunofluorescência.

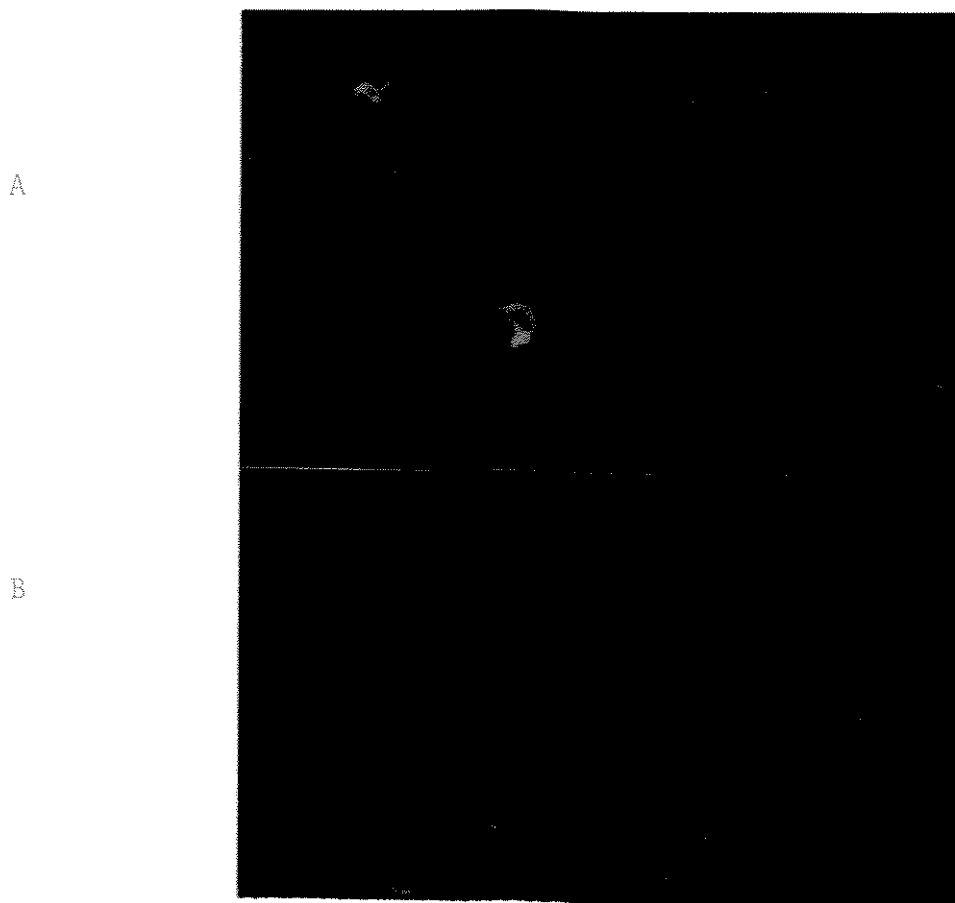


Figura 1 - Inibição da imunofluorescência de soro a-EBC pela FS, quando testado com formas tripomastigotas.

A - Soro diluído a 1:320. Imunofluorescência positiva.

B - Soro diluído a 1:40, previamente tratado com a FS (1 mg prot/ml). Imunofluorescência negativa (X 3000).

Estes dados demonstram que o soro a-EBC testado possui anticorpos dirigidos contra constituintes das formas tripomastigotas do T. cruzi. Como a FS inibiu parte da imunofluorescência deste soro, constituintes desta fração estão presentes também nas formas circulantes do parasita. No entanto, a determinação exata dos componentes de FS presentes nestas formas depende da utilização de imunesoros monoespecíficos, capazes de reagir com cada um dos constituintes da fração. Para tentar esta determinação, foram realizadas reações de imunofluorescência com um imunesoro obtido por Araújo (3), com especificidade para uma enzima purificada pelo autor a partir de FS. Nestas condições observou-se que pelo menos um constituinte de FS está presente também nas formas circulantes. Estes resultados, que nos pareceram significativos estão sendo investigados mais intensamente em nosso laboratório.

Em função da provável existência de antígenos comuns entre as formas de cultivo e circulantes do parasita, pesquisou-se a presença de anticorpos dirigidos contra a fração FS em soros provenientes de infecção experimental e natural. Para isto soros de camundongos infectados com as formas circulantes do T. cruzi obtidos em diferentes fases da infecção, e soros provenientes de pacientes em fase crônica da doença, foram titulados em presença e ausência de FS. Os resultados, apresentados nas Tabelas 4 e 5, indicam que a imu

nofluorescência dos diferentes soros não foi alterada pelo tratamento prévio com a fração solúvel.

Tabela 4 - Inibição da reação de imunofluorescência de soros de camundongos infectados pelo T. cruzi, após tratamento com a fração FS (1 mg prot/ml). Formas e pimastigotas.

Dias de infecção	Título do imune soro	
	na ausência de FS	em presença de FS
14	40	40
21	80	80
28	160	160
35	320	320
42	320	320
49	320	320
56	320	320
64	320	320

Tabela 5 - Inibição pela fração FS (1 mg prot/ml) da reação de imunofluorescência de soros de pacientes chagásicos crônicos. Formas epimastigotas.

Soros	Título dos soros na ausência de FS	dos soros em presença de FS
1	640	320
2	160	160
3	320	320
4	320	320
5	320	160
6	640	640
7	320	320
8	640	640

III. Investigação do efeito da atividade enzimática de FS sobre sistemas biológicos

Esta pesquisa teve a finalidade de obter indicações a respeito da possibilidade da FS alterar processos biológicos naturais, baseada no conhecimento de que vários destes processos são modificados por produtos de natureza enzimática. Os testes realizados foram a pesquisa da atividade de FS sobre complemento humano, sobre a permeabilidade capilar e sobre preparações isoladas de íleo de cobaia.

III.1. Atividade da fração FS sobre complemento humano

Esta atividade foi investigada através da determinação da atividade lítica residual do sistema complemento após o tratamento com a FS.

Experimentos preliminares, no entanto, foram realizados a fim de verificar se a FS atuaria sobre as hemácias do carneiro. Para isto, a 1.0 ml destas hemácias, normais(E) ou sensibilizadas com hemolisina (EA), foi adicionado 1.0 ml da fração contendo 700 µg prot/ml. Após 1 hora a 37°, as misturas foram centrifugadas e os sobrenadantes submetidos à leitura a 550 nm, todos os sobrenadantes receberam 1,0 ml de ácido tricloroacético a 5% e após 15 minutos a 45° foram centrifugados a 1700 g durante 15 minutos a 4°. Os sobrenadantes assim obtidos foram lidos a 280 nm. Os controles consistiram de hemácias em tampão e FS em tampão, na mesma concentração da reação. Os resultados indicaram ausência de lise e ausência de liberação de péptides.

Quando o complemento humano foi submetido à ação de FS verificou-se uma redução de sua atividade lítica residual, especialmente quando 2 e 5 unidades CH50 foram utilizadas. Os soros contendo 10 unidades não tiveram sua capacidade lítica alterada, como apresentado na Tabela 6. No entanto, a redução observada com 2 unidades, mais acentuada, não se modificou quando a fração foi previamente aquecida a 56°

(FS aq) por 30 minutos. Estes resultados sugerem que, muito provavelmente, componentes do complemento estão sendo absorvidos por constituintes da fração, já que o aquecimento da fração não alterou o padrão de hemólise.

Tabela 6 - Ação da fração FS (350 µg prot/ml) sobre a atividade do sistema complemento. § Resultados expressos em porcentagem de lise.

Material	Complemento (unidades)	Porcentagem de lise
EA	2 U	70.0
EA + FS	2 U	39.0
EA + FS aq	2 U	37.0
EA	5 U	100.0
EA + FS	5 U	65.0
EA	10 U	100.0
EA + FS	10 U	100.0

§ - Média de 5 dosagens. Desvio padrão < 10.0%.

III.2. Atividade da fração FS sobre a permeabilidade capilar

Esta atividade foi investigada através da injeção daquela fração em pele de cobaia, segundo indicações de material e métodos. Determinou-se inicialmente, o tempo de atuação máxima de FS, variando-se o intervalo de tempo entre a injeção da fração e a do corante. Os testes, realizados com intervalos de 0, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos demonstraram que o máximo extravazamento ocorria após 30 minutos de ação da fração. Este intervalo de tempo foi considerado como padrão para todos os experimentos.

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos quando diferentes doses da fração foram injetadas subcutaneamente. Observou-se extravazamento do corante mesmo quando a fração utilizada continha 50 µg de proteína. Os controles consistiram da injeção de 0.1 ml de soro normal de coelho em concentração proteica igual à maior concentração de FS utilizada, e da injeção de 0,1 ml de solução de NaCl 0,15M. Curiosamente, em todos os animais, a área sob ação da fração apresentou-se edemaciada e com aspecto "gelatinoso", sendo que em algumas observaram-se ainda, sufusões hemorrágicas. Nenhuma das áreas controle apresentou estas características.

Tabela 7 - Ação de FS sobre pele de cobaia. Resultados ex
pressos em mm.

Cobaia	FS ($\mu\text{g prot}$)				Controles		
	400	200	100	50	SNC	(400 $\mu\text{g prot}$)	NaCl
1	20	15	10	5		0	3
2	15	20	5	1		0	0
3	-	20	12	10		10	0

Para verificar se a atividade enzimática da fração era responsável pela produção da alteração da permeabilidade capilar os mesmos experimentos foram realizados aquecendo-se previamente a fração a 56° por 30 minutos, seguida da centrifugação a 4.000 g por 30 minutos. Os resultados obtidos, (Tabela 8) indicaram que a fração assim tratada não foi capaz de aumentar a permeabilidade capilar.

Tabela 8 - Ação do aquecimento sobre a atividade de FS em pele de cobaia. Resultados expressos em mm.

Cobaia	Material	FS ($\mu\text{g prot}$)	
		100	50
1	FS	difuso	difuso
	FS aquecida	0	0
2	FS	10	3
	FS aquecida	0	0
3	FS	15	10
	FS aquecida	traços	0

Como a atividade de FS sobre a pele estivesse relacionada a sua atividade enzimática e esta fração estivesse sendo purificada paralelamente à realização deste trabalho, uma das enzimas (F3) isoladas por Araújo foi empregada em testes semelhantes. Esta enzima se caracteriza por apresentar uma intensa atividade caseinolítica a pH 7.0, ser inibida pela Iodacetamina, e quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida apresenta-se homogênea. Os resultados indicaram que concentrações cerca de 10 vezes menores que as da fração inicialmente testada ainda apresentaram atividade sobre a permeabilidade capilar, como apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 - Ação da fração F3 (enzima purificada) sobre pele de cobaia.

F3 ($\mu\text{g prot}$)	Extravasamento (mm)
33	25
16.5	25
8.25	15
4.12	10

III.3. Pesquisa da ação de FS sobre preparações isoladas de íleo de cobaia

Esta pesquisa foi realizada através da aplicação de diferentes concentrações de FS em preparações de íleo de cobaia, mantidas em solução de Tyrode. A viabilidade das preparações durante todos os experimentos foi testada através da aplicação de 1,0 μg de histamina, antes e após a administração da fração solúvel.

Concentrações de 50, 100 e 500 μg de FS não foram capazes de promover a contração de íleos de cobaia, num período de contato de 5 minutos e também não foram capazes de modificar a resposta das preparações a doses submáximas de histamina.

Pesquisou-se então, através da mesma técnica, a liberação de substâncias farmacologicamente ativas por ação da FS, de produtos encontrados em soro ou plasma humanos normais particularmente a bradicinina, a exemplo do que ocorre com certos venenos de cobra e com a tripsina (44). Para isto, misturas em partes iguais de soro ou plasma e da fração FS (1.0 mg prot/ml), foram mantidas a 37° durante 2 horas. Às preparações de íleo foram aplicados então 0.1 ml ou 0.4 ml das misturas, desde o tempo 0 de incubação até um tempo máximo de 2 horas, em intervalos de 15 minutos. Os controles consistiram da aplicação de soro ou plasma diluídos a 1:2 e da fração FS isolada, mantidos todos nas mesmas condições do teste. Em nenhum dos experimentos foi verificada contração das fibras musculares nem alteração da resposta das preparações à estimulação histamínica. Desta forma, a FS nas condições do teste, parece não ter ação sobre substâncias potencialmente liberadoras de substâncias farmacologicamente ativas.

IV. Inibição da atividade enzimática de FS por constituintes plasmáticos

Durante o processo de purificação de FS, Araújo demonstrou que esta fração possuía pelo menos tres sistemas enzimáticos distintos, dois dos quais capazes de atuar sobre substratos sintéticos específicos da tripsina (BANA - benzoil-L-arginina-naftilamida) e da quimotripsina (AFNE-acetil-DL-fenilalanina-2-naftilester). Quando se tentou inibir a atividade proteolítica destas frações através do tratamento prévio com soros imunes, observou-se que a inibição obtida era independente da reação antígeno-anticorpo, já que soros normais eram capazes de inibir igualmente aquela atividade. Por esta razão procurou-se investigar mais intensamente esta atividade inibidora presente em soros normais, e verificar seu comportamento em presença da infecção pelo T. cruzi.

Nesta investigação determinou-se inicialmente a atividade caseinolítica de FS em presença de soros normais e provenientes de diferentes espécies. Os controles consistiram da determinação dessa atividade de FS na ausência de soro. Nestas condições, a atividade caseinolítica de FS foi considerada como 100%.

Os resultados apresentados na Tabela 10 indicam que os soros normais, mesmo quando diluídos a 1:100, foram capazes de diminuir sensivelmente a atividade enzimática a FS, enquanto que os soros puros inibiram mais de 90% desta

atividade.

Tabela 10 - Inibição da atividade caseinolítica da fração FS por soros normais. Resultados expressos em porcentagem de inibição.

Espécie	Diluição do soro	Porcentagem de inibição
Coelho	1:1	94,2 ± 6,2
	1:10	88,2 ± 6,9
	1:50	47,2 ± 16,1
	1:100	34,5 ± 12,5
Camundongo	1:1	91,5 ± 3,9
	1:10	84,4 ± 7,2
	1:50	69,1 ± 14,7
	1:100	44,9 ± 9,0
Humanos	1:1	94,1 ± 5,0
	1:10	87,2 ± 6,6
	1:50	56,6 ± 16,5
	1:100	29,4 ± 14,9

Desde que os diferentes soros normais foram capazes de inibir a atividade caseinolítica de FS, investigou-se se esta capacidade inibitória estaria ou não preservada na

vigência da infecção pelo T. cruzi.

Para isto, a atividade caseinolítica da FS foi testada na presença de soros provenientes de fase aguda e crônica da infecção. Os soros de fase aguda foram obtidos de camundongos infectados experimentalmente com a cepa Y do T. cruzi e os de fase crônica de pacientes em fase crônica da doença.

Os soros de camundongos do 7º dia de infecção, quando não diluídos, apresentaram uma diminuição significativa da capacidade inibidora quando comparada aos soros normais (Tabela 11). Quando consideramos as médias das diluições crescentes daqueles soros, os resultados não apresentam diferenças significantes em relação aos normais. No entanto, se consideramos os soros individualmente, podemos observar uma diminuição acentuada desta capacidade inibidora em pelo menos dois deles (soros 4 e 5).

Tabela 11 - Inibição da atividade caseinolítica de FS por soros de camundongos normais e infectados com T. cruzi. Resultados expressos em porcentagem de inibição.

Soros	Diluição			
	1:1	1:10	1:50	1:100
Normais				
1	96,0	94,9	55,5	33,3
2	96,0	83,8	82,8	44,4
3	90,6	82,1	58,8	48,1
4	88,6	86,4	84,1	57,9
5	86,3	75,0	70,5	40,9
$\bar{x} \pm$	(91,5 \pm 4,4)	(84,4 \pm 7,2)	(69,1 \pm 14,7)	(44,9 \pm 9,1)
De infecção				
1	72,7	78,4	69,3	47,7
2	81,8	71,6	64,8	44,3
3	71,1	72,2	61,9	40,2
4	79,4	85,6	53,6	29,9
5	73,6	86,8	40,6	14,1
$\bar{x} \pm$	(75,7 ^{**} \pm 4,6)	(78,9 \pm 7,2)	(58,0 \pm 11,31)	(35,2 \pm 13,6)

** p < 0,01

Os soros humanos obtidos de pacientes chagásicos se comportaram de modo diverso. As amostras não diluídas preservaram, praticamente, a capacidade de inibição. As diluições crescentes, entretanto, apresentaram uma diminuição sensível, sendo que em tres delas esta capacidade foi totalmente abolida quando os soros eram diluídos a 1:100, como apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Inibição da atividade caseinolítica de FS por soros humanos normais e de pacientes chagásicos crônicos. Resultados expressos em porcentagem de inibição.

Soros	Diluição			
	1:1	1:10	1:50	1:100
Normais				
1	92,3	94,8	30,2	16,6
2	89,5	93,7	68,4	23,1
3	98,8	85,3	54,0	42,5
4	89,6	81,6	72,4	48,3
5	100,0	80,9	58,4	16,8
$\bar{x} \pm$	(94,0 \pm 5,0)	(87,3 \pm 6,6)	(56,7 \pm 16,6)	(29,5 \pm 14,9)
De infecção				
1	78,0	75,0	43,0	33,7
2	86,0	82,1	16,6	0,05
3	92,8	76,4	38,1	39,3
4	91,4	61,9	12,4	0,05
5	96,2	82,8	23,8	0,03
$\bar{x} \pm$	(88,8 \pm 7,1)	(75,6 [*] \pm 8,4)	(26,8 ^{**} \pm 13,3)	

* p < 0,05

** p < 0,01

O conjunto de resultados indica que a atividade caseinolítica da fração FS é inibida por componentes de soros normais, e que esta inibição está alterada na vigência da infecção pelo T. cruzi.

DISCUSSÃO

O processo desenvolvido em nosso laboratório para o isolamento de constituintes das formas de cultivo do T. cruzi permitiu que se obtivesse uma fração altamente solúvel em salina fisiológica (FS). Esta fração se caracteriza por apresentar atividade enzimática sobre substratos biológicos em várias faixas de pH; este comportamento se deve ao fato de que esta fração, na realidade, é um "pool" enzimático. Araújo (3) ao purificar esta fração, demonstrou que na fração FS existem pelo menos tres sistemas enzimáticos distintos.

A pesquisa de constituintes antigênicos de superfície nesta fração apresentou resultados negativos, pois a FS foi incapaz de inibir a aglutinação de diferentes soros imunes, ao contrário do que ocorre com a FA. No entanto, trabalhos que estão sendo atualmente desenvolvidos por Tamashiro, (51) têm demonstrado que um constituinte polissacarídico obtido por Araújo (3) durante o processo de purificação de FS, é capaz de inibir a aglutinação de epimastigotas pela ação de soros anti-EBC e anti-FA. Estes dados mais recentes sugerem que provavelmente os imune-soros testados no trabalho não contêm anticorpos, em níveis detectáveis pela técnica empregada, dirigidos contra este polissacarídeo localizado na superfície das formas de cultivo. Ou que a FS em estado bru

to não contenha este polissacarídeo em concentração suficiente para inibir as reações de aglutinação através da técnica empregada. O fato de um componente de FS inibir a aglutinação das formas de cultivo do parasita quando submetidos à ação de soros anti-FA indica que essas duas frações possuem constituintes comuns. A existência destes constituintes poderia explicar a inibição da imunofluorescência observada quando aqueles soros anti-FA foram testados. É possível que a inibição parcial seja devida à baixa concentração de anticorpos específicos nos soros testados ou dos constituintes comuns na fração utilizada.

As reações de imunofluorescência indicaram que constituintes de FS estão presente também nas formas circulantes do parasita. Dentre os constituintes comuns às formas epi e trípomastigotas, pelo menos um é de natureza enzimática, desde que se observou fluorescência quando o imune-soro específico contra um componente enzimático de FS foi utilizado. Este resultado nos pareceu muito significativo, já que constituintes enzimáticos de outros microrganismos tem participação importante na instalação ou manutenção de processos infecciosos. Por esta razão pesquisou-se a presença de anticorpos dirigidos contra constituintes de FS em soros obtidos durante a infecção pelo T. cruzi. Tais anticorpos não foram detectados em nenhum dos soros testados. Estes resultados sugerem uma série de possibilidades em relação à resposta imune do hospedeiro a constituintes da fração. Uma delas é que estes constituintes estejam situados, nas formas circulantes, ,

em locais que dificultem seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. Neste caso, as reações negativas seriam devidas à ausência de anticorpos por falta de exposição antigênica. Se os constituintes, no entanto, puderem ser reconhecidos e houver a produção de anticorpos, haveria ainda a possibilidade destes constituintes antigênicos serem liberados, "in vivo" formando complexos solúveis com os anticorpos produzidos. A existência de complexos solúveis na infecção pelo T. cruzi já foi demonstrada por Chaves e col. (10); se isto ocorrer a FS utilizada nas reações de inibição de imunofluorescência não altera a relação antígeno anticorpo já estabelecida e as reações se mostram negativas. Haveria a possibilidade ainda, de uma ação imunodepressora no hospedeiro, exercida por outros constituintes das formas circulantes do parasita. Em relação a esse aspecto, Corsini e col. (12) demonstraram que constituintes das formas de cultivo, presentes na fração FA, são capazes de produzir imunodepressão em camundongos. Esta mesma ação, em constituintes das formas tripomastigotas, está sendo atualmente investigada pelos mesmos autores.

Os dados obtidos através destas reações de imunofluorescência confirmaram algumas evidências anteriores de que as formas tripomastigotas contêm constituintes muito semelhantes aos de FS. Assim, quando lisados das formas circulantes eram testados quanto a sua atividade enzimática, os resultados eram similares aos obtidos quando a FS era empre

gada (Rangel e Araújo, dados não publicados). Desta forma, a pesquisa de constituintes das formas de cultivo do T. cruzi se torna mais relevante, especialmente se estas formas estiverem presentes também nos hospedeiros vertebrados, como observou Tafuri et al. (49) em musculatura esquelética de camundongos.

As informações a respeito da atividade biológica de constituintes, especialmente enzimáticos, das diferentes formas do T. cruzi são escassas. A ação de extratos das formas epimastigotas sobre a permeabilidade capilar, por exemplo, havia sido testada em 1966, por Seneca e Peer (47). Estes autores injetaram 1 mg de uma "chagastoxina" obtida através da ação do formol sobre lisados das formas de cultivo, mas um aumento da permeabilidade capilar só foi observado quando coelhos imunes eram utilizados; coelhos normais não sofriam qualquer alteração. Mais tarde, Rangel et al. (40) demonstraram um aumento de permeabilidade capilar por ação de extratos de epimastigotas, quando injetados em cobaias normais. Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que a FS foi também capaz de produzir aquela alteração. Esta ação de FS está relacionada à ação enzimática da fração, desde que ela foi suprimida totalmente pelo aquecimento prévio a 56°. A difusão do corante, no entanto, não se deu de maneira uniforme e circunscrita, como se observa com a inoculação de produtos purificados, tipo tripsina, ou como observado habitualmente

nas reações de anafilaxia cutânea passiva. Este aspecto difuso, presente independentemente das concentrações de FS utilizadas e do tempo de sua ação sobre a pele, poderia ser devido ao fato de que a FS, em estado bruto, é um "pool" de enzimas. Desta forma, cada sistema enzimático poderia atuar de maneira independente sobre os diferentes substratos existentes no local da injeção. Esta interpretação parece coerente com os resultados obtidos quando um constituinte purificado de FS (F3) foi utilizado no mesmo experimento. Neste caso, o extravasamento do corante se deu de forma mais uniforme, tendo inclusive desaparecido o aspecto gelatinoso observado quando da injeção de FS.

O mecanismo de ação da FS sobre pele de cobaias está sendo atualmente investigado. Algumas tentativas para a demonstração da liberação de substâncias farmacologicamente ativas que pudessem explicar aquela ação até o momento não obtiveram êxito. No entanto, a mediação de substâncias farmacologicamente ativas na alteração da permeabilidade capilar é encontrada na ação de alguns produtos biológicos bem estudados. O veneno de B. jararaca, por exemplo, aumenta a permeabilidade capilar através de uma protease que libera substâncias farmacologicamente ativas do plasma. No entanto, este mecanismo parece ser diferente de que ocorre com a FS, já que a atividade daquele veneno não é suprimida pelo aquecimento a 100° embora sua atividade caseinolítica desapareça com esse tratamento (23). A ação de outros venenos, como os

de Apis mellifica e de Naja nigricollis parece ser mediada por uma fosfolipase que transforma a lecitina plasmática em lisolecitina. Assim, a fosfolipase contida nestes venenos só é capaz de degranular mastócitos "in vitro" quando em presença de soro ou plasma (45).

Seria possível uma ação direta de constituintes de FS sobre componentes da parede capilar, como observado com algumas toxinas secretadas por alguns microrganismos. O "choleragen", secretado pelo V. cholerae e a toxina ST secretada por algumas cepas enterotoxigênicas de E. coli parecem atuar desta forma sobre a permeabilidade capilar (14, 17). A investigação do mecanismo da ação deve ser agora realizada com seus constituintes purificados.

O estado bruto da FS talvez seja responsável pela não detecção através dos experimentos com preparações isoladas de íleo de cobaia, de substâncias farmacologicamente ativas em soro ou plasma tratados com a fração. Araújo (3) demonstrou que alguns constituintes de FS possuem atividade sobre substratos sintéticos da tripsina e quimotripsina. Sabe-se que a tripsina e algumas proteases de veneno de cobra com atividade tripsina são responsáveis pela ativação do sistema bradicininogênio - bradicinina do plasma ou soro normais. Desta forma a FS poderia atuar no sistema das cininas, mas o componente com atividade quimotripsina atuaria concomitantemente em sentido inverso, já que a quimotripsina é capaz de degradar rapidamente a bradicinina formada por ação do cons

tituinte com atividade tripsina (23). Por outro lado, o componente com atividade tripsina poderia apresentar esta ação, desde que se sabe que a tripsina, quando deixada por tempo mais prolongado em contato com a bradicinina é capaz de inativá-la (44). Outras substâncias farmacológicas presentes no plasma, cuja ativação depende também da participação enzimática, poderiam igualmente sofrer ação de FS. A obtenção de resultados conclusivos, no entanto, depende do emprego de frações purificadas.

A não detecção de substâncias farmacologicamente ativas, por outro lado, poderia ser explicada pela presença de inibidores da atividade enzimática de FS no soro ou plasma normais.

A ocorrência desses inibidores poderia justificar certa variação observada nos resultados dos experimentos de permeabilidade capilar, ou seja, a alteração da permeabilidade poderia também estar relacionada aos níveis destes inibidores na circulação sanguínea no momento do experimento. A liberação de anafilatoxinas a partir do sistema complemento também não foi detectada; a atividade enzimática de FS sobre constituintes do complemento muito provavelmente foi impedida por esta atividade inibidora dos soros normais.

A investigação em torno do complemento, entretanto evidenciou a incapacidade da FS em atuar sobre a membrana das hemácias de carneiro, facilitando a lise ou alterando sua permeabilidade. Nesse sentido, Brener (5) estudando as mudanças

hematológicas de camundongos inoculados com T. cruzi, pesquisou a presença de fatores hemolíticos produzidos pelo parasita, sem contudo obter resultados positivos.

O dado mais interessante, a nosso ver, foi a redução da atividade inibidora da ação de FS sobre a caseína, quando soros provenientes de infecção natural e experimental pelo T. cruzi foram empregados. Alguns soros obtidos de camundongos na fase aguda da infecção pelo T. cruzi apresentaram uma perda importante de sua capacidade inibidora, quando comparados aos soros provenientes de animais normais. Esta redução na capacidade inibidora se evidenciou, particularmente, nos soros nº 4 e 5 (Tabela 11). Quando estes soros foram utilizados em diluição máxima (1:100), sua capacidade inibidora foi reduzida praticamente a 50% em relação à diluição anterior. Estes dados parecem indicar que durante a fase aguda da infecção pelo T. cruzi em camundongos há uma alteração nos níveis de inibidores enzimáticos naturalmente existente no soro desses animais.

Os soros provenientes de pacientes em fase crônica da doença de Chagas se comportaram de maneira um pouco diversa, porque, embora a ação inibitória estivesse praticamente preservada nos soros puros, ela se esgotou mais rapidamente quando comparada aos soros provenientes de camundongos em fase aguda da infecção. Em tres soros, nº 2, 4 e 5, já havia uma redução muito acentuada quando os soros eram diluídos a 1:50; esta redução foi de praticamente 100% quando estes so

ros foram utilizados na diluição máxima (Tabela 12).

Desta forma parece haver realmente uma alteração dos níveis de inibidores enzimáticos naturais durante a infecção pelo T. cruzi. No entanto, a intensidade e a natureza desta alteração não pode ser ainda interpretada diante dos resultados apresentados. Essa alteração poderia ser expressão de um processo geral de dano tissular, e desta forma outros processos infecciosos ou inflamatórios, agudos ou crônicos, poderiam apresentar também níveis modificados dos inibidores envolvidos em função de um metabolismo aumentado ou alterado.

Uma investigação nesse sentido deve ser aprofundada porque estes dados parecem apresentar novos aspectos a serem considerados no estudo da relação parasita hospedeiro estabelecida durante a infecção pelo T. cruzi.

RESUMO E CONCLUSÕES

Uma fração solúvel com atividade enzimática, obtida de formas de cultivo do T. cruzi foi investigada quanto a sua atividade biológica através de diferentes testes. Durante esta investigação, pesquisou-se também a ocorrência de inibidores da atividade enzimática da fração em diferentes soros normais. Os resultados obtidos permitiram concluir que:

1. A fração FS é capaz de alterar a permeabilidade de capilar de cobaias normais, quando injetada subcutâneamente. Esta ação se deve à atividade enzimática de FS.
2. A fração FS não mostrou atividade enzimática, sobre componentes do complemento humano, embora estes tenham sido parcialmente absorvidos por constituintes da fração.
3. A fração FS não alterou a permeabilidade da membrana de hemácias normais de carneiro.
4. Não foi possível detectar-se substâncias farmacologicamente ativas liberadas de soros ou plasmas normais por ação de FS, capazes de contrair o íleo de cobaia ou de modificar a

sua resposta à histamina.

5. Diferentes soros normais tem uma intensa ação inibidora sobre a atividade caseinolítica de FS, que no entanto está diminuída em soros obtidos na vigência da infecção, pelo T.cruzi.
6. Constituintes de FS estão presentes nas formas tripomastigotas, detectados pelas reações de imunofluorescência.

BIBLIOGRAFIA

1. AFCHAIN, D. et CAPRON, A. - Analyse immunoélectrophoretique des antigenes solubles de T. cruzi. Applications à la Trypanosomiase expérimental de la souris. *Gaz. Med. Bahia*, 71: 5-7, 1971.
2. ANSON, M. L. - The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79- , 1938.
3. ARAÚJO, P. M. - Isolamento e caracterização de uma protease de lisados de T. cruzi (Chagas, 1909). Tese de doutoramento. Inst. Biol. Unicamp, 1979.
4. BOURNE, H. R. et al. - Effects of cholera enterotoxin on adenosine 3', 5 - monophosphate and neutrophil function. Comparison with other compounds wich stimulate leukocyte adenylcyclase. *J. Clin. Invest.* 52: 698 - 708, 1973.
5. BRENER, Z. - Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da Doença de Chagas. Tese de Doutoramento. Belo Horizonte, 1961.
6. BRENER, Z. and CARDOSO, J. E. - Some aspects of hematolo

- gical changes in mice inoculated with T. cruzi Y strain. V Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambu, 1978.
7. CAMARGO, M. E. - Fluorescent antibody test for the diagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of T. cruzi in slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 8: 227 - 234, 1964.
 8. CHAGAS, C. - Processos patogênicos da Tripanosomiase Americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, T.14: 5-61, 1922.
 9. CHAGAS, C. e VILLELA, E. - Forma cardíaca da Trypanosomiase Americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, T.14: 5-61, 1922.
 10. CHAVES, J.; GUIMARÃES FERRI, R.; KLIEMAN, T. A. e RULEGUI, I. - Complexos imunes circulantes na Doença de Chagas experimental: Identificação de antígenos parasitários nos complexos. Resumos. V Reunião Anual. Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambu, 1978.
 11. CORSINI, A. C. - Ação biológica dos antígenos do Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909). I. Efeito sobre a fagocitose do carbono coloidal e a resposta imune a hemá

- cias de carneiro. Tese de mestrado. Inst. Biol. Unicamp, 1975.
12. CORSINI, A. C.; COSTA, M. G.; OLIVEIRA, O. L. P.; CAMARGO, I. J. B. - A fraction (FAd) isolated from T. cruzi epimastigotes depress immune response in mice. *Immunology* (in press), 1979.
13. COSTA, M. G. - Atividade proteínásica de lisados de T. cruzi (Chagas, 1909). Tese de mestrado. Inst Biol. Unicamp, 1977.
14. CRAIG, J. P. - A permeability factor (toxin) found in cholerae stools and culture filtrates and its neutralization by convalescent cholerae sera. *Nature* (London) 207: 614-616, 1965.
15. DRESDEN, M. H. and ASCH, H. L. - Proteolytic enzymes in extracts of Schistosoma mansoni cercarias. *Biochim. Biophys. Acta*, 229: 378-384, 1972.
16. EICHBAUM, W. F. - Pesquisas sobre a presença de substâncias tóxicas em culturas de Trypanosoma cruzi. Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas. 2: 479-489, 1961.

17. EVANS, D. J.; EVANS, D. G.; GORBACH, S. L. - Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from man. *Infect. Immun.* 8: 725-730, 1973.
18. FERNANDES, J. F. and CASTELLANI, O. - Growth characteristics and chemical composition of Trypanosoma cruzi. *Exp. Parasitol.* 18: 195-202, 1966.
19. FRUIT, J.; AFCHAIN, D.; PETITPREZ, A.; CAPRON, A. - Trypanosoma cruzi: Location of a specific antigen on the surface of bloodstream trypomastigote and culture epimastigote forms. *Exp. Parasitol.* 45: 185-189, 1978.
20. GANGULY, U; GREENOUGH, W. B. - Adenosine 3', 5' -cyclic monophosphate in V. cholerae. *Infect Immun.* 111: 343-349, 1975.
21. GOTLIEB, M. - A carbohydrate-containing antigen from Trypanosoma cruzi and its detection in the circulation of infected mice. *J. Immunol.* 119: 465-470, 1977.
22. GUERREIRO, C. e MACHADO, A. - Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas com o elemento diag

- nóstico. *Brasil Med.* 27: 225-226, 1913.
23. HAMBERG, U. and ROCHA e SILVA, M. - On the release of bradykinin by trypsin and snake venoms. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 110: 222-238, 1957.
24. HOEPRICH., P. D. - Infectious Diseases. Harper and Row, London, 1972.
25. HERMAN, R. - Osmotic fragility of normal duck erythrocytes as influenced by extracts of Plasmodium lophurae, P. lophurae - infected cells and plasma. *J. Parasitol.* 55: 626-632, 1969.
26. JADIN, J. and CREEMERS, J. - Ultrastructure et Biologie des Toxoplasmes. III. Observation de Toxoplasmes in traerythrocytaires chez un mammifere. *Act. Trop.* 25: 267-270, 1968.
27. JORG, M. E. - Imposibilidad de demostrar toxinas en Trypanosoma cruzi de cultivos. *Boletin Chileno de Parasitología.* 19: 84-87, 1964.
28. KLOETZEL, J; CAMARGO, M. E.; GIOVANNINI, V. L. - Antigenic differences among epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. *J. Proto*

zool. 22: 259-261, 1975.

29. KLYUEVA, N. G. and ROSKIN, G. - Cancerolytic substance of Schizotrypanum cruzi. *Amer. Rev. Soviet. Med.*, 4: 127-129, 1946.
30. KOBERLE, F. - Ueber das Neurotoxin des Trypanosoma cruzi. *Zbl. Allg. Path.* 95: 468-475, 1956.
31. LADDA, R.; AIKAWA, M. and SPRING, H. - Penetration of erythrocytes by merozoites of mammalian and avian material parasites. *J. Parasitol.* 55: 633-644, 1969.
32. MEYER, M; OSLER, O.; BIER, D. and HEIDELBERGER, M. - Quantitative studies of complement fixation. I. *Method. J. Immunol.* 59: 195, 1948.
33. MUNIZ, J. - Contribuição para um melhor conhecimento da ação patogênica do S. cruzi no organismo humano. *Hospital.*, 72: 675-700, 1967.
34. NORBY, R. and LYCKE, E. - Factor enhancing the host cell penetration of Toxoplasma gondii. *J. Bact.* 93: 53-58, 1967.
35. O'DALY, J. - Effect of fetal calf serum fractions on di

- vision and transformation of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in vitro. *J. Protozool.* 23: 577-583 , 1976.
36. OLIVEIRA, M. M. X. e MEYER, H. - Ação do S. cruzi degenerado e suspensão de trypanosomas mortos sobre células nervosas em cultura de tecido de embrião de galinha. *O Hospital*, 55: 889-903, 1959.
37. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD - *Immunología y Enfermedades Parasitarias*. Informe de um Comité de Expertos de la OMS. Ginebra, OMS, 1965 (Serie Informes Técnicos n° 315).
38. Pharmacological Experiments on Isolated Preparations. Department of Pharmacology. University of Edinburgh. E & Livingstone LTD. Edinburgh and London, 1968.
39. POTHIER, M. A.; SCHMUNIS, G. A.; VATTUONE, N. H.; TRAVERSA, D. G.; YANOVSKY, J. F. - Valeur diagnostique des différentes formes parasitaires dans la Trypanosomes Américaine expérimentale en immunofluorescence chez la souris. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 44: 225 - 240, 1969.
40. RANGEL, H. A.; REPKA, D. e RANGEL, C. O. - Estudos so

- bre a ação biológica de extratos de T. cruzi. XXIV Reunião Anual. SBPC. Ciência e Cultura. 24: 296, 1972.
41. REPKA, D.; RANGEL, H. A.; COSTA, M. G. - Atividade proteolítica de extratos de T. cruzi. XXIV Reunião Anual. SBPC. Ciência e Cultura. 24: 296, 1972.
42. REPKA, D. - Contribuição ao estudo imunológico das formas de cultivo do Trypanosoma cruzi (Chagas 1909). Tese de doutoramento. Inst. Biol. Unicamp, 1973.
43. RICHARDS, K. and DOUGLAS, S. D. - Pathophysiological effects of V. Cholerae and enterotoxigen E. coli and their exotoxins on eucaryotic cells. *Microb. Rev.* 592-613, 1978.
44. ROCHA e SILVA, M.; BERALDO, W. T. - Um novo princípio auto farmacológico (Bradicinina) liberado do plasma sob ação de venenos de cobra e da Tripsina. Separata de "Ciência e Cultura" 1, 1949). In: A Bradykinin Anthology. Eds.: M. Rocha e Silva and Hanna A. Rothschild. São Paulo, 1974.
45. ROTHSCHILD, A. M. - Histamine release by bee venom phospholipase A and mellitin in rat. *Brit. J. Pharmacol.*

- 25: 59, 1965.
46. SANTANA, E. M. - Investigações sobre determinantes antigênicos das formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909). Tese de mestrado. Inst. Biol. Unicamp, 1977.
 47. SENECA, H. and PEER, P. - Immune - Biological properties of chagastoxin (lipopolysaccharide). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60: 610-620, 1966.
 48. SOUZA, O. - Obtenção de uma fração antigênica de Superfície de Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909). Tese de mestrado em fase de redação. Inst. Biol. Unicamp, 1979.
 49. TAFURI, W. L.; CHIARI, E.; BOGLIOLO, L.; RASO, T. - Ciclo intracelular do T. cruzi e sua importância na patogênese da Doença de Chagas. Resumos. Reunião Anual sobre Pesquisa Básica de Chagas. Caxambu, 1978.
 50. TAGER, M. and DUMMOND, M. C. - Staphylocoagulase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 128: 92-111, 1965.
 51. TAMASHIRO, W. M. C. - Isolamento e caracterização de antígeno de superfície de formas epimastigotas de T. cruzi. Tese de mestrado em fase de redação. Inst.

Biol. Unicamp, 1979.

52. VOLLER, A; SHAW, J. J. - Immunological observations on an antiserum to *T. cruzi*. *Z. Tropenmed. Parasitol.* . 16 B: 181-185, 1965.
53. WEICHSELBAUN, T. E. - An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. *Am. J. Clin. Pathol.* 10: 40, 1946.
54. WORLD HEALTH ORGANIZATION - Memoranda. Immunology of Chagas' Disease. *Bull. World. Org.* 50: 459-472, 1974.