

ROSA TEIXEIRA DE PINHO

**Aspectos de imunodiagnóstico, imunopatologia
e, proteinases ácidas na doença de Chagas**

Tese submetida à Coordenação de Pós-graduação do Instituto Oswaldo
Cruz para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Área de Concentração: Imunologia

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2001

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**“Aspectos de imunodiagnóstico, imunopatologia
e, proteinases ácidas na doença de Chagas”**

Tese apresentada visando à obtenção do Título de
Doutor em Ciências
na área de Imunologia

Orientador: Dr. Salvatore Giovanni De Simone

Junho de 2001

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Esta dissertação intitulada:

**“Aspectos de imunodiagnóstico, imunopatologia
e, proteinases ácidas na doença de Chagas”**

Apresentada por **Rosa Teixeira de Pinho**,
foi avaliada pela banca examinadora composta pelos membros:

Dr. José Mauro Peralta-UFRJ

Dr. Luiz Roberto Ribeiro Castello-Branco-IOC/FIOCRUZ

Dra. Joseli Lannes - Vieira-IOC/FIOCRUZ

Dr. Saulo Bourguignon - UFF (Suplente)

Dr. Carlos Roberto Alves - IOC (Suplente)

Pinho, Rosa Teixeira de.

Aspectos de imunodiagnóstico, imunopatologia e, proteinases ácidas na doença de Chagas / Rosa Teixeira de Pinho. - Rio de Janeiro, 2001.
179 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2001.

Orientador: Salvatore Giovanni De Simone.

Bibliografia: f. 137-173

1. Trypanosoma cruzi. 2. Aspártico proteinases. 3. Saliva. 4. Antígenos. 5. Matriz extracelular. I. Título.

Trabalho realizado no laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Imunologia e no Laboratório de Microsequenciamento de Proteínas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

“Um Intelecto que num determinado momento conhecesse as forças que agem na natureza e a posição de todas as coisas das quais se compõe o mundo – supondo-se que dito intelecto fosse suficientemente vasto para sujeitar todos esses dados à sua análise – abarcaria, na mesma fórmula, os movimentos dos maiores corpos do universo e aqueles dos átomos mais ínfimos; nada lhe seria incerto e o futuro, à semelhança do passado, seria presente aos seus olhos”.

Pierre Simon Laplace

À minha família

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que tivesse o *dom* da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e não tivesse amor, nada seria. ”

CORÍNTIOS 1, capítulo 13. *Bíblia*

MEUS ESPECIAIS AGRADECIMENTOS A:

Antonio José da Silva Gonçalves

Bernardo Galvão-Castro

Carlos Roberto Alves

Claudia Maria Monteiro Vanni

David Lewis

Edmir Pereira

Genilton Vieira

Gloria Mangueira Este

Heloísa Diniz

Isabelle do Nascimento de Oliveira

José Antonio Pinto de Sá-Ferreira

Joseli Lannes-Vieira

Júlio César de Mello Reis

Leila Abboud Dias Carneiro

Luciana de Sousa Soares

Luiz Roberto R. Castello-Branco

Maria Beatriz Ortigão de Sampaio

Mariza Gonçalves Morgado

Patrícia Costa Martins

Renata Oliveira Araújo Soares

Ricardo Ribeiro dos Santos

Rodrigo Mexas

Romney Lima

Simone Aguiar Peixoto

Salvatore Giovanni De Simone

Thereza Christina Benévolo de Andrade

Vera Bongertz...

...Aos colegas do Departamento de Imunologia ...E, a todas as pessoas, que através de sua dedicação, colaboraram direta ou indiretamente na evolução deste trabalho.

ABREVIATURAS

Abs - Absorvância
AC - Anidrase carbônica
ACF - Adjuvante completo de Freund
AIF - Adjuvante incompleto de Freund
AOV - Albumina de ovo
AP - Aspártico proteinase
ARC- Análise restrita convexa
ASB - Albumina de soro bovino
CHAPS - (3-[colamidopropil]-dimetilamônio)-1-propano sulfonato)
DABCO - 1,4 diazobociclo [222]-octano
DC - Dicroísmo circular
E-64 - Trans- Epoxisuccinil-L-Leucilamido-(4-guanidino) butano
ECM- Matriz extracelular
EGPA SDS - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
EPNP - 1,2-epoxy-3-(phenyl-nitrophenoxy) propane
ELISA - ensaio imunoenzimático
g - gravidade; grama
h - Hora
Hb - Hemoglobina
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
kDa - Kilodalton
LIT - Meio de Cultura contendo infuso de fígado e triptose
LPG - Lipofosfoglicano
min – Minuto
mM - Milimolar
O-phe - 1-10 - fenantrolina
PBS - Tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7.2 contendo 0,15 M de NaCl
pI - Ponto isoelétrico

MM - Massa molecular

pmol - Picomol

PVDF - Difluoreto de polividileno

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida

TBS - Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7.2 contendo 0,85% de NaCl

TGC - Tampão Tris-HCl pH 7.2 contendo 0,5% de CHAPS

TPCK -N-tosil-L- fenilalanineclorometil ketona

Tris - Tris (hidroximetil)-amino metano

3D - Estrutura tridimensional

SUMÁRIO

	PÁGINA
Introdução	01
Doença de Chagas: aspectos gerais	03
Fase aguda	04
Fase crônica	04
Caracterização do <i>T. cruzi</i>	11
Resposta imune em doença de Chagas	12
Citocinas em doença de Chagas	15
Diagnóstico	19
Tratamento	23
Enzimas Proteolíticas	26
Proteinases em doenças parasitárias	27
Aspártico Proteinases (AP)	30
Estrutura das APs	36
Mecanismo catalítico das APs	39
Inibidores de AP	40
Objetivos	42
Documento 1	
(Saliva ELISA: a method for the diagnosis of chronic Chagas disease in endemic areas)	43
Documento 2 (Effect of <i>Trypanosoma cruzi</i> released antigens binding to non-infected cells on anti-parasite antibody recognition and expression of extracellular matrix components).	57
Documento 3 (<i>Trypanosoma cruzi</i> : Isolation and characterization of aspartyl Proteases)	93

Documento 4 (Immunogenicity of a new <i>Trypanosoma cruzi</i> aspartic proteinase)	117
Ponderações finais	132
Conclusões	136
Bibliografia	137
Anexo I	174
Anexo II	175
Anexo III	176
Anexo IV	177
Anexo V	178
Anexo VI	179

RESUMO

Neste trabalho, nós estudamos aspectos da doença de Chagas relacionados ao imunodiagnóstico desenvolvendo um novo teste de diagnóstico utilizando saliva, estudamos aspectos relacionados à imunopatologia e isolamos proteinases ácidas do *Trypanosoma cruzi*.

Em nosso primeiro estudo desenvolvemos um teste para o diagnóstico de doença de Chagas. Para isto, utilizamos saliva de pacientes na fase crônica da doença e detectamos, por ELISA, anticorpos específicos da classe IgG em 103 dos 114 testados com 95 e 90 % de especificidade e sensibilidade, respectivamente. Embora, a utilização de soro comparado à da saliva forneça melhores resultados, concluímos que este pode ser um teste alternativo para imunodiagnóstico da doença de Chagas.

No segundo estudo caracterizamos os antígenos liberados de *T. cruzi* que se ligam em células não infectadas de mamíferos. Assim, detectamos através de marcação com metionina (^{35}S), que antígenos liberados por tripomastigotas do *T. cruzi*, adsorveram-se às células não-infectadas e estes foram identificados com massa molecular de 85-110 e 160-170 kDa. Foi também demonstrado o efeito destes antígenos nestas células por imuno-citoquímica e detectamos aumento de expressão de componentes da matriz extracelular (ECM) como colágeno, laminina e fibronectina. Assim, concluímos, que estes antígenos podem ser importantes na inflamação secundária à infecção pelo *T. cruzi*.

No terceiro estudo isolamos, através de coluna de afinidade agarose-pepstatina A, duas proteinases (CZP-I e CZP-II) de formas epimastigotas de *T. cruzi*. A atividade enzimática destas foi observada na região de 56-48 kDa em pH 3,5. O conteúdo de α -hélice, estruturas β , e estruturas não definidas foi de 9, 62 e 17% respectivamente. Ambas as enzimas foram inibidas pelo inibidor clássico pepstatina A ($\geq 68\%$) e pelo marcador de sítio aspártico protease ativo, 1,2-epoxy-3-(phenyl-nitrophenoxy) propane ($\geq 80\%$). Usando-se soros imunes produzidos em coelhos contra estas duas enzimas detectou-se a presença de ambas em todas as formas do parasito (Anexo II). Os resultados obtidos nos permitem concluir que estas proteinases têm características da classe das aspártico proteases.

Ainda, avaliamos a imunogenicidade da proteinase (CZP-II) em camundongos e obtivemos resposta proliferativa proporcional à quantidade de enzima adicionada. Foram também avaliadas, através de imunofenotipagem, as subpopulações das células T presentes ao final da linfoproliferação e verificou-se um predomínio de células CD8+ em relação às células CD4+. Foi ainda observada produção de IFN- γ enquanto a detecção de produção de IL-4 foi baixa.

Estes resultados sugerem que esta enzima possa ter papel na imunoregulação na infecção pelo *T. cruzi* no modelo murino.

ABSTRACT

We have studied some aspects of immunodiagnosis and immunopathology in Chagas' disease. A new diagnostic test using saliva was developed and aspartic proteinases from *Trypanosoma cruzi* were isolated.

On the first study, we developed a new test for Chagas' disease. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to saliva from chronic infected patients to detect infection by *Trypanosoma cruzi*. Specific IgG antibodies were detected in saliva from 103 of 114 samples of infected patients and it showed 90,4% of sensitivity and 95% of specificity. This test could be used as an alternative diagnostic method for Chagas' disease.

On the second study, we characterized *T. cruzi* antigens that bound to non-infected mammalian cells. These released *T. cruzi* trypomastigotes antigens were labeled with (³⁵S) methionine and were able to adsorb to non-infected cells, they showed molecular mass of 85-110 and 160-170 kDa. The adsorption of these antigens to mammalian cells induced an increase expression of extracellular matrix components (ECM) as collagen, laminin and fibronectin as detected by immunohistochemistry. We concluded that these antigens could be important in inflammation secondary to the infection by *T. cruzi*.

On the third study, two proteinases (CZP-I and CZP-II) from *T. cruzi* epimastigotes were isolated by affinity chromatography column. The enzymatic activity of these proteinases was observed at 56-48 kDa region in a pH 3.5. The CZP-I and CZP-II content of α -helix, β -structures and random coil were calculated to be approximately 9, 62 and 29%, respectively. Both proteases activities were strongly inhibited by the classic inhibitor pepstatin-A ($\geq 68\%$) and the aspartic active site labeling agent, 1,2-epoxy-3-(phenyl-nitrophenoxy) propane ($\geq 80\%$). Hyperimmune rabbit sera against the enzymes were able to detect both enzymes in all parasite stages (attachment II). These results suggested that these proteinases have characteristics of aspartic proteinases.

We also studied the immunogenicity of proteinase CZP-II in mice and it showed proliferative response that had direct relation to the amount of enzyme used. Immunophenotyping of the T cells subsets showed predominance of CD8 over CD4 cells and γ -IFN production was observed in contrast to lower levels of IL-4.

These results suggest that these enzymes could play some role in the immunoregulation of *T. cruzi* infection in the mouse model.

Introdução

Doença de Chagas: aspectos gerais

Em 1909, Carlos Chagas observou ao microscópio um flagelado que denominou *Schizotrypanun cruzi* identificando-o como o agente etiológico de uma nova doença. Além disto, também descreveu, pioneiramente, a patologia causada por este parasito assim como o ciclo de vida deste, tanto nos hospedeiros invertebrados como vertebrados (Chagas 1922, 1924).

O parasito, atualmente denominado *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, infecção que tem caráter endêmico na América Latina, estimando-se que aproximadamente 18 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas e cerca de 100 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção (WHO 2001). No Brasil, a doença está disseminada desde o Norte até o Sul do país, estimando-se em 1,8 a 2,5 milhões de pessoas infectadas que apresentam manifestações clínicas cardiopáticas ou digestivas (revisto por Silveira 2000). Esta doença, de caráter crônico, foi primeiramente vinculada às precárias condições sócio-econômicas e educacionais da população, as quais favorecem a alta incidência do vetor nas habitações. Deste modo, a prevalência da doença é maior em áreas com habitações de barro ou tijolos, cobertas com palha ou junco e nos locais onde o vetor encontra-se adaptado ao ambiente doméstico e peridoméstico. Além disso, a invasão das florestas pelo homem causando o desmatamento também propicia que o vetor silvestre entre em contato com o ambiente domiciliar (Coura *et al* 1994). Assim, primeiramente, esta foi considerada uma enfermidade rural.

Atualmente, devido às migrações populacionais, esta doença atingiu também os centros urbanos, onde é transmitida principalmente através da transfusão sangüínea. Deste modo, em áreas urbanizadas, esta passou a ser a mais importante via de contaminação (Schmunis 1991), além da transmissão diretamente pelo vetor. No Brasil, na década de 70, eram feitas aproximadamente 4 milhões de transfusões ao ano estimando-se assim que houve uma incidência de 10 000 a 20 000 casos através desta via (Amato-Neto 1993). A partir da década de 80, com o

advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), houve uma melhora de qualidade na triagem feita em bancos de sangue objetivando prevenir a transmissão de doenças através desta via. Apesar disto, 15% dos novos casos que são detectados da doença de Chagas, ocorrem devido à transfusão de sangue contaminado com o *T. cruzi* (Dias & Schofield 1999).

Além destas vias de contaminação, ocorre ainda, a transmissão congênita, uma vez que, o parasito tem a capacidade de atravessar a placenta, contaminando o feto (Bittencourt 1976, revisto por Silveira 2000). Há, também, alguns relatos de contaminação através do leite materno que foram constatados tanto experimentalmente (Miles 1972) como em humanos (Medina-Lopes 1988). A infecção com o *T. cruzi* também pode ocorrer através de cirurgias de transplantes de órgãos (Amato-Neto 1968, Amato-Neto *et al.* 1995) e acidentes ocorridos em laboratórios (Brener 1984).

O *T. cruzi* é um protozoário que pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* (Hoare 1972). É um flagelado digenético, que apresenta dois hospedeiros no seu ciclo: o hospedeiro vertebrado, que compreende uma grande variedade de mamíferos, entre os quais o homem, e o hospedeiro invertebrado, insetos hematófagos da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Popularmente este inseto é chamado principalmente de barbeiro, chupão, fincão e bicudo (Brener & Andrade 1979).

O *T. cruzi* apresenta diferentes formas durante o seu ciclo de vida: no hospedeiro vertebrado, as formas multiplicativas amastigotas intracelulares e formas tripomastigotas liberadas na circulação; no hospedeiro invertebrado, formas epimastigotas encontradas principalmente no trato digestivo do inseto, e tripomastigotas metacíclicos encontrados à luz do reto, nas fezes e urina dos barbeiros (Brener & Andrade 1979, De Souza 1984). Foram também descritas por Deane *et al.* (1984) formas epimastigotas, típicas de triatomíneos, encontradas no lúmen de glândulas anais de gambás (*Didelphis marsupialis*).

A transmissão da doença de Chagas em áreas rurais ocorre principalmente através de vetores contaminados (Chagas 1909). Nos triatomíneos, os

tripomastigotas metacíclicos oriundos de epimastigotas diferenciados encontram-se na porção final do intestino, são depositados, no momento da picada, juntamente com as fezes e urina, na pele, penetrando então no tecido do hospedeiro, através da mucosa ou por solução de continuidade da pele.

Quando os parasitos infectam o hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos penetram nas células hospedeiras, rompem o vacúolo parasitóforo e no citosol (Carvalho & De Souza 1989) transformam-se em amastigotas. Estes se multiplicam intensamente, por fissão binária, diferenciando-se e originando grande número de formas tripomastigotas, que são liberadas para a circulação, pelo rompimento das células do hospedeiro. Os parasitos re-infectam novas células no organismo, tais como as células do tecido muscular, macrófagos, células epiteliais, fibroblastos, neurônios, células da glia (Andrade 1991), reiniciando, assim, o processo de multiplicação. Quando os reduvídeos se alimentam do sangue de mamíferos contaminados com o parasito, completa-se o ciclo (Chagas 1909, Gaspar Vianna 1911, Brumpt 1913, Hoare 1972).

Fase aguda

Após a infecção humana pelo *T. cruzi*, observa-se um conjunto de reações resultantes da interação do parasito com o hospedeiro e da resposta do organismo. Inicialmente, quando a transmissão ocorre através do vetor e a picada do barbeiro ocorre na região cutânea, pode observar-se o chagoma de inoculação e, especialmente na conjuntiva, o sinal de Romanã (Romanã 1935, Rassi 1979), no local da picada e penetração do parasito.

Ao longo da infecção, as manifestações da doença são divididas em 2 fases: aguda e crônica, sendo observado, na maioria dos casos, a forma indeterminada da fase crônica. Os aspectos clínicos da fase aguda, que tem aproximadamente 1 a 2 meses de duração, caracterizam-se principalmente pela intensa multiplicação dos parasitos. Esta fase tanto pode ser assintomática, oligossintomática ou vir acompanhada de febre, mal-estar e linfadenopatia (Chagas 1909, Köberle 1968,

Prata 1994). Além destas, podem ocorrer manifestações mais graves como, por exemplo, a miocardite chagásica da fase aguda e meningoencefalite (Rassi 1979), podendo inclusive ocorrer nesta fase, a morte súbita.

Na fase aguda, as lesões neuronais e miocárdicas estão relacionadas ao parasitismo, e a ruptura dos ninhos do parasito resulta na liberação de antígenos do *T. cruzi* (Soares & Ribeiro dos Santos 1999). Ainda, tem sido proposto que estes antígenos podem adsorver-se às células sensibilizando-as e transformando neurônios e fibras musculares (Ribeiro dos Santos & Hudson 1980a, Araujo 1985) levando-os à destruição pela resposta imunológica contra o parasito (Kuhn & Mumane 1977, Ribeiro dos Santos & Hudson 1980b).

Na fase aguda ocorre miocardite aguda com sinais de injúria imune mediada por células em cardiomiócitos infectados e não infectados. Esta fase é caracterizada histopatologicamente por focos de necrose miocitolítica e infiltrado inflamatório mononuclear, diretamente relacionados ao parasitismo tissular e à destruição inflamatória, com relevância clínica transitória (Soares & Ribeiro dos Santos 1999). Após um período de 2 a 3 meses, na maioria dos casos a miocardite aguda diminui, porém não desaparece. Permanece uma miocardite branda durante muitos anos sem sinais de injúria acumulativa.

A progressão da fase aguda para a fase crônica coincide com a diminuição da parasitemia e do parasitismo.

Fase crônica

Forma indeterminada - A forma indeterminada da fase crônica da doença de Chagas é definida como um período de silêncio após a fase aguda. No 1º Encontro de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas, em Araxá, Minas Gerais (1985), foram definidos os seguintes critérios que caracterizam a forma indeterminada: sorologia positiva ou diagnóstico parasitológico, ausência de sinais e sintomas da doença, exames eletrocardiográficos normais e imagens radiológicas de coração, esôfago e cólon normais. Assim, os indivíduos, nesta fase, apresentam evidências

sorológicas e parasitológicas da infecção, porém são assintomáticos. Contudo, ao exame microscópico de biópsias de corações, destes pacientes é revelada miocardite branda focal (Mady *et al.* 1984, Palácios-Pru *et al.* 1989).

Nesta fase, os antígenos parasitários desencadeiam a inflamação, atraindo células inflamatórias, que se acumulam no tecido intersticial, acompanhado por certo grau de fibrose. Em algumas lesões focais há evidências de degradação da matriz extracelular (colágeno e fibras elásticas) e sinais de apoptose com remoção das células inflamatórias (Andrade *et al.* 1997). A formação de novas lesões é balanceada pela remoção das antigas o que permite a sobrevivência do hospedeiro, na maioria das vezes, sem manifestações clínicas. Quando as lesões focais afetam estruturas estratégicas do coração, tais como o sistema de condução ou o sistema nervoso autônomo, então aparecem as manifestações de fase crônica (Andrade 1999). Segundo Higuchi (1999), a forma indeterminada da doença está provavelmente relacionada a uma adequada resposta imune contra o *T. cruzi*, levando a um menor número de parasitos, diminuição da inflamação no miocárdio com menos anormalidades na microvasculatura e resultando assim na diminuição de complicações para o paciente.

A inflamação persiste na forma indeterminada e a transição para a forma cardíaca ocorre principalmente através da retirada ou interferência com fatores supressivos, embora estes fatores ainda precisem ser elucidados (Andrade 1999). O término dos mecanismos supressivos da resposta imune mediada por células, ativos durante esta fase, parece estar relacionado à reativação da inflamação ocorrendo então a transição com a manifestação da fase crônica (Andrade 1999). Esta transição, na qual a supressão da resposta imune mediada por células cessa de ocorrer, parece estar relacionada à reativação da inflamação. Quando se manifesta a fase crônica, 70% dos pacientes continuam assintomáticos, enquanto aproximadamente 30% desenvolvem manifestações patológicas da fase crônica (Kalil & Cunha-Neto 1996).

A fase crônica da doença de Chagas caracteriza-se pela baixa parasitemia e parasitismo e apresenta um grau variável de manifestações. Clinicamente nesta

fase 20 a 30% dos pacientes desenvolvem cardiopatia com intensidade variável e 8 a 10% desenvolvem a forma digestiva. Na forma cardíaca, são encontrados graus variáveis de hipertrofia cardíaca e dilatação na região apical (aneurisma apical), focos de necrose no miocárdio, em conjunto com o infiltrado inflamatório, que é composto predominantemente de células mononucleares e fibrose intersticial. Os parasitos são raramente observados (Köberle 1968). Os pacientes nesta fase podem apresentar insuficiência cardíaca, formação de trombos e acidentes cerebrovasculares (Rossi & Mengel 1992). Na forma digestiva ocorre um processo de denervação da musculatura lisa do intestino ocasionando mega-síndromes (Andrade 1999). As alterações digestivas como mega-cólon e ou mega-esôfago, podem estar associadas a distúrbios gastrintestinais, como por exemplo, regurgitação, má nutrição e constipação severa (Rossi & Mengel 1992).

Segundo Higuchi (1999), os antígenos de *T. cruzi* têm um papel fundamental no desenvolvimento de miocardite crônica e um certo grau de imunossupressão está presente nesta fase da doença mantendo assim a sobrevivência do parasito dentro do hospedeiro. Nesta fase, a cardiopatia da doença de Chagas crônica é resultado da interação entre o parasito e o hospedeiro uma vez que o *T. cruzi* interfere com o sistema imune deste, para sua proteção e propagação. Assim, segundo a autora, pacientes com uma resposta imune adequada podem lograr a infecção parasitária. Também, alterações na resposta imune podem levar à persistência do parasito e ou seus produtos induzirem reações cruzadas entre as fibras miocárdicas e o *T. cruzi*. As lesões de fase crônica são dependentes de uma resposta imunológica exacerbada do hospedeiro contra o parasito causando injúria ao miocárdio. Ainda, a resposta inflamatória, que provavelmente é recorrente, em períodos de exacerbação acentuada é a principal responsável pela injúria neuronal, dilatação microcirculatória, deformidades da matriz do coração e conseqüentemente a falência do órgão (Higuchi 1999). Ainda, outra hipótese aventada para explicar a injúria ao miocárdio, causada pela infecção com o *T. cruzi*, é a rede idiotípica. Quando da geração de anticorpos anti-*T. cruzi* e a posterior produção de anti-idiotípos, estes, semelhantes à configuração de antígenos do parasito, poderiam reagir diretamente com células imunes ativadas contra receptores presentes na

membrana do cardiomiócito. Uma destas reações cruzadas no homem está representada pela enzima acetil-colinesterase. No soro de pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas foi encontrado este anticorpo anti-idiotípo em maior frequência do que em pacientes com a forma indeterminada (Ouassi *et al.* 1998).

Além disso, trabalhos experimentais recentes comprovaram que é necessária a presença do parasito para induzir a inflamação no tecido cardíaco (Tarleton *et al.* 1997). Isto foi verificado através de métodos imuno-histoquímicos que caracterizam a presença do parasito em camundongos na fase crônica com inflamação no tecido cardíaco (Ben-Younes-Chennoufi *et al.* 1988) e também em pacientes com cardiopatia chagásica crônica (Higuchi *et al.* 1993, Morrot *et al.* 1997).

Por outro lado, devido à observação durante a fase crônica da falta de correlação entre a intensidade das lesões inflamatórias no tecido cardíaco e a escassez do parasito, tem sido proposto por vários autores que a doença, nessa fase seria decorrente de um processo autoimune (Köberle 1968, Santos-Buch & Teixeira 1974, Hudson & Hindmarsh 1985, Petry & Eisen 1989, Ribeiro dos Santos *et al.* 1992, Cunha-Neto *et al.* 1996, revisto por Kierszenbaum 1999).

Foi ainda, aventado por Ribeiro dos Santos & Hudson (1980 a, b), que nos primeiros dias pós-infecção, antígenos do parasito seriam liberados e sensibilizariam as células tornando-as alvo para a resposta imune. Em conseqüência disto elas seriam destruídas, liberando autoantígenos e ocasionando uma reação autoimune. A adsorção de antígenos foi comprovada *in vitro* (Ribeiro dos Santos & Hudson 1980a, b, Araújo 1985) verificando-se que fibras musculares e neurônios são passíveis de sensibilização por antígenos do parasito ou por frações microssomais deste, sendo estas células lisadas por linfócitos ou granulócitos dos tipos eosinófilos e neutrófilos na dependência da resposta imune (Ribeiro dos Santos & Hudson 1980b, Kuhn & Mumane 1977). Ainda, segundo Hudson & Hindmarsh (1985), também ocorre uma reação cruzada entre epítomos antigênicos do parasito e células cardíacas, o que poderia desencadear a ativação de linfócitos T autoreativos na infecção. A reação cruzada, entre antígenos do

parasito e antígenos do hospedeiro (mimetismo molecular), levaria à autoimunidade (revisto por Kalil & Cunha-Neto 1996).

A autoreatividade contra timócitos foi relatada no modelo murino, através de anticorpos que reconhecem cruzadamente antígenos de *T. cruzi* (Savino et al. 1990) sugerindo a ocorrência do mimetismo molecular entre epítomos do parasito e componentes do hospedeiro. Também, a favor desta hipótese, Silva *et al.* (em preparação) mostraram que camundongos C3H/He infectados com a cepa Colombiana (Federici *et al.* 1964), têm anticorpos que reconhecem a proteína da mielina (MBP), estando a presença destes correlacionada à existência de lesões no sistema nervoso central, e esta reatividade contra a MBP é absorvida pela incubação prévia do soro com antígenos do parasito. Também, tem sido relatada, na doença de Chagas na fase crônica, a ocorrência de eventos autoimunes por reação cruzada contra os antígenos do *T. cruzi*, afetando vários tecidos do hospedeiro (revisto por Kierszenbaum 1999).

Ainda, em elegante experimento, Ribeiro dos Santos *et al.* (1992) propuseram uma teoria que corrobora a autoimunidade, quando mostraram que corações de camundongos recém-nascidos transplantados para a orelha de camundongos isogênicos normais permanecem viáveis durante longo tempo. Contudo, estes enxertos são rejeitados se o receptor estiver na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*. As células efectoras foram caracterizadas como células TCD4+, enquanto células TCD8+ não participam do processo de rejeição.

Por outro lado, Tarleton *et al.* (1997), obtiveram resultados discordantes, demonstrando que a presença dos antígenos do parasito é necessária e suficiente para que ocorra a inflamação. Além disso, há na literatura outras evidências que reforçam esta observação. Assim, segundo Higuchi *et al.* (1993), a inflamação está relacionada com a presença do *T. cruzi* no hospedeiro e a resposta imune por ele desencadeada. A presença do parasito e seus antígenos foram demonstrados através da introdução de novas técnicas como PCR (Jones *et al.* 1993) e imunohistoquímica (Higuchi *et al.* 1993). Utilizando esta última, foram detectados antígenos de *T. cruzi* em corações de pacientes que morreram de insuficiência

cardíaca. Assim, examinando-se apenas uma seção do septo em 28 corações destes pacientes, 58% das seções mostraram-se positivas para a presença de antígenos verificando-se que havia associação entre a presença (não quantitativamente relacionada) de antígenos de *T. cruzi* e um infiltrado inflamatório moderado ou severo. Este fato favorece a idéia que a presença de antígenos de *T. cruzi* está relacionada à inflamação miocárdica (Higuchi *et al.* 1993).

Ainda, segundo Tarleton *et al.* (1997), é o controle imunológico da carga parasitária nos tecidos que gera os mecanismos da lesão tecidual progressiva. Estes fatos reforçam, que os antígenos de *T. cruzi* têm papel fundamental no desenvolvimento da miocardite crônica. Também, segundo Andrade (1999), parece que a miocardite na fase crônica da doença de Chagas é a resultante da resposta imune do hospedeiro contra o parasito e seus antígenos.

Há na literatura (Andrade 1999), relatos da detecção de alterações causadas na matriz extracelular (ECM) através de fatores liberados pelo parasito. Ainda, segundo Higuchi (1999), as alterações na matriz extracelular são diferentes na cardiopatia chagásica e na idiopática. Na primeira existe uma densa acumulação de colágeno extracelular envolvendo cada fibra ou grupo de fibras miocárdicas, alterações da ECM, enquanto na segunda as principais alterações são as rupturas das conexões laterais. A hipótese de atuação de enzimas do *T. cruzi* na matriz do tecido conjuntivo do hospedeiro é sugerida através de relatos de alterações e perdas da ECM que foram detectadas por Factor *et al.* (1993), no átrio e ventrículo do coração em camundongos, na fase aguda da doença.

Também em camundongos infectados pelo *T. cruzi* foi verificado um aumento de expressão da fibronectina e laminina na fase aguda, e na fase crônica foi vista a participação de colágenos tipo I e III, mas principalmente, foi detectado aumento da expressão de fibronectina e colágeno tipo IV (Andrade 1989). Foi observada correlação entre esta modulação de ECM e a presença de células inflamatórias (revisto por Andrade 1999).

Ainda, em estudos com a cisteína proteinase, enzima do *T. cruzi*, que é expressa em maior quantidade nas formas amastigotas (Tomas & Kelly 1996) foi aventado

que estas, uma vez liberadas nos espaços intersticiais, podem degradar a ECM adjacente, através desta enzima. Recentemente, depósitos deste antígeno associado à ECM, foram identificados em áreas de inflamação do miocárdio em pacientes com cardiomiopatia severa crônica (Morrot *et al.* 1997) e em camundongos, infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (Lannes-Vieira, J & Roffé, E, dados não publicados). Estes dados sugerem que esta enzima poderia interferir nas interações entre a matriz extracelular e citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios na ativação de células T (Gillat *et al.* 1996).

Segundo Andrade (1999) os principais aspectos da patogênese não são bem entendidos e alguns achados patológicos sugerem a participação de fatores imunológicos nas lesões inflamatórias, e estas lesões no miocárdio não estariam diretamente relacionadas com a presença do parasito, independentemente do estágio da doença. Ainda, segundo o autor, na doença de Chagas ocorreriam diferenças na gênese do processo inflamatório. Assim, a inflamação focal seria mediada pelo parasito, através de sua penetração, multiplicação e rompimento das células infectadas, já a inflamação difusa não estaria relacionada com o parasito e ocorreria tanto na cardite da fase aguda como crônica, enquanto que uma inflamação branda focal seria a característica da forma indeterminada, nesta doença.

Concluindo, embora os mecanismos de desenvolvimento da patogênese na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* permaneçam ainda obscuros (Andrade 1999), atualmente é aceito que as lesões encontradas na fase crônica da doença de Chagas estejam relacionadas à persistência do parasito e seus antígenos no hospedeiro. Contudo, com base tanto nos estudos de modelos experimentais como de pacientes, não se pode descartar o papel da autoimunidade nesta doença através de mecanismos efetores como anticorpos e células T específicos para os antígenos do hospedeiro.

O conhecimento dos aspectos imunológicos e inflamatórios, que levam às diferentes formas clínicas e os mecanismos responsáveis pelas formas graves, poderiam permitir um tratamento eficaz, através da modulação destes mecanismos.

Deste modo, torna-se extremamente importante o estudo do papel dos antígenos do *T. cruzi* na patogênese da inflamação crônica. Neste trabalho nos propomos a investigar a natureza dos antígenos liberados por formas tripomastigotas e as possíveis conseqüências biológicas de sua interação com as células do hospedeiro.

Caracterização do *T. cruzi*

A diversidade das manifestações clínicas observadas na infecção pelo *T. cruzi* parece estar relacionada a diferentes fatores ambientais e genéticos, inerentes tanto ao hospedeiro como ao parasito, que atuam nesta interação.

Uma vez que têm sido observadas no *T. cruzi* diferenças de morfologia, virulência, patogenicidade e resistência a drogas, vários critérios têm sido utilizados visando à classificação do parasito. Primeiramente, foram observadas por Chagas (1909), as diferenças morfológicas entre as formas sangüíneas do *T. cruzi*. Por outro lado, Nussenzweig *et al.* (1963) utilizaram parâmetros imunológicos para diferenciar as cepas enquanto Brener (1973) discutiu o papel das formas finas e largas entre diferentes cepas do parasito.

O termo cepa tem sido designado para descrever um isolado dos parasitos obtidos a partir de um hospedeiro e não pode ser considerado como um táxon. Ainda assim, este termo tem sido amplamente utilizado pelos pesquisadores e os estudos realizados entre as diferentes cepas, têm acrescentado várias informações sobre o parasito (Nussenzweig *et al.* 1963, Andrade 1974, Plata *et al.* 1984, Morgado *et al.* 1985). Também foi verificada a possibilidade de heterogeneidade dentro das cepas e foi testada a probabilidade de isolar seletivamente clones e cepas (Macedo & Pena 1998, Gonçalves *et al.* 1984, Deane *et al.* 1984). Assim, a heterogeneidade tanto fenotípica como genotípica do parasito, observada nos diferentes isolados, tem sido amplamente estudada. Esta heterogeneidade é resultante principalmente de um método de propagação assexuada, clonal e tem sido proposto que mutações foram se acumulando nas diferentes subpopulações (Tybayrenc *et al.* 1990). Além disso, Carrasco *et al.* (1996) sugere ainda, a ocorrência de intercambio genético durante a transmissão silvestre do *T. cruzi*, o que também contribuiria para a diversidade fenotípica e genotípica do parasito.

A heterogeneidade genética tem sido confirmada através da análise da distribuição dos marcadores polimórficos, tendo sido detectada através de métodos biológicos, fisiológicos e bioquímicos. Através destes últimos, com a análise de ADN (do cinetoplasto) digerido com enzimas de restrição e a análise do perfil de isoenzimas, as várias cepas *T. cruzi* têm sido agrupadas em esquizodemas (Morel et al. 1980) e zimodemas, respectivamente (Miles et al. 1977, 1978, Barret et al. 1980).

Por outro lado, quando foram utilizados marcadores nucleares dimórficos, derivados de sequências gênicas conservadas, situadas no espaçador intergenico do mini-exon do ribossoma (rARN), foram definidas 2 ramificações principais no *Trypanosoma cruzi*, que foram denominadas linhagem 1 e linhagem 2 (Souto et al. 1996).

Em 1999, no Simpósio Internacional Comemorativo do Centenário da Descoberta da Doença de Chagas, no Rio de Janeiro, estabeleceu-se a divisão do *T. cruzi* em 2 grupos: - o *T. cruzi* do grupo I (ou *T. cruzi* I) correspondendo ao Zimodema 1 (Miles et al 1977, 1978), linhagem 2 (Souto et al. 1996) grupo 1 (Tybaryenc 1995), tipo III (Andrade 1974) e Ribodema II/III (Clark & Pung 1994); e - o *T. cruzi* do grupo 2 (ou *T. cruzi* II) corresponderia ao Zimodema 2 (Miles 1977, 1978), Zimodema A (Romanha et al. 1979) linhagem 1 (Souto et al. 1996), grupo 2 (Tybayrenc 1995), tipo II (Andrade 1974) e Ribodema I (Clark & Pung 1994). Contudo, algumas cepas que ainda não foram corretamente caracterizadas ou aquelas com características híbridas, não foram enquadradas nestes 2 grupos

Assim, diante da grande heterogeneidade que tem sido observada nos isolados de *T. cruzi*, ocorrem várias implicações epidemiológicas. Porém, a correlação entre as cepas, a variabilidade genética dos clones do *T. cruzi*, (revisto por Momen, 1999) e a morbidade da doença de Chagas, são ainda tentativas desafiadoras.

Resposta Imune na infecção pelo *T. cruzi*

Após a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, estabelece-se a fase crônica. A inflamação focal aguda evolui para uma fase crônica que é geralmente assintomática. A replicação dos parasitos está na dependência da inter-relação com

o sistema imune do hospedeiro. Este controla a infecção pelo *T. cruzi* no vertebrado e envolve múltiplos mecanismos efetores (Tarleton, 1997) tanto da imunidade inata quanto da adquirida. Os mecanismos que atuam, nesta fase, são principalmente os anticorpos, macrófagos, complemento, e os linfócitos T CD8+ citotóxicos que são ativados por linfócitos Th1 CD4+ (Kumar & Tarleton, 1998, Gazzinelli *et al.* 1998).

Durante a evolução da doença causada pela infecção com o *T. cruzi*, são produzidos no hospedeiro, anticorpos com predominância específica de algumas classes. Assim, na fase aguda da doença são produzidos anticorpos principalmente da classe IgM e há alguns relatos também de aumento dos níveis de anticorpos da classe IgA nesta fase (Lorca *et al.* 1995, Umezawa *et al.* 1996a). Os anticorpos da classe IgG são produzidos durante todas as fases da infecção (Primavera *et al.* 1988, Matsumoto *et al.* 1993), predominando na fase crônica (Umezawa & Silveira 1999). Também, têm sido descritos os anticorpos líticos associados à proteção (Krettli & Brener 1982). Em humanos, estes anticorpos foram caracterizados no isotipo IgG, subclasses IgG1 e IgG2 (Romeiro *et al.* 1984).

No modelo murino foi relatado que a quantidade de imunoglobulinas da classe IgG aumenta ao longo da infecção com o *T. cruzi*. Assim, foi detectado que a quantidade de anticorpos IgG na fase crônica foi 4 vezes maior do que na fase aguda. Também foi observado que, em camundongos as subclasses IgG1 e IgG2 tiveram desempenho semelhante na eliminação do *T. cruzi in vivo* (Brodskyin *et al.* 1989).

Ainda, na doença de Chagas, há relatos de tentativas de associação entre as formas clínicas da fase crônica com as classes de anticorpos produzidos. Assim, Ferreira *et al.* (1983) observaram que pacientes com a forma digestiva apresentavam níveis aumentados de IgA no soro em relação aos pacientes com a forma cardíaca. Também, Primavera *et al.* (1988) através de imunofluorescência indireta, utilizando formas amastigotas detectaram anticorpos da classe IgA em 23 dos 25 pacientes com doença de Chagas manifestando a forma digestiva. Posteriormente, Primavera *et al.* (1990) confirmaram a detecção de IgA em

associação com as formas digestivas e também em pacientes na fase aguda da doença, tendo sido, ainda, detectados anticorpos da classe IgM nesta fase.

Por outro lado, Matsumoto *et al.* (1993) não observaram correlação entre as formas clínicas com os títulos ou classes específicas de anticorpos e detectaram também IgA em 60% dos pacientes na fase aguda. Estes diferentes resultados podem estar relacionados às diferenças metodológicas de obtenção dos antígenos utilizados (amastigotas).

Ainda, tentando correlacionar o perfil dos anticorpos produzidos com as diferentes manifestações clínicas ao longo da infecção, foi também verificado em pacientes com envolvimento gastro intestinal, níveis aumentados de IgA e em pacientes com cardiopatia chagásica foram detectados altos títulos de IgM (Morgan 1996). Ainda, em pacientes que foram a óbito foram observados níveis aumentados de IgE em fluído de pericárdio sendo também sugerida a participação de IL-4 no processo. Foi também observado que os pacientes com a forma cardíaca e digestiva têm anticorpos IgG2 (Mineo *et al.* 1996).

Há, ainda, indícios que os anticorpos anti-*T. cruzi* têm diferenças de reatividade em pacientes com diferentes formas clínicas. Assim, através de "Western blotting", foi detectado, que anticorpos da subclasse IgG3, dos pacientes com a forma digestiva, ligam-se a um antígeno de 68 kDa de massa molecular, enquanto que a maioria dos pacientes com a forma cardíaca não reconhece este antígeno (Morgan *et al.* 1998).

Os resultados de estudos experimentais mostram que os anticorpos na doença de Chagas têm papel importante tanto na fase aguda como crônica mantendo baixos os níveis de parasitemia. Contudo, a resistência ao *T. cruzi* é dependente de múltiplos mecanismos ainda obscuros tanto da imunidade inata como adquirida, e é provável que as citocinas tenham papel importante na imuno-regulação.

Citocinas em Doença de Chagas

A resposta imune contra agentes patogênicos pode gerar efeitos imunopatológicos adversos ou indesejáveis como febre, lesões teciduais e formação de complexos imunes. O balanço entre a resistência e a patologia é dependente da patogenicidade do parasito e da imunidade do hospedeiro. Neste particular, as citocinas, principalmente àquelas associadas às subpopulações Th1/Th2 das células CD4+ e às Tc1 Tc2 das células CD8+, são fundamentais na determinação da evolução da doença. Usualmente, agentes infecciosos intracelulares como bactérias e protozoários, estimulam e são controlados por respostas do tipo Th1 (Sher *et al.* 1998). Vários estudos utilizando animais em infecção experimental têm contribuído para o conhecimento do papel das citocinas na imunidade da doença de Chagas. Estas têm papéis chave na regulação da replicação do parasito e no controle da resposta imune do hospedeiro, além de atuarem também na inflamação. A importância da imunidade mediada por células, na infecção pelo *T. cruzi*, tem sido demonstrada tanto em humanos como na infecção experimental e é exemplificada pela observação do aumento intenso do parasitismo quando ocorre imunossupressão (SIDA, ciclofosfamida e radioterapia) (Gazzinelli *et al.* 1998, Stolf *et al.* 1987, Rocha *et al.* 1994). A ocorrência de miocardite e meningoencefalite, em pacientes infectados pelo *T. cruzi* e o vírus da imunodeficiência humana (HIV+), tem sido interpretada como sendo causada por reativação da infecção crônica (Sartori *et al.* 1998).

Na infecção pelo *T. cruzi* as subpopulações de células CD4+ e CD8+ atuam através de diferentes mecanismos podendo controlar o crescimento do parasito. Destas, as células CD8+ desempenham um papel importante, uma vez que a maioria das células infectadas por este parasito, não é de macrófagos e nem de células com antígeno de MHC de classe II (Kumar & Tarleton 1998). As citocinas produzidas pelas células CD8+ limitam significativamente a replicação intracelular do *T. cruzi*, porém não controlam completamente a infecção em camundongos (Kumar & Tarleton 1998).

Foi observado que as citocinas associadas com uma resposta de células CD4+ de tipo Th1, que pode ser estimulada pela administração de interleucina (IL) -12 com produção de interferon (IFN)- γ , IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF)- α , resultam em menores níveis de parasitemia e levam à proteção do animal (Gazzinelli *et al.* 1993, Abrahamson *et al.* 1996, Cardillo *et al.* 1996, Aliberti *et al.* 1996). IFN- γ parece ser a citocina chave na ativação da função efetora de macrófagos além de ser o principal mecanismo, responsável por controlar a replicação do *T. cruzi* e a disseminação dentro dos tecidos do hospedeiro vertebrado na fase aguda da infecção. As células NK são a maior fonte de IFN- γ durante a infecção inicial com o *T. cruzi* embora as células CD4+ e CD8+ também contribuam com sua síntese nesta fase.

Ainda, segundo McCabe *et al.* (1991) e Torrico *et al.* (1991), o tratamento de camundongos com anticorpos neutralizantes anti-IFN- γ resulta em aumento do parasitismo, enquanto que o tratamento com anti-IL-4 resulta num melhor controle da infecção. O IFN- γ reverte a imunossupressão inespecífica, que é observada na infecção pelo *T. cruzi* (Reed 1988), e tem sido associado com a resistência durante a fase aguda na infecção experimental. Verificou-se que, enquanto o tratamento com IFN- γ protege os animais, a sua neutralização aumenta a susceptibilidade durante a fase aguda. Ele induz a ativação do macrófago através da estimulação da secreção do TNF- α e ativação do óxido nítrico sintase (Nathan & Hibbs, 1991, Aliberti *et al.* 1996, Vespa *et al.* 1994) ou pela baixa regulação de diferenciação de Th2 levando a um decréscimo nos níveis de IL-10, secretada. Segundo McCabe *et al.* (1991), IL-12 é o mediador da resistência à infecção, pelo *T. cruzi* em camundongos. O tratamento com IL-12 nestes animais foi correlacionado com aumento dos níveis de IFN- γ e TNF α . Parece que o efeito destas citocinas seria o de amplificar a produção de óxido nítrico na morte do parasito. A apoptose de células CD4+ induzida por altos níveis de óxido nítrico produzido por macrófagos ativados, parece ser um importante mecanismo imuno-regulatório agindo durante a fase aguda da doença. A importância das funções imuno-regulatórias do óxido nítrico, assim como o controle do parasito, foi revelada em estudos usando

camundongos nocaute (KO) para óxido nítrico-sintase indutível (iNOS), enzima que catalisa a produção de óxido nítrico (James 1995). Animais infectados com *T. cruzi* e tratados com inibidores de iNOS são incapazes de controlar a parasitemia e mortalidade quando comparados com animais controle (Vespa *et al.* 1994). Além disso, Venturini *et al.* (2000) relatam que o óxido nítrico pode inibir a cruzipaina.

Na fase aguda experimental, em camundongos, a resposta celular parece ser a mais importante e posteriormente a resposta humoral (Tarleton 1997, Trischmann 1983). IL-12 e IFN- γ são citocinas essenciais no estabelecimento da imunidade mediada por Th1 durante a infecção pelo *T. cruzi*. Em camundongos, as citocinas Th1 são induzidas durante a fase aguda e parecem ter um papel importante no controle do *T. cruzi*, induzido por IL-12. Assim, Michailowsky *et al.* (2001) relatam que animais deficientes em IFN- γ e IL-12 têm reativação da infecção com o *T. cruzi*, principalmente no coração e sistema nervoso central respectivamente e, sugerem, que a deficiência de IFN- γ é o principal determinante do sítio de reativação do hospedeiro imunocomprometido. Assim, Michailowsky *et al.* (1999) relatam que animais deficientes em anti-IL-12 têm aumento de mortalidade e exacerbação da parasitemia; enquanto animais deficientes em IL-12 KO têm aumento da mortalidade, da parasitemia e melhora na miocardite (Michailowsky *et al.* 2001).

Ainda, TNF- α e IFN- γ atuam em sinergismo e induzem um estado de ativação microbicida de macrófagos em animais geneticamente resistentes, pelo menos no início da infecção (Munoz-Fernandes *et al.* 1992). Também, tem sido demonstrado que vários microrganismos intracelulares como, por exemplo, o *Toxoplasma gondii* e *T. cruzi* estimulam a síntese de IFN- γ através de células NK (Alberti *et al.* 1996, Sher *et al.* 1993, Cardillo *et al.* 1996).

Por outro lado, os dados quanto ao efeito de IL-4 são controversos. Apesar de relatos que sugerem que IL-4 aumenta a morte dos parasitos através da ativação de macrófagos (Wirth, 1989), segundo Barbosa-de Oliveira *et al.* (1996) e Hoft *et al.* (1993) o aumento da síntese de IL-4 aumenta a susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi*. Ainda, outros investigadores foram incapazes de detectar aumento dos níveis de IL-4 em camundongos susceptíveis (Nabors & Tarleton 1991).

Tarleton *et al.* (2000) relatam que camundongos nocaute (KO) para Stat6 (deficientes em IL-4) têm sua resistência aumentada quando infectados com a cepa Brazil enquanto que camundongos KO para Stat4 (deficientes em IFN- γ) têm aumento de susceptibilidade à infecção. Por outro lado, Abrahamssohm *et al.* (2000), utilizando a cepa Y do *T. cruzi* (Silva & Nussenzweig 1953) em infecção experimental relata que a IL-4 não é importante na susceptibilidade, embora, em conjunto com a IL-10 possa modular a produção de IFN- γ e a resistência. Por outro lado, Michailowsky *et al.* (submetido à publicação), observaram que camundongos IL-4-KO infectados com a cepa Colombiana têm um aumento da sobrevida e diminuição da parasitemia e do parasitismo enquanto que em camundongos IFN-KO diminui a sobrevida e aumenta a parasitemia e o parasitismo.

Os estudos da produção de citocinas, em infiltrado de coração de camundongos infectados experimentalmente, mostraram produção persistente de TNF α , TGF β , IL-11 e IL-6 e ocasionalmente, produção de IFN- γ e IL-10, enquanto IL-2, IL-4 e IL-5 não foram detectadas (Zhang & Tarleton 1996). Por outro lado, Higuchi (1999) relata que a presença de IL-4 no coração está relacionada à presença de antígenos de *T. cruzi*. Também, confirmando estes achados, recentemente Talvani *et al.* (2000) mostraram que camundongos C57Bl/6 infectados com cepa Colombiana (miotrópica) têm aumento de expressão de citocinas IL-10 e IL-4 no coração sendo esta última relacionada à presença do antígeno (Lannes Vieira J, resultados não publicados).

Ainda, foi visto que mononucleares de sangue periférico de indivíduos normais, frente ao *T. cruzi* produzem IL-1, IL-2, IL-5, IL-6 IFN- γ e TNF- α , porém não IL-4 ou IL-10 (Van Voorhis 1992). O estudo de proliferação de células isoladas de sangue periférico (PBMC) de humanos, na fase crônica, mostrou que incubação com homogenatos de antígenos de *T. cruzi* induziu altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-10. No tecido cardíaco de pacientes verifica-se grande quantidade de células CD4+ e CD8+, predominando as células CD8+. Isto também foi evidenciado por Santos *et al.* (2001), detectando-se em estudos experimentais a migração de células CD8+. Entre as citocinas, foi detectado principalmente o IFN- γ , enquanto TNF- α , IL-

2, IL-4 e IL-6 foram detectadas em pequeno número de células (revisto por Dos Reis *et al.* 1997). Na infecção pelo *T. cruzi* a produção de IFN- γ confere proteção e controle da parasitemia enquanto que a IL-4, embora com alguns questionamentos, é sugerido pela maioria dos resultados que sua produção esteja relacionada ao aumento do parasitismo.

Assim, durante a infecção pelo *T. cruzi* são produzidas citocinas Th1/Tc1 e Th2/Tc2, sendo que a regulação da síntese e da função destas ainda permanece obscura (revisto por Dos Reis *et al.* 1997). A resposta imune na doença de Chagas não mostra uma polarização clara no sentido da produção de citocinas do tipo 1 ou tipo 2 (Zhang & Tarleton, 1996; Brener & Gazzinelli, 1997).

Diagnóstico

A alta complexidade antigênica, assim como a variabilidade evolutiva das formas do *T. cruzi* e ainda a prevalência de outros agentes etiológicos, podem dificultar a padronização de testes de referência para diagnóstico, abrangentes para as diferentes áreas endêmicas.

Os métodos de diagnóstico na doença de Chagas têm evoluído muito ao longo destes 92 anos após sua descoberta por Carlos Chagas (1909) e são realizados, através de exames clínicos aliados aos testes laboratoriais padronizados. O diagnóstico laboratorial pode ser feito através de métodos diretos e indiretos, da detecção do parasito ou de seus antígenos, ou através de métodos imunológicos detectando os produtos da resposta imunológica do hospedeiro a esta infecção.

Um dos primeiros métodos utilizados no diagnóstico laboratorial foi o exame direto simples que consiste na detecção do parasito ao microscópio em uma gota de sangue (Chagas 1909) e entre lâmina e lamínula (Brener 1961). Dentre os testes indiretos de detecção do parasito, foi desenvolvido o xenodiagnóstico (Brumpt 1914) utilizando ninfas de *Triatoma*, além do hemocultivo, que é utilizado desde 1950 e foi posteriormente aprimorada por Luz *et al.* (1994), aumentando sua sensibilidade. Um dos inconvenientes destes testes é que, às vezes, precisam ser repetidos exaustivamente até a obtenção de resultado positivo, uma vez que a quantidade de

parasitos detectáveis no sangue (que ocorre principalmente na fase aguda) ainda pode ser influenciada por vários fatores como a medicação empregada e a resposta imune do hospedeiro. Assim, a sensibilidade varia muito: no xenodiagnóstico de 0 a 69% e no hemocultivo de 0 a 97,3% (revisto por Luz 1999). Ainda, como método indireto de detecção do parasito, foi desenvolvido o teste de PCR (reação em cadeia da polimerase), que identifica através de sondas, material genético do parasito no hospedeiro. Embora este teste, a princípio tenha sido considerado de alta sensibilidade, há relatos mostrando divergências quanto à sua eficiência e sensibilidade. Assim, enquanto Ávila *et al.* (1993), Wincker *et al.* (1994) e Silber *et al.* (1997) relatam que obtiveram 96 a 100% de sensibilidade, por outro lado, Brito *et al.* (1995) e Junqueira *et al.* (1996), relatam que foi obtida baixa sensibilidade (53,3 e 59,4%, respectivamente) utilizando-se esta técnica.

Durante a evolução da infecção pelo *T. cruzi* no hospedeiro ocorrem flutuações quantitativas e qualitativas da resposta imune. Assim, visando o acompanhamento e a caracterização desta resposta, diferentes métodos imunológicos têm sido desenvolvidos e aprimorados ao longo do tempo. O primeiro destes, foi o teste de fixação de complemento que foi desenvolvido por Guerreiro & Machado (1913) e inicialmente teve grande importância, porém devido às dificuldades na padronização e estabilidade dos reagentes, foi sendo substituído, embora ainda seja realizado em algumas regiões.

Posteriormente, foram desenvolvidos outros testes sorológicos padronizados como: imunofluorescência (Camargo 1966), hemaglutinação (Cerisola *et al.* 1962, Camargo *et al.* 1973) e ensaio imunoenzimático (ELISA) desenvolvido por Voller *et al.* (1975), sendo este último um dos mais utilizados, tanto em pesquisa como nos “Kits” comerciais. Com a utilização destes testes, a sensibilidade é de 98 a 99% utilizando-se a imunofluorescência indireta e de 99% utilizando-se a reação de ELISA (Cura & Wendel 1994). Além destes, são também utilizados o “Western blot” (Araujo 1986, Morgado *et al.* 1989, Affranchino *et al.* 1989, Teixeira *et al.* 1994, Umezawa *et al.* 1996), a reação de aglutinação (Muniz & Freitas 1944, Peralta *et al.* 1981) e a reação de lise mediada através de anticorpos e complemento

(Kierszenbaum 1976). Esta técnica, considerada como marcador de cura parasitológica (Krettli & Brener 1982), apresenta dificuldades para implantação como teste de rotina em laboratórios de análises clínicas (Pereira *et al.* 1989) e vem sendo aprimorada, sendo utilizada atualmente a análise pela citometria de fluxo (Martins Filho *et al.* 1995).

À semelhança de outras patologias, para o diagnóstico da doença Chagas é fundamental a padronização das técnicas com a produção de reagentes estáveis e minimização das reações cruzadas entre os antígenos do *T. cruzi* e os agentes etiológicos de outras doenças.

No imunodiagnóstico da doença de Chagas, as reações sorológicas que detectam no hospedeiro, anticorpos para o *T. cruzi* são o principal método utilizado. Nestes testes são utilizadas formas tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas ou proteínas e polipeptídeos obtidos a partir destas formas do parasito. Ainda, quando foram utilizadas as três diferentes formas do parasito (epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas), no imunodiagnóstico através de imunofluorescência, foi observado que há diferenças de reatividade destas formas com os soros (Primavera *et al.* 1988, Primavera *et al.* 1990, Matsumoto *et al.* 1993). Deste modo, foi verificado que as formas amastigotas (Primavera *et al.* 1990), apresentaram melhor resolução no imunodiagnóstico da doença de Chagas.

Contudo, mediante a facilidade de obtenção, as formas epimastigotas ou extratos e frações obtidas a partir destas, são os mais utilizados, principalmente nos testes comerciais, apesar de ser relatado por diferentes laboratórios variações nos resultados obtidos com estes antígenos, principalmente na especificidade (Camargo *et al.* 1986). Isto também tem sido observado em vários estudos nos quais se verificou que alguns dos antígenos obtidos de epimastigotas freqüentemente reagem cruzadamente com epítomos de *Leishmania* (Araujo *et al.* 1986, Morgado *et al.* 1989, Chiller *et al.* 1990, Giovanni de Simone *et al.* 1991, revisto por Umezawa & Silveira 1999), apresentando assim menor especificidade.

Também, Oelemann *et al.* (1998) testaram três Kits comerciais produzidos com antígenos obtidos de epimastigotas e obtiveram 93,3 a 100% de especificidade e

97,7 a 100% de sensibilidade, estando estes índices relacionados à origem geográfica dos pacientes e às cepas.

Tentando obter melhores índices de sensibilidade e especificidade, no imunodiagnóstico, têm sido testados antígenos definidos ou semi-purificados do parasito. Assim, Scharfstein *et al.* (1983), isolaram uma glicoproteína de 25 kDa de massa molecular e obtiveram 96,5% de especificidade, Alberti *et al.* (1998) utilizando também esta enzima, a cisteína-proteinase, relatam alta sensibilidade. Carbonetto *et al.* (1990) testaram um antígeno de 52 kDa e obtiveram 100% de especificidade. Ainda, Lemesre *et al.* (1986) utilizando a gp 72 obtiveram 100% de especificidade.

Ainda, através de “Western blot” têm sido detectados polipeptídeos (bandas), com alta especificidade no imunodiagnóstico da doença de Chagas tendo sido demonstrados, inclusive, diferentes padrões de reconhecimento durante as fases da infecção. Assim, Jazin *et al.* (1991) verificaram que os pacientes na fase aguda reconhecem polipeptídeos de 150-200 kDa e 45-55 kDa, enquanto na fase crônica reconhecem os de 160-170 kDa. Também, Umezawa *et al.* (1996) utilizando antígenos liberados por formas tripomastigotas, observaram que os pacientes na fase crônica reconhecem polipeptídeos de 150-160 kDa enquanto os de fase aguda reconhecem os polipeptídeos de 130-200 kDa de massa molecular. Estes antígenos de maior massa molecular, também se mostraram específicos (Afranchino *et al.* 1989, Umezawa *et al.* 1996).

A partir de formas epimastigotas, também têm sido reconhecidas através de “Western blot”, bandas definidas com alta especificidade no imunodiagnóstico da doença de Chagas (Morgado *et al.* 1989, Teixeira *et al.* 1994, Mendes *et al.* 1997).

Com o advento de novas metodologias, como a produção de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos, foram acrescentadas novas perspectivas para o imunodiagnóstico, uma vez que estes apresentam algumas vantagens, como possuir epítomos definidos e poderem ser produzidos em larga escala. Assim, Moncayo & Luquetti (1990) descrevem a utilização de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos com sensibilidade de até 100%. Krieger *et al.* (1992) ao

utilizarem, através de ELISA, dois antígenos recombinantes (originários do flagelo e do citoplasma de epimastigotas de *T. cruzi*) demonstraram 100% de sensibilidade e especificidade, mesmo frente a soros de pacientes com leishmaniose. Ainda, Umezawa & Silveira (1999), utilizando 4 antígenos recombinantes obtiveram sensibilidade de 93,4 a 99%. Também, Oelemann *et al.* (1999) utilizando 7 diferentes antígenos recombinantes obtiveram 99,4% e 98,1% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Deste modo, é sugerido por alguns autores (Krieger *et al.* 1992, Pastini *et al.* 1994, Peralta *et al.* 1994, Umezawa *et al.* 1999, Oelemann *et al.* 1999) que através de combinações de antígenos clonados e ou peptídeos sintéticos, obtenham-se testes de máxima sensibilidade e especificidade na detecção da infecção pelo *T. cruzi* e com abrangência para as diferentes áreas geográficas de distribuição do parasito.

Diante disto, verifica-se a importância de novas pesquisas para obtenção de antígenos semipurificados, purificados e ou peptídeos sintéticos que sejam reconhecidos especificamente por todos os pacientes infectados com o *T. cruzi*.

Tratamento

Apesar da doença de Chagas ter sido descoberta em 1909, os aspectos relacionados com seu controle e tratamento ainda carecem de muita investigação, uma vez que os quimioterápicos utilizados no tratamento desta doença, foram desenvolvidos há algumas décadas e apresentam limitações na eficácia além de serem altamente tóxicos. As companhias farmacêuticas não têm interesse na fabricação de novos medicamentos devido aos altos custos do desenvolvimento dessas drogas. Além disso, as limitações no tratamento também se devem à heterogeneidade populacional do *T. cruzi*, detectada através de marcadores moleculares, tendo sido inclusive detectadas cepas híbridas, dificultando a associação entre a estrutura genética do *T. cruzi* e as formas clínicas da doença (revisto por Momen, 1999). Assim, o estudo de populações de várias procedências mostrou grande variação entre as cepas, com diferenças nas características

biológicas, imunológicas, bioquímicas e farmacológicas (revisito por Murta & Romanha, 1999).

Também, a resistência à quimioterapia é relacionada com as características biológicas das cepas do parasito, uma vez que há relatos de cepas resistentes ao tratamento como as do tipo III, como a colombiana (Andrade *et al.* 1985, 1992). Deste modo, alguns resultados discrepantes obtidos entre os vários laboratórios podem ser devido à presença de diferentes cepas.

Atualmente, são utilizados no tratamento da doença de Chagas, principalmente o nifurtimox e o benznidazole que agem por diferentes mecanismos contra o *T. cruzi*. Estes medicamentos são prescritos principalmente na fase aguda da doença. Os resultados, da aplicação de tratamento com estas drogas, são relatados por Amato-Neto (1999), tendo sido obtidas diferentes percentagens de cura parasitológica, dependendo da evolução da doença. Assim, nos pacientes tratados na fase aguda, 70% foram curadas, os da fase crônica recente, 60%, e, quando o tratamento foi administrado aos pacientes de fase crônica tardia, foram obtidos 20% de cura. Estes percentuais foram obtidos, através de testes sorológicos como ELISA, fixação de complemento, hemaglutinação e imunofluorescência, além de repetidos xenodiagnósticos.

Em estudos experimentais, verificou-se que a maioria das cepas do *T. cruzi* testadas, apresenta diferenças variadas tanto na resistência como na susceptibilidade a estes compostos (Filardi *et al.* 198, Moncada *et al.* 1989). Assim, Toledo *et al.* (1997), utilizando o benznidazole, pesquisaram o tratamento de camundongos na fase aguda da doença de Chagas, infectados com 18 diferentes cepas do *T. cruzi*. Os resultados mostraram uma grande variação na susceptibilidade e resistência ao benznidazole, sendo obtidos índices de cura de 40 a 100% entre as cepas analisadas. Esta variação foi observada tanto em cepas isoladas do ciclo silvestre como àquelas do ciclo doméstico.

Além disso, Murta *et al.* (1998) relata que de 45 cepas estudadas, originárias de diferentes áreas do Brasil, 19 destas, pertencentes ao Zimodema B, são

naturalmente susceptíveis ao benznidazole e nifurtimox. A presença destas ocorreu predominantemente em áreas geográficas onde o tratamento clínico da doença de Chagas tem sido mais efetivo.

Segundo Andrade *et al.* (1991) a quimioterapia, em infecções experimentais, reduz a parasitemia levando à reversão das lesões fibróticas no coração. Por outro lado, em pacientes, na fase crônica da doença, que foram tratados com benznidazol, embora seja observada uma redução de alterações eletrocardiográficas e melhora na condição clínica, não foi detectada cura parasitológica (Viotti *et al.* 1994).

No controle da infecção pelo *T. cruzi*, também têm sido testados inibidores da biossíntese de esteróis, utilizados no tratamento de fungos e leveduras. Enquanto McCabe (1988) e Brener *et al.* (1993) observaram que o ketaconazole e itraconazole não erradicam o *T. cruzi* tanto em animais como em humanos; por outro lado, Apt *et al.* (1998) relatam que mais de 50% dos pacientes foram curados parasitologicamente com a utilização de itraconazole.

Ainda, Urbina *et al.* (1998) obtiveram resultados promissores no tratamento da infecção da fase crônica, em camundongos, utilizando um composto quimioterápico antifúngico (triazole), com melhores resultados que aqueles obtidos com o ketaconazole e itraconazole. Porém, o triazole ainda não foi testado em humanos.

Assim, embora tenha sido demonstrada, em trabalhos recentes, a eficácia da intervenção quimioterápica em modelos experimentais, tanto na fase aguda como crônica, a sua aplicação em humanos ainda requer investigação.

Diante disto, novas abordagens no tratamento de doenças parasitárias humanas e especialmente na doença de Chagas devem ser enfocadas.

Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas (proteases) são divididas em endopeptidases (proteínases) e exopeptidases. As endopeptidases são enzimas que catalizam a hidrólise de ligações peptídicas internas das cadeias polipeptídicas. Proteases que

catalisam a clivagem de um ou mais amino-ácidos (aas) da região amino ou carboxi-terminal extremo da proteína são denominadas amino ou carboxi-peptidases respectivamente, dependendo de qual resíduo de amino-ácido terminal da molécula de substrato é liberado. As proteinases representam a classe majoritária de enzimas, uma vez que contêm uma grande variedade de mecanismos de ação e especificidade. Estas variações na especificidade do substrato de proteases são importantes, pois refletem a função das mesmas (Barret *et al.* 1986, McKerrow *et al.* 1993).

Substratos peptídicos são usados para mapear a especificidade dos sítios de ligação destas enzimas. Assim, convencionou-se denominar os resíduos de amino-ácidos do lado amino-terminal clivado de P₁, P₂, P₃...P_n, e os aas do resíduo do lado carboxi-terminal de P₁', P₂', P₃'...P_n' (Barret *et al.* 1986). A presença de determinados aas no centro catalítico destas enzimas e o uso de inibidores são importantes ferramentas para classificarem as proteinases em quatro grandes grupos mecanísticos: serino-proteinases cisteíno-proteinases metalo-proteinases e aspártico-proteinases.

As serino-proteinases contêm um resíduo de serina no seu centro ativo e são inibidas por disulfopropil fosfluoratos e outros organofosforados. Estas proteinases constituem a maior família das enzimas proteolíticas. Apresentam um aa serina no sítio ativo cujo grupamento hidroxil está envolvido na ligação e catálise do substrato, além dos aas aspártico e histidina. A posição que estes resíduos de aas ocupam nos permite subdividi-las em serino-proteinase I e II. No primeiro caso destacam-se as enzimas do grupo das quimiotripsinas (tripsina, elastases, kaliceína pancreática) que apresentam os resíduos de Asp¹⁰² Ser¹⁹⁵ His⁵⁷ e no sítio ativo. No grupo II destas enzimas, destaca-se a subtilisina, que apresenta os mesmos resíduos de aas em posições diferentes: Asp³², Ser²²¹ e His⁶⁴ (Neurath 1989, McKerrow 1993).

Nas cisteínas (ou thiol proteinases) o grupo thiol do aminoácido cisteína é similar àquele das serina-proteases. As thiol-proteinases melhor descritas são as catepsinas (catp) que podem ser subclassificadas em catp. B, catp. H, catp. I, catp.

L, catp. N, catp. S e catp. T (McKerrow 1993). O sítio ativo destas enzimas é constituído pelos resíduos de aas Cys²⁵ His¹⁵⁹ e Asp¹⁵⁸ (Neurath 1989).

Por outro lado, as metalo-proteínases contêm um íon metálico no sítio ativo que desempenha um papel chave na ligação ao substrato, como por exemplo, as collagenases. (McKerrow 1995). Estas enzimas incluem duas famílias: as carboxipeptidases pancreáticas de mamíferos (E.C.3.4.17.1) e as termolisinas de bactérias (EC 3.4.24.4). Finalmente, as aspártico-proteínases (catepsinas D e E, Barret 1986), utilizam duas cadeias laterais de ácido aspártico na catálise. Estas são a classe de enzimas com atividade em pH ácido, entre 2,5 e 4,5 e têm uma estrutura tridimensional (3 D) com 2 resíduos de ácido aspártico no centro ativo (Tang & Wong 1987, Davies 1990).

Proteínases em doenças parasitárias

As doenças parasitárias afetam centenas de milhares de pessoas. Avanços recentes no entendimento da bioquímica e da biologia molecular dos microorganismos têm sido focados principalmente no estudo de moléculas específicas dos parasitos, essenciais ao seu ciclo de vida e à patologia por eles produzida. Neste particular destacam-se as proteínases derivadas dos parasitos. Estas estão implicadas tanto nos processos de diferenciação como também nas inter-relações dos parasitos com os hospedeiros.

As enzimas estão envolvidas em funções essenciais, abrangendo diferentes etapas do ciclo de vida dos parasitos (revisto por McKerrow *et al.* 1993). Dentre suas várias funções elas atuam principalmente (1) na facilitação da invasão do hospedeiro através da degradação de seus tecidos conectivos e proteínas do citoesqueleto, (2) favorecendo o metabolismo do parasito no hospedeiro utilizando as proteínas deste para seu desenvolvimento, (3) atuando na evasão ou modulação da resposta imune através da degradação e ativação das moléculas imunes do hospedeiro, (4) na interação com os sistemas fibrinolíticos ou de coagulação sangüínea, (5) também atuando na remodelagem do parasito durante mudanças do

seu estágio morfológico e, ainda, (6) ativando hormônios, enzimas ou proteínas regulatórias do parasito (revisto por McKerrow *et al.* 1993).

Diferentes tipos de proteases são freqüentemente, expressas em alguns estágios do ciclo de vida do parasito, para favorecer a replicação e a metamorfose. Parasitos intracelulares expressam altos níveis de atividade proteolítica para degradar eficientemente proteínas dos hospedeiros. Em alguns casos, como na infecção pela *Entamoeba histolytica*, as proteases liberadas pelo parasito podem prejudicar as células do hospedeiro e tecidos, contribuindo para a injúria aos tecidos e invasão do parasito (revisto por McKerrow *et al.* 1993)

Diante da importância destas enzimas nos vários organismos, comprovada através de vários estudos, a inibição de proteases é uma metodologia promissora para terapia de doenças infecciosas. Em pesquisas sobre a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), vários inibidores de proteases têm sido sintetizados e alguns outros estão sendo investigados clinicamente, como agentes farmacológicos no tratamento da doença (Kay 1985, Kohl *et al.* 1988, Kay & Dunn 1992). Assim, a inibição da atividade das proteinases do HIV parece ser um bom alvo para o controle da replicação do vírus.

Na doença de Chagas os estudos na estrutura e mecanismo catalítico das proteinases do *T. cruzi* podem aumentar nossa habilidade para o desenvolvimento de inibidores e terapia efetiva (McKerrow *et al.* 1995). Várias proteinases têm sido detectadas em *T. cruzi* como serino-proteinases, (Bongertz *et al.* 1978, Polgar 1999), peptidase alcalina (Ashal 1990) e metalo-proteinases (Lowndes *et al.* 1996). Contudo, no *T. cruzi*, a cisteína-proteinase é a proteinase com principal atividade (Rangel *et al.* 1981, Bomtempo *et al.* 1984, Scharfstein. 1985, Scharfstein *et al.* 1986, Cazzulo *et al.* 1989, 1990, Murta *et al.* 1990). Além disso, o estudo desta cisteíno-proteinase, glicoproteína GP57/51 designada cruzipaína (Scharfstein *et al.* 1986), também mostrou ser um antígeno promissor, como reagente para imunodiagnóstico na infecção pelo *T. cruzi* (Scharfstein *et al.* 1986) e na detecção de cura parasitológica após quimioterapia (Gazzinelli *et al.* 1993).

A cruzipaína tem preferência por peptídeos semelhantes aos da catepsina L, substratos contendo fenil-alanina e arginina. Recentemente, vários estudos têm acrescentado informações estruturais sobre a cruzipaína e há referências às várias isoformas desta enzima. Sabe-se hoje que são codificadas por diferentes genes (Lima *et al.* 1992, Campella *et al.* 1992, Cazzulo *et al.* 1999). Sua forma é similar à de outros membros da superfamília da papaína, porém sua extensão carboxi-terminal tem sido identificada também em outras cisteínas de tripanosomatídeos, como *T. brucei* (Mottram *et al.* 1989) e *Leishmania sp.* (Mottram *et al.* 1992). Também foi detectada uma glicoproteína de 30 kDa de massa molecular, com atividade de cisteína-proteinase ácida em epimastigotas de *T. cruzi* (Garcia *et al.* 1998).

Dentre as várias funções que têm sido propostas para a cisteína-proteinase, a sua atividade na diferenciação e desenvolvimento do parasito (Bonaldo *et al.* 1991, Meirelles *et al.* 1992, Hart *et al.* 1993) tem sido bem estudada. Ainda, através do uso de inibidores irreversíveis específicos de proteinases têm sido acrescentados conhecimentos sobre a função da cruzipaína. Diferentes grupos mostraram que inibidores específicos são capazes de bloquear a diferenciação das formas do *T. cruzi*. Embora todos os estágios do ciclo do parasito sejam sensíveis à inibição da enzima, alguns são particularmente vulneráveis (Meirelles *et al.* 1992, Hart *et al.* 1993). A inibição da cisteína proteinase gp 51/57 afeta a replicação de epimastigotas e também a transformação de epimastigotas para tripomastigotas, assim como a diferenciação para amastigotas (Meirelles *et al.* 1992, Hart *et al.* 1993).

Uma vez que estas enzimas são predominantemente encontradas em microorganismos infecciosos e são afetadas por inibidores que agem contra a replicação dos parasitos, tornam-se candidatas para o desenho racional de drogas, como alvo para uma nova quimioterapia (McKerrow *et al.* 1995).

Aspártico proteinasas - APs

As APs (EC 3.4.23) são enzimas utilizadas, segundo relatos, mesmo antes da Antigüidade (4000 a.C. - 476 d.C.). Pinturas do Saara no período 5500-2000 a.C. sugerem a utilização destas enzimas no processamento de queijo, e no Egito, no período de 3000 a 2800 a.C., também foram encontradas em restos de queijo. São ainda mencionadas nos textos de hieróglifos, desde os anos 2000 a 500 a.C. Estas enzimas também têm sido utilizadas no Líbano, no processamento de leite para fabricação de queijo, inclusive o de soja, durante a dinastia de Zhou (1028-220 a.C.). Além disso, Homero, o poeta da Grande Comédia, descreve na Odisséia, a produção de queijos por *Cyclops polyphemus* (Szecsi, 1992).

As aspártico proteases fazem parte de um grupo de enzimas proteolíticas que compartilham o mesmo sítio catalítico. Membros desta família são encontrados em diferentes organismos, no homem e outros mamíferos, em plantas, fungos, helmintos, bactérias e em retrovírus. As maiores fontes destas enzimas são encontradas no estômago de mamíferos, nos fungos e leveduras.

APs em mamíferos - A Pepsina é a proteinase predominante produzida no estômago de mamíferos. Grande quantidade desta pró-enzima é encontrada na urina, refletindo a produção pela mucosa. Uma variedade de nomes tem sido dada para o zimogênio: pepsinogênio I, II e III.

A gastricsina é uma proteinase ácida de baixa massa molecular e difere da pepsina em propriedades físico-químicas. A gastricsina encontra-se principalmente no estômago de mamíferos e também em outros tecidos como nas mucosas. Em mamíferos pode ser encontrada nas glândulas cardíacas, nas glândulas prostáticas e também na vesícula seminal do homem e macaco (Richmond *et al.* 1958, Seifer *et al.* 1963). O zimógeno desta enzima, assim como a pepsina, recebe vários nomes: pepsinogênio I e gastricsinogênio, pepsinogênio e progastricsina. Atualmente é denominada progastricsina (Szecsi, 1992).

Estas enzimas de mamíferos desempenham várias funções. Assim, a pepsina (EC 3.4.23.1) e a gastricsina atuam na digestão de outras proteínas, enquanto que a catepsina D (EC 3.4.23.5) está envolvida no processamento de proteínas

precursoras e é chave para a degradação de proteínas intracelulares. Ainda, a renina (EC 3.4.23.15) parece ser importante na regulação da pressão sanguínea (Campbell 1981) e nos processos proteolíticos polirregulatórios, gerando a produção do agente vasopressor angiotensina II.

A Quimosina (Renina, EC 3.4.23.4) encontra-se em bois, porcos e carneiros com atividade de coagulação de leite, no estômago, durante o período neonatal desses animais. Ela cliva a ligação K-caseína, Phe 105 e Met 106 (Foltman 1970, Fox 1988) e é usada na fabricação do queijo (Charazanowska *et al.* 1995).

A catepsina E é encontrada no estômago humano e na membrana de eritrócitos, na medula óssea e nas placas de Peyer do intestino. Esta enzima apresenta uma certa heterogeneidade no seu perfil eletroforético analisada em condições de não redução (90 kDa, 50 kDa e 43 kDa) e em condições de redução (59 kDa e 43 kDa) (Tarasova *et al.* 1995). Além disso, foi constatado que a enzima se apresenta como um dímero ligado por três pontes SH intramoleculares, estando estas também presentes nas aspártico proteinases de mamíferos. A catepsina E atua no processamento de antígenos (Bennet *et al.* 1992), e parece ter um papel como marcador de adenocarcinomas do ducto do pâncreas no homem (Rao-Naik *et al.* 1995).

No passado, todas as aspártico proteinases foram designadas catepsina D. A catepsina D é a principal endopeptidase na maioria das células de várias espécies. Ela existe sob a forma de duas cadeias pesadas com 242 amino-ácidos e 2 cadeias leves com 97 amino-ácidos (Barret *et al.* 1987, Faust *et al.* 1985). Também é sensível a inibidores da família da pepstatina sendo ativada por processamento autoproteolítico em pHs ácidos na faixa de 2,5 a 3,5 (Barret 1987). A catepsina D de macrófagos parece ter um papel no processamento intralisossomal de antígenos (Diment *et al.* 1988, Van North & Jacobs 1994). Estas catepsinas também são importantes como marcadoras de receptores de estrogênio em células neoplásicas de mama (Schultz *et al.* 1994).

A ativação, de uma pré-pró-catepsina do tipo D, de baço de porco, foi descrita por Erickson *et al.* (1981), pela perda de 20 amino-ácidos do amino-terminal da

proteína, assumindo a forma pró-enzima de 46 kDa, com uma quebra posterior para atingir a forma ativa de 30 kDa. Em fígado de rato foram identificadas três isoformas de catepsinas do tipo D. A partir da forma precursora purificada de 43 kDa, chamada pré-catepsina D, identificaram-se as outras duas, uma de 34 kDa e outra forma ativa de 30 kDa (Fujita *et al.* 1991). Além disso, sabe-se que as pró-partes intactas de pró-catepsina D humana e pepsinogênio de galinha poderiam ser inibitórias entre si. Isto parece ocorrer na maioria das APs sendo este fato dependente do pH (Baldwin *et al.* 1993).

Também, há relatos da participação de APs no processamento de antígenos. Esta etapa da resposta imune dos vertebrados é pré-requisito para a apresentação de antígenos pelas moléculas do principal complexo de histocompatibilidade (MHC). O processo envolve enzimas proteolíticas que vão gerar os peptídeos apresentados pelas moléculas do MHC. Estas enzimas estão no compartimento endossoma-lisossomal e estudos mostram que as catepsinas D, B e E atuam, processando os antígenos (Van Noort & Jacobs 1994). As APs catalisam a proteólise de cadeia I, que uma vez clivada é requerida para a maturação de antígeno de classe II. Os estágios iniciais do processamento da cadeia I ocorrem num compartimento ácido do endossoma, favorável às APs tais como as catepsinas D e E. Há evidências indicando que a clivagem inicial do antígeno pode ser feita pela catepsina D, sugerindo que esta pode ter um papel central na liberação de fragmentos peptídicos durante o processamento intracelular dos imunógenos. Também, *in vitro*, foi observado que a catepsina D clivou a lisozima de ovo de pato (Van Noort & Jacobs 1994).

APs em plantas (EC 3.4. 23. 12-14) - Estas enzimas têm sido purificadas de monocotiledôneas (Sarkkinen *et al.* 1992, dicotiledôneas (Rodrigo *et al.* 1991) e também de gimnospermas (Kervinen *et al.* 1995). As APs de plantas são as mais homólogas às catepsinas D de mamíferos. A especificidade hidrolítica de algumas APs de plantas tem sido determinada usando substratos sintéticos (Faro *et al.* 1995, Kervinen *et al.* 1993) porém pouco é conhecido sobre a função biológica destas

enzimas. Na planta insetívora *Nepenthes* a atividade de APs tem sido encontrada em seu fluído digestivo (Tökes *et al.* 1974). Há relatos que APs também estejam associadas a corpos de armazenamento intracelular de proteínas no cânhamo (Angelo & Ory 1970) e também em cacau. A AP de sementes tem mostrado processar as proteínas *in vitro* de 2S albumina de *Arabidopsis* (D'Hondt *et al.* 1993).

Em grãos da cevada (*Hordeum vulgare*), foi também caracterizada uma AP tendo sido isoladas duas isoformas ativas de 40 e 48 kDa, uma contendo peptídeos de 32 kDa e 16 kDa e outra contendo peptídeos de 29 kDa e de 11 kDa. Segundo Sarkkinen *et al.* (1992), estes resultados indicam que as duas isoformas são derivadas de um único gene, que representaria processos diferenciais do precursor da proteína em grãos de cevada. A seqüência de amino-ácidos sugere que esta enzima está relacionada à catepsina D de mamíferos.

APs em fungos (EC 3.4. 23. 6) – várias enzimas da classe das APs também têm sido descritas em fungos e estas são relevantes na patologia causada por estes ao hospedeiro. Além disso, são de grande aplicabilidade na indústria alimentícia (Pitts *et al.* 1992). As APs de fungos como *Penicillium janthinellum* (EC3.4.23.20), *Rhizopus chinensis* (EC 3.4.23.21), *Endothia parasitica* (EC 3.4.23.22) e *Mucor pusillus* (EC 3.4.23.23), são secretadas e há evidências sugerindo sua ação na patologia da infecção nos hospedeiros. De uma maneira geral as APs de fungos tem massa molecular 35 kDa e pH ótimo de atuação ácido, de 1,5 - 5,0. Este grupo de enzimas são inibidas por compostos contendo grupos epoxi e por sais de diazônio na presença de Cu⁺⁺. Leveduras, como *Candida albicans* e espécies a ela relacionadas são microorganismos comensais que podem tornar-se patogênicos em indivíduos imunodeprimidos e debilitados. A patogenicidade destas leveduras vem sendo relacionada com as APs secretadas pelo microorganismos, uma vez que estas favorecem a penetração na membrana da mucosa do hospedeiro. White *et al.* (1993) descreveram três APs diferentes em *Candida albicans* e segundo Ruchel *et al.* (1992) há várias evidências sugerindo que uma ou mais APs secretadas pela *Candida albicans* contribuam para a habilidade do patógeno colonizar tecidos do hospedeiro, o que levaria à infecção. Este fato também foi corroborado experimentalmente, já que cepas mutantes, deficientes nesta enzima foram menos

letais em camundongos (De Bernardis *et al.* 1990, Ross *et al.* 1990). Além disto, inibidores sintéticos foram capazes de reduzir a adesão de *Candida albicans* a células endoteliais *in vitro*. A pepstatina inibiu a cavitação de corneócitos por *Candida albicans*, *Candida stelfatoide* e *Candida Tropicalis*, além de atenuar a infecção da levedura em camundongos (Ray *et al.* 1988, Zotter *et al.* 1990).

Em fungos filamentosos como o *Aspergillus niger*, foram descritas duas proteinases A e B. Esta última tem propriedades de Aps, com massa molecular em torno de 35 kDa e é inibida por inibidores específicos, tais como pesptatina, diazoacetil D-L-norleucina metil ester (DAN) e 1,2 epoxi 3- p- nitrofenoxi propano (EPNP), sugerindo a sua utilização na terapia anti-fúngica.

As APs também têm grande importância na atividade industrial (Pitts *et al.* 1992). Assim, proteinases obtidas dos microrganismos *Mucor miechei*, *Endothia parasitica*, *Irpes lactis* e *Aspergillus oryzae*, substituem a renina na fabricação de queijo (Arbige *et al.* 1986). A AP de *A. oryzae* tem sido usada na indústria de panificação para melhorar a textura, o sabor e a cor de pães. Além disso, a enzima de *Aspergillus niger* também tem sido usada para tratar a turbidez que se desenvolve em alguns vinhos brancos (Bakalinsky & Boulton 1985).

À semelhança das APs extracelulares de mamíferos, tais como a pepsina que são excretadas como zimogênios e são transformadas em formas ativas por auto-processamento em condições ácidas, as APs de fungos também são transformadas em formas ativas por mecanismos de auto-catálise, a partir de pró-formas inativas sobre condições ácidas. A conversão de zimogênios recombinantes das formas maduras ocorre por mecanismos auto-catalíticos, entretanto os detalhes dos mecanismos de ativação de zimogênios são desconhecidos. Estas Aps, geralmente são secretadas e ativadas fora da célula ou dentro do vacúolo lisossomal em animais (Runeberg-Roos *et al.* 1994), fungos (Tang & Wong 1987) e vírus (Davies 1990).

Segundo Segui-Real *et al.* (1995), a maioria das proteínas residentes no vacúolo de leveduras é transportada pela via secretora. O processo de transporte começa com a saída do peptídeo sinal N-terminal que emerge do ribossomo e sua posterior

inserção na membrana do retículo endoplasmático. Proteínas solúveis e de membrana são então transportadas para o complexo de Golgi, onde muitas delas são modificadas. No *Saccharomyces cerevisiae* foi observado que a AP é sintetizada como um precursor de 61 kDa no citosol.

APs em helmintos - Em *Schistosoma mansoni* foi observada a secreção de proteinases durante seu período de migração no hospedeiro humano. Estas enzimas seriam importantes principalmente para a penetração das cercárias através da pele, assim como também na nutrição e transporte de ovos nos tecidos (McKerrow 1989). Foi verificada em homogeneizado de vermes adultos, a presença de uma enzima que degradou a hemoglobina em pH ácido (Timms & Bueding 1959) e foi também detectada a enzima aspártico proteinase na degradação de hemoglobina em extratos de vermes adultos tanto de *Schistosoma mansoni* como *Schistosoma japonico* (Wong *et al.* 1997).

Em *Taenia solium* foi também descrita a AP, sensível à pesptatina A, com massa molecular em torno de 90 kDa. Esta proteinase parece ser essencial na manutenção do parasito no hospedeiro, na obtenção de nutrientes e também clivando moléculas do sistema imune (White *et al.* 1992).

APs em protozoários - Ainda, em *Plasmodium falciparum* foram caracterizadas APs dentre outras peptidases deste parasito (Rosenthal *et al.* 1989, Hill *et al.* 1994, Gluzman *et al.* 1994, Vander-Jagt *et al.* 1989, 1992, Salas *et al.* 1995, Luker *et al.* 1996). O papel destas enzimas na digestão da hemoglobina foi descrito por vários autores (Goldberg *et al.* 1990, 1991, Gabay & Ginsburg 1993, Gluzman *et al.* 1994, Vander-Jagt *et al.* 1992). Segundo Rosenthal *et al.* (1989) e Rockett *et al.* (1990), estas enzimas poderiam desempenhar papel importante no processo de invasão de merozoítas às hemácias. Foi observado que a inibição de proteinases no plasmódio (Francis *et al.* 1994, Rosenthal *et al.* 1991, Rockett *et al.* 1990) tem uma ação específica neste, anulando o processo de reinvasão (Bailey *et al.* 1992). Estas enzimas atuam na maturação intraeritrocítica do parasito nos diferentes estágios, ocorrendo deste modo, variações no metabolismo e na atividade proteolítica (Goldberg *et al.* 1990, Rosenthal & Meshnick 1996).

APs em bactérias - As APs têm sido caracterizadas em bactérias mesofílicas e termofílicas. As proteinases termofílicas foram estudadas em *Bacillus sp.* O *Bacillus sp* cepa Wp22.A1 produziu uma AP (Toogood *et al.* 1995), com massa molecular de 45 kDa detectada por SDS-PAGE e com ponto isoelétrico (PI) de 3,8. Estas enzimas assim como as aspártico proteinases das bactérias *Xantomonas sp* T 22 e *Pseudomonas sp st.* 101 pertencem a uma sub-classe de AP que não são inibidas por pepstatina A, porém são sensíveis a outros inibidores específicos de APs como, diazoacetil-DL-leucina metil ester (DAN) e 1,2-epoxi 3-p-nitrofenoxi propano (EPNP) (Toogood *et al.* 1995).

APs em retrovírus - As proteinases de retrovírus envolvidas no processamento de polipeptídios também pertencem à classe das APs (Davies 1990). As APs de retrovírus são homodímeros com 120 resíduos de amino-ácidos (aas) em cada cadeia (Weber 1990).

No capsídeo do vírus (HIV-1), da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), foi descrita e caracterizada uma AP, retropepsina (EC 3.4.23.16). Esta constatação foi baseada na homologia da seqüência com cinco APs e também pela comprovação da inibição da enzima pela pepstatina. Além disso, foi constatada a homologia entre a proteinase de HIV após a cristalização, através de sua estrutura tridimensional e outras APs. Esta enzima parece atuar na interiorização do vírus, é importante nos efeitos patológicos do HIV ao organismo e também tem grande importância no imunodiagnóstico. Elas são coadjuvantes no processamento de várias proteínas essenciais para os vírus (Khol *et al.* 1988).

Estrutura das APs

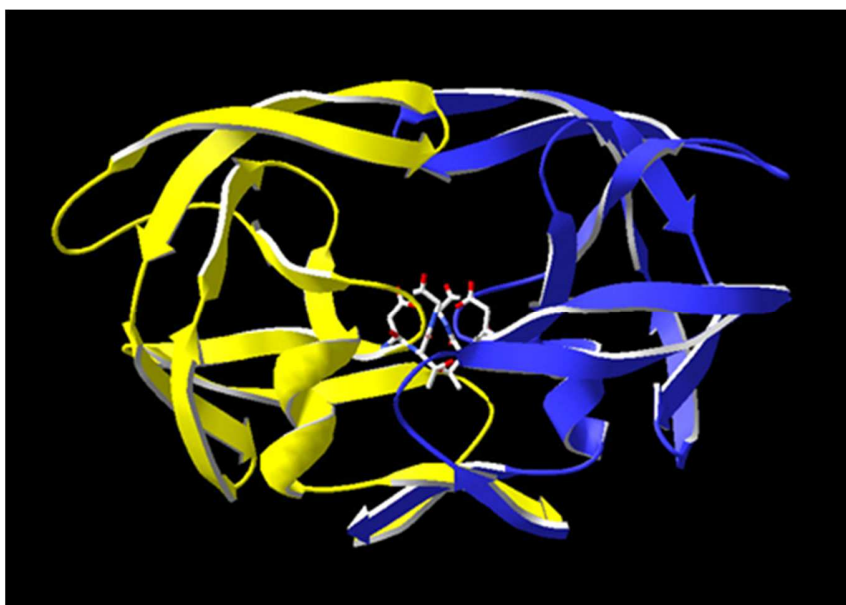
As APs são proteínas globulares e nestas existem algumas regiões na estrutura tridimensional (3D) conservadas, sendo estas posições atômicas características para classificação desta classe de enzimas (Andreeva 1992).

As APs apresentam a estrutura secundária predominantemente com cadeias em fita β , sendo que as cadeias em α hélice estão presentes em pequena quantidade (Davies 1990). Elas são bilobais e apresentam uma fenda de 40 Å perpendicular

ao seu eixo (Pitts *et al.* 1992), que separa os dois domínios. O centro ativo está localizado na fenda, sendo que esta separa os domínios onde é acomodado o substrato, o que equivale a aproximadamente sete a oito resíduos de aas (Schechter & Berger 1967). Os principais resíduos do sítio catalítico são os aas Asp³² e Asp²¹⁵. Na pepsina, estes se encontram no centro onde ocorre a ligação com o substrato e são essenciais na determinação da relação espacial tridimensional. As pontes de hidrogênio estão ligadas ao grupo carbonila e apresentam-se entre 2 domínios interligados por fitas β envolvendo Thr³³, Ser³⁵, Thr²¹⁶, Thr²¹⁸, NHgly²¹⁷, NHgly³⁴ (Veerapandian *et al.* 1990, Cooper *et al.* 1990, Pitts *et al.* 1992), estabilizando assim a estrutura do sítio ativo. Provavelmente, na atuação enzimática ocorre a doação de cargas positivas e negativas. Embora o mecanismo exato ainda não seja conhecido, aventa-se a hipótese que os prótons entre os resíduos Asp³² e Asp²¹⁵ atuariam com um pólo eletrofílico, ou então, ocorreria um ataque nucleofílico à carbonila da ligação peptídica. Na endotiapepsina (EC 3.4.23.6), a estrutura bilobal constitui-se de dois domínios predominantemente do tipo fita β , que estão relacionados com o eixo bidimensional com uma proximidade de duas vezes o eixo dos 170 resíduos. Nesta região, cerca de 65 aas são topologicamente equivalentes quando um lóbulo se sobrepõe ao outro. A estrutura 3D da aspártico-proteinase de *Plasmodium falciparum* também apresenta uma fenda típica bilobal e uma topologia semelhante à das Aps de outras células eucariontes (Davies 1990).

A protease do HIV tem uma estrutura dimérica formada por 2 monómeros de 99 aas que combinados em um homodímero contribuem com o motivo Asp-Thr-Gly formando a cavidade do sítio ativo, como visualizado na figura a seguir.

Estrutura básica de aspártico—proteínase do HIV



Aspártico-protease do HIV. Os monômeros estão coloridos em azul e amarelo. O sítio ativo encontra-se ao centro, acima do assoalho (Silva-Jr & De Simone, 2001).

A especificidade na família das APs é complexa, uma vez que pode envolver numerosas interações entre os átomos das cadeias laterais de amino-ácidos e os átomos do substrato, todos em combinação, interagindo no sítio ativo da enzima (Fusek 1993). Mesmo as menores diferenças na estrutura primária levariam a diferenças na estrutura terciária ocasionando assim alterações marcantes na especificidade dos substratos. Isto foi verificado em várias cepas de *Candida albicans* onde estas modificações das APs secretadas resultaram em diferentes propriedades químicas e, conseqüentemente também na especificidade das enzimas.

Segundo (Andreeva 1992) novas propriedades estruturais destas enzimas têm sido descobertas comparando-se a estrutura tridimensional refinada da pepsina com outras APs. A primeira observação importante é a alta flexibilidade da molécula de pepsina que parece ser uma propriedade comum a esta classe de enzimas.

Mecanismo catalítico das APs

O sítio catalítico das APs é formado pelo dobramento de domínios separados junto com um sítio ou campo ativo da enzima (Tang & Wong 1987). O dobramento da estrutura principal da cadeia peptídica da pepsina suína foi descrito (Andreeva *et al.* 1984) e posteriormente esta enzima foi cristalizada obtendo-se um padrão de difração cristalográfica. Foram também obtidas as estruturas cristalinas de alta resolução da penicilopepsina (James & Sielecki 1983) rhizopuspepsina (Suguna *et al.* 1987, Bott *et al.* 1982), endothiapepsina (Cooper *et al.* 1990), renina humana (Sielecki *et al.* 1989), além de algumas enzimas recombinantes como quimiosina (Gilliland *et al.* 1990). Atualmente já é conhecida também a estrutura da proteinase do HIV (Lapatto *et al.* 1989).

A catálise das APs ocorreria em duas etapas principais: na primeira haveria a polarização do oxigênio do grupo carbonila e na segunda a formação de um pólo eletrofílico formado pelos prótons entre os resíduos Asp³² e Asp²¹⁵, presentes no centro da ligação com o substrato. Pontes de hidrogênio formam-se com o grupo carbonil e a clivagem ocorre na parte final das alças que se estendem ao longo dos dois domínios conservados (D-T/S-G), (Tang & Wong 1987). Neste momento, as moléculas de água são importantes, pois favorecem a união entre os resíduos aspartil e carbonil. Os dois grupos carbonila do centro ativo, com 2,9 Å de distância, estão ligados a uma extensa rede de pontes de hidrogênio. Assim, estes dois grupamentos são mantidos no mesmo plano, através de uma molécula de água. Estas, por sua vez, estão no centro das ligações de hidrogênio e têm uma distância igual a quatro átomos de oxigênio do grupamento carbonila dos ácidos aspárticos. Provavelmente, deve ocorrer a doação de um próton e um elétron, sendo assim ocorre um nivelamento e não se detecta através de difração de raios X a localização exata do próton (Pearl & Blundel 1984). Os prótons entre os resíduos Asp³² e Asp²¹⁵, atuam como um pólo eletrofílico. Poderia também, ocorrer um ataque nucleofílico à carbonila da ligação peptídica. O mecanismo exato da catálise ainda permanece obscuro.

Inibidores de APs

As APs são susceptíveis à inibição pelos pentapeptídeos acetilados, pepstatinas, e por compostos diazocetil. Pepstatina (isovaleril-*L*-valil-statil-*L*-alanil statina) é o maior inibidor de AP. As APs de mamíferos melhor caracterizadas até o presente como a pepsina, quimosina, Catp D e renina, são inibidas pela pepstatina A. Este inibidor é encontrado no filtrado de cultura de várias espécies de *Actinomcyces* (Umezawa *et al.* 1970). Sua estrutura química foi determinada e contém dois resíduos de um amino ácido raro, 4- amino-3- hidróxi-6- metil ácido heptanóico (statina) (Morishima *et al.* 1970).

Além das pepstatinas, outros reagentes podem interagir com o sítio ativo das APs, como os diazo acetilnorleucina metil ester (DAN) e o 1,2 epoxy 3-p-nitrophenoxy propane (EPNP) (Tang 1971). Estes reagem, especificamente com o lado da cadeia carboxil dos dois resíduos ácido-aspárticos equivalentes à posição da Asp³² e Asp²¹⁵, na seqüência linear da pepsina de porco. Destes, o EPNP foi o mais potente, e sabe-se que duas moléculas de EPNP ligam-se covalentemente a cada molécula da enzima inativada (Tang 1971). Quando o EPNP reagiu com a pepsina, esta perdeu toda a atividade. O EPNP também inativou outras APs, como gastricsina e pepsina humanas, assim com a renina bovina.

Recentemente, inibidores específicos contra aspártico proteinases do HIV estão sendo investigados e já vêm sendo utilizados (Kay 1985, Kohl *et al.* 1988, Kay & Dunn 1992). Também na malária, o uso de inibidores como tratamento potencial têm sido aventados (Banyal *et al.* 1981, 1986, Rockett *et al.* 1990, Rosenthal *et al.* 1987, Scheibel *et al.* 1984, Vander Jagt *et al.* 1989). Além disto, Bailly *et al.* (1992) verificaram que inibidores de aspártico e cisteína protease juntos inibiram o crescimento do *Plasmodium*.

Deste modo, pesquisas envolvendo os mecanismos de ação destas moléculas chave no ciclo de vida dos parasitos, podem levar-nos ao desenho de drogas inibitórias específicas como uma metodologia promissora para terapia de doenças infecciosas. Assim, um dos objetivos de nosso trabalho foi o de isolar e caracterizar

proteinases ácidas de formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidas através de coluna de afinidade com a pepstatina A.

Objetivo Geral

O objetivo desta tese foi o de estudar aspectos do imunodiagnóstico, caracterizar antígenos liberados que se ligam a células e sua atividade biológica e, isolar proteinases ácidas do *T. cruzi*.

Objetivos Específicos

- Investigar a presença de anticorpos específicos para o *T. cruzi* em saliva de pacientes com a doença de Chagas na fase crônica.
- Caracterizar antígenos liberados pelo *T. cruzi* e investigar seu efeito biológico em células de mamíferos não-infectadas.
- Isolar, caracterizar proteinases ácidas de *T. cruzi*, assim como investigar a imunogenicidade e antigenicidade destas enzimas.

*Documento 1

Dentro da linha de Imunologia de Mucosa que desenvolvemos em nosso laboratório, padronizamos um ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) para detectar a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em humanos, utilizando a saliva como um fluido alternativo ao soro. Amostras de saliva de 114 indivíduos na fase crônica da doença de Chagas, caracterizados através de três testes sorológicos e avaliação clínica, e de 100 controles saudáveis foram testados para a detecção de anticorpos específicos. Primeiramente, tivemos como objetivo a pesquisa de anticorpos da classe IgA, neste fluido. Contudo, não obtivemos bons níveis de especificidade e sensibilidade (Anexo I). Iniciamos, então a detecção de anticorpos específicos da classe IgG na saliva, como método alternativo à utilização de soro.

Assim, à diluição de $\frac{1}{2}$, anticorpos específicos foram detectados na saliva de 103 das 114 amostras dos pacientes infectados e em 5 dos 100 controles (sensibilidade 90,4%, especificidade 95%). Não encontramos correlação significativa entre o título de anticorpos e a doença cardíaca e ou do trato gastrointestinal. Este ensaio possui algumas vantagens sobre outros métodos em uso, uma vez que a coleta de saliva não é invasiva, não requer equipamento especial e a saliva total fornece resultados reprodutíveis.

Embora, a sorologia permaneça o melhor teste para a detecção da infecção pelo *T. cruzi*, estes resultados sugerem que a detecção de anticorpos IgG específicos na saliva pode ser utilizado como teste diagnóstico de triagem e contribuir para estudos epidemiológicos da infecção crônica pelo *T. cruzi*.

*Artigo publicado:

Pinho RT, Pedrosa RC, Costa-Martins P, Castello-Branco LRR.1999. *Acta Trop* Volume 72, Issue 1, 15: 31–38 [http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X\(98\)00075-](http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X(98)00075-8)

Saliva ELISA: a method for the diagnosis of chronic Chagas disease in endemic areas

R.T. Pinho, R.C. Pedrosa, P. Costa-Martins, L.R.R. Castello-Branco

Acta Tropica Volume 72, Issue 1, 15 January 1999, Pages 31–38

[http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X\(98\)00075-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X(98)00075-8)

Abstract

An indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to saliva to detect chronic infection by *Trypanosoma cruzi* in humans. Saliva samples from 114 Chagas' disease chronically infected individuals, characterized by three serological tests and clinical evaluation and from 100 healthy controls were tested for *T. cruzi* specific IgG antibodies. At dilution of 1 in 2, specific antibodies were detected in saliva samples from 103 of 114 samples from infected patients and 5 of 100 controls (sensitivity 90.4%, specificity 95%). There was no significant correlation between the antibody titre and cardiac or gastrointestinal tract disease. This assay possesses some advantages over other methods as saliva collection is non-invasive, requires no special equipment and whole saliva gave reproducible results. Although serology remains the gold standard for *T. cruzi* infection, these results suggest that *T. cruzi* specific salivary antibody detection may provide a screening diagnostic test and contribute to epidemiological studies of chronic trypanosomiasis infection in endemic areas.

Keywords

Chagas' disease; ELISA; Salivary IgG; *Trypanosoma cruzi*

1. Introduction

Infection with the protozoa *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease, occurs in an estimated 16–18 million persons in Latin America and is the major cause of chronic heart disease in these countries (Moncayo-Medina, 1987). Immunological responses to the *T. cruzi* infection are particularly complex due to the high degree of polymorphism between different *T. cruzi* strains and clones (Nussenzweig et al., 1963, Plata et al., 1984 and Morgado et al., 1985). As a result Chagas' disease manifests a wide diversity of clinical features.

The relevance of *T. cruzi* infection in humans has stimulated research on the detection of parasite antigens and specific antibodies. Moreover, it has been reported that the immune response plays a major role in controlling the course of *T. cruzi* in experimental models and humans. Several *T. cruzi* antigens have been identified and characterized (Schechter et al., 1983, Dragon et al., 1985, Morgado et al., 1985, Scharfstein et al., 1985, Kirchhoff et al., 1987, Ibañez et al., 1988, Affranchino et al., 1989, Hoft et al., 1989, Lafaille et al., 1989, Morgado et al., 1989, Paranhos et al., 1990 and Burns et al., 1992) but a better understanding of the immune response to these molecules is needed.

Many infectious diseases can be diagnosed by the detection of specific immunoglobulins in serum, but blood collection is invasive, time consuming and demands specifically trained personnel. Specific antibodies of different classes have been demonstrated previously in saliva from patients e.g. with bacterial infections (Fallone et al., 1996), acute toxoplasmosis (Hajeer et al., 1994), chronic schistosomiasis (Garcia et al., 1995) and viral infections (Parry et al., 1987, Perry et al., 1993 and Helfand et al., 1996).

In order to investigate the use of salivary specific antibody detection for epidemiological studies of Chagas' disease, we developed a saliva assay to test for specific IgG in a large population of *T. cruzi* infected individuals.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

A total of 114 patients chronically infected with *T. cruzi*, (age range 30–60 years) attending an outpatient clinic for heart diseases at Rio de Janeiro Federal University and 100 healthy controls matched for age and socio-economical status, consented to participation in the study, which had been approved by the Ethical Committee of Federal University of Rio de Janeiro. The diagnosis of Chagas' disease was based on standard serological tests [immunofluorescence, (Camargo, 1966), hemagglutination (Camargo et al., 1973), ELISA (Voller et al., 1975)] and clinical examination. All patients had cardiac dysfunction revealed by detailed examination, including electrocardiography (ECG), 24 h ECG recording, thoracic X-ray, bidimensional Doppler echocardiography, bicycle exercise and cardiopulmonary exercise testing.

2.2. Saliva

Whole saliva was collected in plastic tubes (Falcon Becton Dickson, NJ), centrifuged at 1500×g to remove debris, and supernatant collected for immediate testing or aliquoted and frozen at –20°C for further use.

2.3. *Trypanosoma cruzi* antigen

Epimastigotes of Y strain (Silva and Nussenzweig, 1953) were grown at 28°C in liver infusion tryptose (LIT) medium (Camargo, 1964) by serial passages every 5 to 7 days. They were harvested, washed three times at 1500×g with 150 mM phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4. The pellet was resuspended in PBS with N-tosyl-l-phenylalaninechloromethyl ketone (TPCK) and phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) at a final concentration 1 mM of protease inhibitors. The material was submitted to 10 cycles of freezing and thawing and then separated by ultracentrifugation at 100 000×g for 8 h at 4°C. The supernatant (soluble fraction)

was used in the ELISA. Protein quantitation was performed according to the method of Lowry et al. (1951).

2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

This test was a modification of the method described by Lewis et al. (1991). The concentration of antigen coating was determined in sequential experiments from 6 to 20 µg/ml (data not shown). Analysis of specific antibody titre by ELISA procedures was made on Nunc Microplates (Roskild, Denmark) coated with 100 µl of soluble antigen of *T. cruzi* diluted to 12 µg/ml in 0.05 M of carbonate–bicarbonate buffer pH 9.6 and incubated overnight at 4°C. The unbound antigen was then discarded and wells blocked for 30 min at 37°C with 200 µl of PBS-Tween 0.05 and 10% skimmed milk (blocking solution). After three washings with 200 µl of PBS-Tween 0.05%, 100 µl of saliva samples diluted 1/2, 1/5, 1/10 were added in duplicate. All samples were diluted in blocking solution. Plates were incubated for 3 h at 37°C and washed three times with 200 µl of PBS Tween 0.05%. Bound antibody was detected with 100 µl of alkaline phosphatase conjugated anti-human IgG (Sigma) diluted 1:1000 in blocking solution. After 1 h of incubation plates were washed in PBS tween 0.05% and the reaction developed by the addition of 100 µl of nitrophenyl phosphate tablets (Sigma) diluted in glycine buffer pH 10.4. After incubation at room temperature for 30 min the reaction was stopped by adding 50 µl of 3 M NaOH and absorbance read at 405 nm by a Titertek Multiskan MCC/340 ELISA reader.

3. Results

The results of individual anti-*T. cruzi* specific IgG in saliva at the three dilutions employed for patients and normal controls is shown in Fig. 1. The mean and S.D. for the groups at each dilution is shown in Fig. 2.

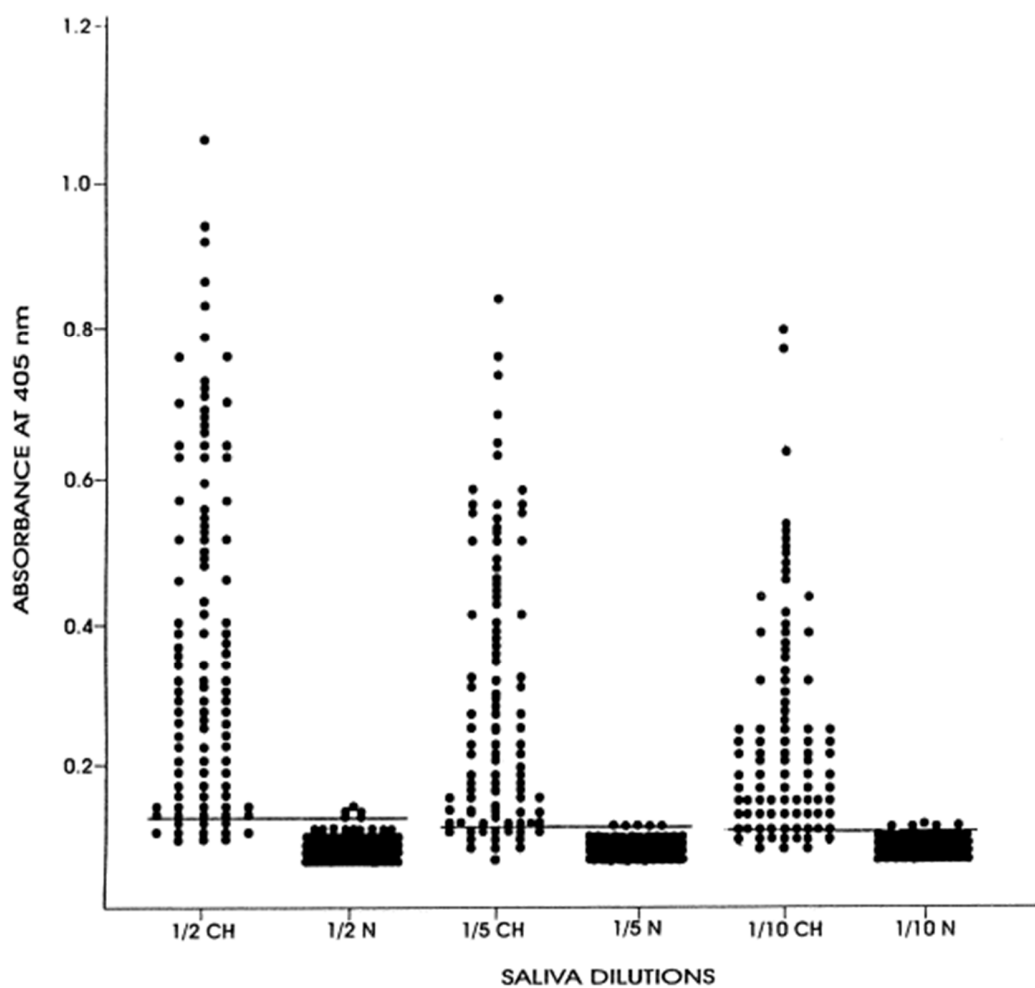


Fig. 1. Saliva IgG response to *T. cruzi* antigen in chronic chagasic patients (CH) and normal controls (N) measured by ELISA at different dilutions. Saliva was considered to be positive when the absorbance was higher than the mean+2 S.D. of controls. The lines indicate cut-off values.

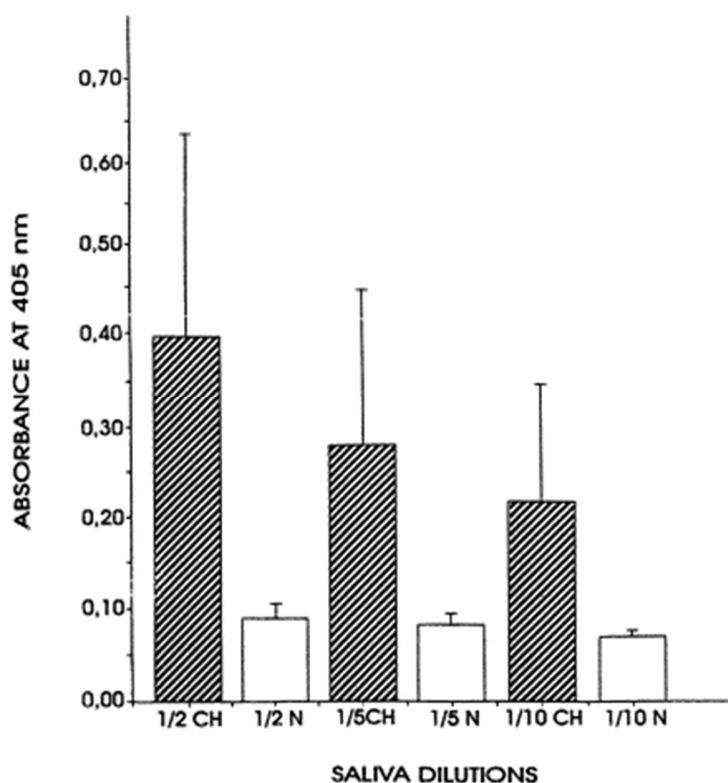


Fig. 2. Geometric mean and S.D. of duplicate measurements of the saliva IgG response to *T. cruzi* antigen from controls and patients were respectively: 1/2 S.D.=0.015 and \bar{X} =0.094; 1/5 S.D.=0.009 and \bar{X} =0.090; 1/10 S.D.=0.008 and \bar{X} =0.080; 1/2 S.D.=0.240. and \bar{X} =0.395; 1/5 S.D.=0.170 and \bar{X} =0.280; 1/10 S.D.=0.140 and \bar{X} =0.220.

A better discrimination between Chagas patients and controls was observed when saliva was diluted 1/2 than for the other dilutions employed. At this dilution, using a cutoff of 2 S.D. above the mean for healthy controls, 103 out of 114 serologically positive Chagas patients and five healthy controls were positive in the saliva assay (sensitivity 90.4%, specificity 95%). The sensitivity and specificity for 1/5 and 1/10 dilution were similar (87.8, 95, 91.3, and 95% respectively).

4. Discussion

T. cruzi infections may be chronic and asymptomatic, making diagnosis difficult. Detecting serum antibodies against parasite antigens mainly using IF, HA and ELISA are the most common and reliable methods of diagnosing symptomatic and subclinical infections. Using recombinant proteins expressed by *T. cruzi* cloned genes or purified antigens, in immunofluorescence and hemagglutination assays, Moncayo and Luquetti (1990), reported the sensitivity to the ten antigens with best performance ranged from 82.8 to 100%. On the other hand, Cura and Wendel (1994) reported that immunofluorescence assay using sera presents 98–99% sensitivity and ELISA presents 99.0% sensitivity. However, cross-reactivity with other protozoal species in some endemic areas occurs where *T. cruzi* infections are concomitant with other infections such as *Leishmania* spp. (Araújo, 1986 and Morgado et al., 1989, Giovanni De Simone, et al., 1991). In contrast, PCR is becoming a valuable technique for the diagnosis of several infectious agents with high specificity and sensitivity (Silber et al., 1997), but remains an expensive and complex assay to perform.

The use of saliva as an alternative technique for immunodiagnosis of other infections has been utilized by others as Fallone et al. (1996), who observed that salivary IgG levels correlated significantly with serum titres in *Helicobacter pylori* infection. In contrast, Christie et al. (1996) pointed out that serology remains the best serological test for *Helicobacter pylori*, but salivary antibody testing has a role in epidemiological studies and in screening dyspeptic patients.

Although serology remains the gold standard for *T. cruzi* infection, our study has shown that it is possible to use saliva as an additional source to detect *T. cruzi* infection. Salivary testing may be useful in children for whom venosection is difficult and distressing. The PAHO (Pan American Health Organization) suggests a combination of at least two different serological tests to confirm the diagnosis of *T. cruzi* infection. Therefore, saliva assays could be used as a screening test to

evaluate prevalence of Chagas' disease in endemic areas, as it is easier to obtain samples which can be frozen down and sent to reference laboratories.

T. cruzi infection results in a disseminated disease involving the cardiac and gastrointestinal systems. *T. cruzi*-specific IgG detected in the salivary ELISA assay reported here is most probably derived from transudation of serum IgG, representing a systemic immune response. Although many of our patients had cardiac and gastrointestinal manifestations, no correlation between these and the salivary IgG response was observed (data not shown). As gastrointestinal involvement may be associated with specific engagement of the mucosal immune system, we are currently studying secretory IgA specific responses to *T. cruzi* using the assay reported here. In addition we are applying the assay to patients with acute, rather than chronic, *T. cruzi* infection.

In conclusion, we have shown that detection of *T. cruzi* specific salivary IgG provides a simple, low-cost but effective tool in the diagnosis of established Chagas' disease. The non-invasive nature of this method makes it particularly suited to screening in epidemiological studies as an initial diagnostic test in endemic areas.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Dr David J.M. Lewis for helpful discussions, Simone Aguiar Peixoto and Luciana de Sousa Soares for their technical assistance. This work was supported by the Fundação Banco do Brasil and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

J.L. Affranchino, C.F. Ibañez, A.O. Luquetti, et al.
Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease Mol. Biochem. Parasitol., 34 (1989), pp. 221–228

F.G. Araújo Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related tripanosomatids Infect. Immun., 53 (1986), pp. 179–185

J.M. Burns Jr., W.G. Shreffler, D.E. Rosman, P.R. Sleath, C.J. March, S.G. Reed Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi* Med. Sci., 89 (1992), pp. 1239–1343

E.P. Camargo Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I origin of metacyclic tripanosomes in liquid media Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 6 (1964), pp. 93–100

M.E. Camargo Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis; technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 8 (1966), pp. 227–234

M.E. Camargo, S. Hoshino-Shimizu, G.R.V. Siqueira Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of American trypanosomiasis Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 15 (1973), pp. 81–85

J.M. Christie, C.A. McNulty, N.A. Shepherd, R.M. Valori Is saliva serology useful for the diagnosis of *Helicobacter pylori*? Gut, 39 (1996), pp. 27–30

E. Cura, S. Wendel Manual de Procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serología de los Bancos de Sangre; Métodos de diagnóstico serológico de enfermedad de Chagas, PAHO, Washington, DC (1994), pp. 2–3

E.A. Dragon, V.M. Brothers, R.A. Wrightsman, J. Manning A Mr 90 000 surface polypeptide of *Trypanosoma cruzi* as a candidate for a Chagas' disease diagnostic antigen Mol. Biochem. Parasitol., 16 (1985), pp. 213–229

C.A. Fallone, M. Elizov, P. Cleland, J.A. Thompson, J.E. Wild, J. Lough, J. Faria, A.N. Barkun Detection of *Helicobacter pylori* infection by saliva IgG testing *Am. J. Gastroenterol.*, 91 (1996), pp. 1145–1149

M.M.A. Garcia, M.N. Amorim, L.G. Viana, T.C.M. Garcia, N. Katz, A.L.T. Rabello Detection of anti-*Schistosoma* antibodies in oral fluids *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 90 (1995), p. 513

S. Giovanni De Simone, R.T. Pinho, C.M.M. Vanni, L.C. Pontes de Carvalho Isolation and immunological analysis of *Trypanosoma cruzi* glycolipids *Acta Trop.*, 48 (1991), pp. 233–241

A.H. Hajeer, A.H. Balfour, A. Mostratos, B. Crosse *Toxoplasma gondii*: detection of antibodies in human saliva and serum *Parasite Immunol.*, 16 (1994), pp. 43–50

R.F. Helfand, S. Kebede, J.P.J. Alexander, et al. Comparative detection of measles-specific IgM in oral fluid and serum from children by an antibody-capture IgM EIA *J. Infect. Dis.*, 173 (1996), pp. 1470–1474

D.F. Hoft, K.S. Kim, K. Otsu, et al. *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive proteins antigens *Infect. Immunol.*, 57 (1989), pp. 1959–1967

C.F. Ibañez, J.L. Affranchino, R.A. Macina, et al. Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs *Mol. Biochem. Parasitol.*, 30 (1988), pp. 27–34

L.V. Kirchhoff, A.A. Gam, R. d'A Gusmão, R.S. Goldsmith, J.M. Rezende, A. Rassi Increased specificity of serodiagnosis of Chagas' disease by detection of antibody to the 72- and 90-Kilodalton glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* *J. Infect. Dis.*, 155 (1987), pp. 561–564

J.J. Lafaille, J. Linss, M.A. Krieger, T. Souto-Padron, W. de Souza, S. Goldenberg Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes Mol. Biochem. Parasitol., 35 (1989), pp. 127–136

D.J.M. Lewis, P. Novotny, G. Dougan, G.E. Griffin The early cellular and humoral immune response to primary and booster oral immunization with Cholera Toxin B subunit Eur. J. Immunol., 21 (1991), pp. 2087–2094

O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall Protein measurement with the Folin phenol reagent J. Biol. Chem., 193 (1951), pp. 265–275

A. Moncayo, A.O. Luquetti Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 85 (1990), pp. 489–495

A. Moncayo-Medina, 1987. Chagas' disease. In: Maurice, J., Pearce, A.M. (Eds.), B. Tropical Disease Reserch: A Global Partnership, WHO, Geneva, pp. 87–98.

M.G. Morgado, M. Van Hoegarden, B. Galvão-Castro Antigenic analysis of *Trypanosoma cruzi* strains by crossed immunoelectrophoresis: demonstration and isolation of antigens particular to some strains Z. Parasitenkd., 71 (1985), pp. 169–178

M.G. Morgado, J. Ivo-dos-Santos, R.T. Pinho, E. Argüelles, J.M. Rezende, B. Galvão-Castro *Trypanosoma cruzi*: identification of specific epimastigote antigens by human immune sera Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84 (1989), pp. 309–314

V. Nussenzweig, L.M. Deane, J. Kloetzel Differences in antigenic constitution of strains of *Trypanosoma cruzi* Exp. Parasitol., 14 (1963), pp. 221–224

G.S. Paranhos, P.C. Cotrim, R.A. Mortara, et al. *Trypanosoma cruzi*: cloning and expression of an antigen recognized by acute and chronic human chagasic sera Exp. Parasitol., 71 (1990), pp. 284–293

J.V. Parry, K.R. Perry, P.P. Mortimer Sensitive assays for viral antibodies in saliva: an alternative to tests on serum Lancet, 2 (1987), pp. 72–75

K.R. Perry, D.W.G. Brown, J.V. Parry, S. Panday, C. Pipkin, A. Richards Detection of measles, mumps, and rubella antibodies in saliva using antibody capture radioimmunoassay J. Med. Virol., 40 (1993), pp. 235–240

F. Plata, F. Garcia-Pons, H. Eisen Antigenic polymorphism of *Trypanosoma cruzi*: clonal analysis of trypomastigote surface antigens Eur. J. Immunol, 14 (1984), pp. 392–399

J. Scharfstein, A. Luquetti, A.C.M. Murta, M. Senna, J.M. Rezende, A. Rassi, L. Mendonça-Previato Chagas' disease: serodiagnosis with purified Gp 25 antigen Am. J. Trop. Med. Hyg., 34 (1985), pp. 1153–1160

M. Schechter, J.E. Flint, A. Voller, F. Guhl, C.J. Marinkelle, M.A. Miles Purified *Trypanosoma cruzi* specific Glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American Trypanosomiasis (Chagas' disease) Lancet, 2 (1983), pp. 939–941

A.M. Silber, J. Búa, B.M. Porcel, E.L. Segura, A.M. Ruiz *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/ BP2) targeted to a nuclear DNA sequence Exp. Parasitol., 85 (1997), pp. 225–232

L.H.P. Silva, V. Nussenzweig Sobre uma cepa do *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta pare camundongo branco Folia Clin. Biol., 20 (1953), pp. 191–207

A. Voller, C.C. Draper, D.E. Bidwell, A. Aertlelt Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease *Lancet*, 1 (1975), pp. 426–429

*Documento 2

Uma vez que tem sido proposto por diversos autores que antígenos liberados pelo *T. cruzi* podem sensibilizar células de vertebrados tornando-as alvo de resposta imunológica produzida contra o parasito, nos propusemos neste trabalho a caracterizar estes antígenos liberados por tripomastigotas de *T. cruzi* que ligam às células não infectadas e seus possíveis efeitos biológicos.

A análise por SDS-PAGE, dos antígenos liberados pelo parasito revelou a presença de políptidos variando principalmente de 85-110 e 160-170 kDa ligaram-se às células não infectadas (epiteliais, fibroblastos e células musculares de mamíferos). A cisteína proteinase, mas não a trans-sialidase foi detectada entre os antígenos ligados às células. Isto foi confirmado pela adsorção de cisteína proteinase purificada às células não infectadas. Estudos de imuno-microscopia eletrônica mostraram que os antígenos do parasito foram liberados principalmente como vesículas que se adsorveram à membrana e ocasionalmente são internalizadas pelas células. Estes antígenos também foram visualizados através da ligação ao anticorpo anti-*T. cruzi*. Ainda, mostramos que a adsorção de antígenos do parasito reduziu um aumento de expressão dos componentes do meio extracelular (fibronectina, laminina e colágeno tipo I) nas células sensibilizadas

Assim, nossos dados reforçam a ideia que *in vivo* os antígenos de *T. cruzi* podem ser envolvidos no estabelecimento da inflamação, sensibilizando células não infectadas do hospedeiro e disparando uma resposta imune contra os antígenos do parasito. Além disso, nossos dados mostram que esta sensibilização modula funções biológicas das células como expressão de matriz extracelular podendo manter interações célula-célula ou interações parasito-células contribuindo para o estabelecimento e ou perpetuação da inflamação.

*Artigo in press: J Exp Parasitol

Effect of *Trypanosoma cruzi* released antigens binding to non-infected cells on anti-parasite antibody recognition and expression of extracellular matrix components.

Pinho RT, Vannier-Santos MA, Alves CR, Marino AP, Castello Branco LR, Lannes-Vieira J.

Abstract

It has been proposed that antigens released by *Trypanosoma cruzi* sensitize vertebrate cells leading to their destruction by the immune response raised against the parasite. Here, we characterized antigens released by trypomastigotes of *T. cruzi* that bind to non-infected cells and investigated biological consequences of this adsorption. Sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) analysis of antigens released by [³⁵S]-methionine-labeled parasites revealed the presence of polypeptides mainly ranging from 85 to 170 kDa that were specifically recognized by sera from chronically *T. cruzi* infected rabbits. Polypeptides of 85-110 and 160-170 kDa bound to non-infected epithelial, fibroblast and muscle mammalian cell lines, which thus became targets for anti-*T. cruzi* antibody binding. Cysteine-proteinase, but not *trans*-sialidase, was detected among the cell-bound antigens, and purified cysteine-proteinase was adsorbed to non-infected cells. Immunoelectron microscopic studies showed that parasite antigens were mainly released as membrane vesicles that adhered to membrane microvilli and were internalised by mammalian cells. We provide evidence that adsorption of parasite antigens induced an increase in expression of extracellular matrix (ECM) components (fibronectin, laminin and type I collagen) by sensitised cells. Thus, our data reinforce the idea that *in vivo* *T. cruzi* released antigens might be involved in the establishment of inflammation, which sensitising non-infected host cells and triggering an immune response against parasite antigens. Furthermore, our data showed that antigen sensitisation modulates biological cell functions as ECM expression that could mediate cell-cell or parasite-cell interactions, further contributing to establishment of inflammation.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Chagas' disease; released antigens; extracellular matrix; adsorption antigens

1. Introduction

Trypanosoma cruzi is the aetiological agent of American trypanosomiasis (Chagas, 1909), which is highly prevalent in South and Central America. Approximately 100 million people are exposed to risk of infection and up to 18 million people are infected (Dias, 1997). The disease presents two distinct phases, acute and chronic. The acute phase is characterized by parasitaemia and intense inflammatory infiltrates, especially in cardiac tissue, directly related to tissue parasitism. Approximately 20% of patients may develop a chronic cardiomyopathy and/or mega syndrome of the digestive system (Rassi, 1992). During this phase the inflammatory lesions are not related to the presence of the parasite. This led some authors to propose that chronic Chagas' disease is an autoimmune process (Chagas, 1934; Köeberle, 1968; Santos-Buch and Teixeira, 1974; Hudson and Hindmarsh, 1985; Petry and Eisen, 1989; Ribeiro dos Santos et al., 1992; Cunha-Neto et al., 1996). However, recent findings show that the parasite is required and sufficient to induce chronic inflammation in cardiac tissue (Tarleton et al., 1997). This hypothesis is reinforced by immunohistochemical demonstration of *T. cruzi* antigens in inflamed myocardium of chronically *T. cruzi*-infected mice (Ben-Younes-Chennoufi et al., 1988) and cardiac chagasic patients (Higuchi et al., 1993; Morrot et al., 1997). These findings reemphasised the importance of understanding the role played by the parasite and its antigens in the pathogenesis of chronic inflammation observed in *T. cruzi*-infected individuals.

Released *T. cruzi* antigens are detected in the blood of *T. cruzi*-infected experimental animals and patients (Dzibénski, 1974; Araujo et al., 1981; Araujo, 1982; Freilij et al., 1987), and in supernatants of infected cell cultures (Araujo, 1982; Afranchino et al., 1989; Gonçalves et al., 1991; Norris and Schimprf, 1994; Ouassi et al., 1990; Yokayama-Yasunaka et al., 1994). Moreover, it has been shown that soluble *T. cruzi* antigens bind to non-infected cells *in vitro* and are recognised by antibodies and immune cells directed to parasite antigens leading to cell damage (Ribeiro dos Santos and Hudson, 1980b; Williams et al., 1985;

Soares and Ribeiro dos Santos, 1999). However, the polypeptides identification of *T. cruzi* released antigens that bind mammalian cells, and the biological consequence of antigen adsorption to host cells are not well defined. We carried out this work to identify these antigens and characterize the effect of their adsorption to non-infected cells on the expression of extracellular matrix molecules using *in vitro* models.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

Trypomastigote forms of the Y strain of *T. cruzi* (Silva and Nussenzweig, 1953) were maintained *in vitro* by infection of LLC-MK₂ cell lineage. Semi-confluent LLC-MK₂ cell cultures maintained in RPMI-1640 medium (Sigma, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) were infected (10 parasites/cell) and after 5-7 days the differentiated trypomastigotes or cell culture supernatants were harvested.

2.2. *T. cruzi* released antigens

As previously described by Gonçalves et al. (1991), to obtain *T. cruzi* released antigens, supernatants from infected LLC-MK₂ cell cultures or harvested trypomastigotes were incubated for 3-20 h at 37°C in RPMI medium containing 3% FBS. After centrifugation at 1500 x *g* for 30 min at 4°C the supernatants were collected and filtered in Swinnex 0.22 µm filter (Millipore, USA) previously blocked with FBS, concentrated with Centriprep 10 (Amicon, USA) by centrifugation at 1500 x *g* at 4°C, and were used or stored at -70°C. Protein concentration was determined by Lowry's method (Lowry et al., 1951). The released antigens were used only when in the end of the experiments the incubated parasites were fully motile and were able to infect cell cultures, indicating that the antigens are not a result of parasite lysis.

2.3. Metabolical labeling of *T. cruzi*

In order to metabolically label the parasites, 7×10^7 harvested trypomastigotes were washed twice (2300g, 4 min) in serum-free RPMI medium (Sigma, USA), once in methionine-free DMEM (Sigma), and incubated for 1 h in methionine-free DMEM containing 100 μCi [^{35}S]-methionine (Amersham, UK) at 37°C 5% CO_2 humidified atmosphere. After four washes in RPMI medium containing 3% FBS, the [^{35}S] methionine-labeled parasites were incubated for 3 h at 37°C (Gonçalves et al., 1991) in 500 μl RPMI medium containing 3% FBS to obtain [^{35}S]-methionine-labeled released antigens.

2.4. Sensitisation of mammalian cell lineages with *T. cruzi* released antigens

Mouse C2C12 muscle cells, L929 fibroblasts, and *Rhesus* monkey LLC-MK₂ kidney cells were maintained in plastic flask cultures at semi-confluent conditions in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 μg /ml streptomycin at 37°C 5% CO_2 humidified atmosphere.

In order to characterize the molecular mass of the antigens that bind to mammalian cells, 3×10^3 cells/well were allowed to adhere to 96-well plates (Corning, UK) in RPMI-1640 medium 10% FBS. Twenty-four hours later cells were washed twice with serum free medium and 17.5 μg of [^{35}S] methionine-labeled *T. cruzi* released antigens added. Cell cultures were incubated for 2 h at 37°C or 4°C and washed 3 times in RPMI medium and twice in PBS. In separate experiments, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of purified cysteine proteinase was added to LLC-MK₂ cells, incubated for 2 h at 37°C, washed as above and subjected to gel electrophoresis.

2.5. Antibodies

Polyclonal anti-*T. cruzi* serum was produced infecting rabbits with 10^4 viable trypomastigote forms of the Y strain of parasite. After 5 months, the animals received a booster with 10^4 viable trypomastigote forms of the Colombiana strain (Federici et al., 1964) of *T. cruzi*. Sera were obtained 6 months later. Specific polyclonal sera produced in rabbits recognising fibronectin (FN), laminin (LN) and type I collagen were purchased from Institute Pasteur (Lyon, France). As demonstrated by the manufacturer, these antibodies recognize mouse extracellular matrix (ECM) components and do not exhibit cross-reaction with other extracellular matrix molecules. Monoclonal antibody (mAb 39) that recognises *trans*-sialidase (Shenckman et al., 1992) was donated by Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos. The anti-gp51 monoclonal antibody [clone (212) 17/DB6/CD12/CH6] raised against *T. cruzi* cysteine proteinase (Scharfstein et al., 1986) was donated by Dr. Nádia Batoreu (Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ, Brazil).

2.6. Gel electrophoresis

Trypomastigotes and released antigen-sensitised cells were treated using lysis buffer [10 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 1% Nonidet P-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM N α -p-tosyl-L-lysine chloro-methyl ketone (TLCK), 0.25 μ g/ml leupeptin, 1 mM *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64) (Sigma) and Laemmli's sample buffer (Laemmli, 1970). The samples were boiled at 100°C for 3 min, loaded in 8.5% polyacrylamide minigel and subjected to gel electrophoresis (SDS-PAGE). Molecular mass markers (Sigma) were myosin (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66 kDa), chicken egg albumin (45 kDa) and carbonic anhydrase (29 kDa). Gels were stained with Coomassie blue R-250, destained, processed for fluorography for [35 S] methionine detection, dried and exposed to X-ray films (Kodak, USA) at -70°C with intensification screens.

2.7. Western blot

Resolved profiles and molecular mass markers were electrophoretically transferred from SDS-PAGE gels to 0.45 μm nitrocellulose membranes (Bio-Rad, USA) in a semi-dry system (Bio-Rad) as described elsewhere (Towbin et al., 1979). Nitrocellulose membrane strips were blocked for 1 h with 5% skimmed milk in PBS followed by incubation for 1 h with rabbit immune sera diluted 1/100 in PBS containing 0.05% Tween 20. After 6 washes in PBS (5 min. each), the strips were incubated with appropriated peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature and washed as above. The peroxidase reaction was developed with diaminobenzidine (Sigma) in the presence of H_2O_2 .

2.8. Immunoelectron microscopy

To characterize the subcellular distribution of released antigens adsorbed to mammalian cells, 9×10^6 cells were allowed to adhere to 150 cm^2 culture flask (Corning, UK) in RPMI medium supplemented as described above. Twenty-four hours later the released antigens (480 μg) were added to the L929 monolayer and incubated for 8 h at 37°C 5% CO_2 humidified atmosphere. The control cells, received medium. The cells were washed 3 times with RPMI medium and twice with PBS and fixed in 1% glutaraldehyde (Sigma, type I), 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 at 4°C during 12 h. Free aldehyde groups were quenched in a 0.1 M glycine solution. After scraping, cells were dehydrated in a methanol series at low temperature and embedded in Lowicryl K4M hydrophylic resin. Non-specific protein binding sites were blocked using 3% bovine serum albumin (BSA), 0.01% Tween 20 in PBS pH 8.0. Ultrathin sections were incubated with polyclonal anti-*T.cruzi* serum followed by 10 nm gold-conjugated goat anti-rabbit antibody, stained in uranyl acetate and observed under a Zeiss 900 electron

microscope. For routine electron microscopy, cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer, post-fixed in 1% OsO₄ with K₄Fe(CN)₆ in the same buffer, dehydrated in acetone and embedded in polybed resin.

2.9. Immunocytochemistry

In order to demonstrate the presence of released *T. cruzi* antigens bound to mammalian cells and the biological effect of this adsorption on expression of extracellular matrix components, 5x10⁴ cells were allowed to adhere to 8-well-chamber slide (Nunc, Inc., Naperville, IL, USA). Twenty-four h later, 150 µg of *T. cruzi* released antigens were added. Cell cultures were incubated for 20 h at 37°C, washed 3 times with RPMI medium and twice with PBS, fixed in methanol for 3 minutes and subjected to indirect immunoperoxidase technique as previously described (Lannes-Vieira et al., 1991). Briefly, non-specific antibody binding was blocked by incubating specimens with PBS containing 0.1% NaN₃ and normal goat serum (1/50). Next, sequential incubations with primary unlabelled antibodies (anti-*T. cruzi*, anti-cruzipain, anti-*trans*-sialidase, anti-cysteine proteinase, anti-fibronectin, anti-laminin, anti-type I collagen, or species matched control serum or immunoglobulin were performed). Secondary biotinylated antibodies (goat anti-rabbit Ig or rabbit anti-mouse Ig) and streptavidin-peroxidase complex were subsequently added. All incubations were performed for 1 h in wet chamber with reagents diluted in BSA-PBS and followed by washes in PBS. The peroxidase reaction was developed with 9-amino 3-ethylcarbazole (Sigma, USA) in the presence of H₂O₂. The material was counter-stained with Mayer's haematoxylin and analysed under a light microscope.

3. Results

3.1. Characterization of *T. cruzi* released antigens

The SDS-PAGE analysis of material released by [³⁵S] methionine-labeled trypomastigote forms of the Y strain of *T. cruzi* after 3 h of incubation at 37°C showed a panel of polypeptides mainly ranging from 85 to 170 kDa (figure 1B). The immunoblotting characterization of *T. cruzi* released antigens using sera obtained from chronically *T. cruzi*-infected rabbits revealed a set of bands ranging mainly from 85 to 170 kDa (figure 2A). Using the monoclonal antibody (mAb 39) that recognises *trans*-sialidase (120-220 kDa), a well-characterized *T. cruzi* antigen (Shenckman et al., 1991; 1992), we were able to detect the presence of this molecule in the released antigens (figure 2, B).

Further, the presence of cysteine proteinase was detected using monoclonal antibody anti-gp 51 (figure 2C).

3.2. Binding of *T. cruzi* released antigens to non-infected mammalian cells and recognition by anti-*T. cruzi* antibodies

Using an immunocytochemistry assay we demonstrated that *T. cruzi* released antigens bind to non-infected L929 and C2C12 mammalian cell lines as sensitised cells were specifically recognised by polyclonal antibody obtained from *T. cruzi*-infected rabbits. Immunoreactivity to *T. cruzi* antigens was not detected when untreated cells were assayed (figure 3). Moreover, using monoclonal antibodies against cysteine proteinase we showed the adsorption of this released antigen to non-infected cell lines treated with *T. cruzi* released antigens (figure 3). Reactivity to *trans*-sialidase was not detected in bound antigens (data not shown).

Immunoelectron microscopy analysis showed that most of the *T. cruzi* released antigens recognised by polyclonal antibody were membrane vesicles (figure 4A). These vesicles were detected adsorbed to mammalian cell membranes, especially to cell microvilli (figure 4A). Interestingly, when L929 cells were sensitised for 8

hours with *T. cruzi* released antigens, some of the sealed membrane vesicles were internalised via cell surface processes (figure 4B). Immunoreactivity to *T. cruzi* antigens was also observed in the internalised material (data not shown).

In order to identify the molecular mass of cell adsorbed antigens, [³⁵S] methionine-labelled released antigens were incubated at 37°C for 2 h with mammalian L929 (fibroblast), LLC-MK₂ (epithelial) and C2C12 (muscle) cell lines. After washes the cells were lysed and electrophoresis revealed adsorption of mainly 85-110 and 160-170 kDa polypeptides to non-infected cells. These results were confirmed in three independent experiments. Further, the pattern of absorbed antigens was essentially the same whether incubations were performed at 37°C or 4°C (figure 5). Interestingly, a faint band of 45 kDa was only observed when the assay was performed at 37°C (figure 5). The capability of cysteine proteinase present in the released antigen to adsorb to non-infected cells demonstrated by immunoperoxidase assay was confirmed when LLC-MK₂ cells were sensitised with purified cysteine proteinase, washed and analysed using monoclonal antibody by Western blot (figure 6).

3. 3. Expression of extracellular matrix proteins following adsorption of T. cruzi released antigens to mammalian cells

Treatment of non-infected L929 cell line for 20 h with *T. cruzi* released antigens induced a remarkable increase in expression of ECM components fibronectin, laminin and type I collagen (figure 7) when compared with cell cultures treated with control medium. Similar increase in expression of fibronectin and laminin was observed when non-infected C2C12 muscle cells were treated with released antigens (Table 1).

4. Discussion

In the present study, we have identified the antigens released by trypomastigote forms of *T. cruzi* that adsorb to non-infected mammalian cells. Moreover, we provide evidence that these cell-bound antigens are recognised by anti-parasite antibodies present in the sera of chronically *T. cruzi*-infected rabbits and induce an increase in the expression of extracellular matrix components by the sensitized cells.

Our data showed that a group of polypeptides mainly ranging from 85 to 170 kDa were spontaneously released from trypomastigote forms of the Y strain of *T. cruzi* incubated at 37°C in culture medium. In fact, previous studies have shown that *T. cruzi* trypomastigotes release polypeptides of different molecular mass into culture medium, (Affranchino et al., 1989; Ouassi et al., 1990; Gonçalves et al., 1991; Norris and Schrimpf, 1994; Yokayama-Yasunaka et al., 1994). It is worth noting that release of parasite antigens is not an *in vitro* artefact as circulating *T. cruzi* antigens have been detected in urine of *T. cruzi*-infected animals (Bongertz et al., 1981, Corral et al., 1989) and humans (Freilij et al., 1987; Katzin et al., 1989; Corral et al., 1996), and sera from *T. cruzi*-infected animals (Dzbeński, 1974; De Siqueira et al., 1979; Bongertz et al., 1981; Araujo, 1982; Gottlieb 1977; Corral et al., 1992) and patients with Chagas' disease (Araujo et al., 1981; Khan et al., 1983; Freilij et al., 1987; Afranchino et al., 1989; Fernandez-Ferreira et al., 1988; Corral et al., 1992). In fact, some authors evaluated the antibody response to these antigens as a method for diagnosis of the acute and chronic phases of Chagas' disease (Affranchino et al., 1989; Jazin et al., 1991; Ouassi et al., 1991; Umezawa et al., 1996). Indirectly the detection of antibodies recognising these antigens implies that they are able to elicit an immune response. However, the biological meaning of this finding remains to be defined. It was proposed that these released antigens could play a role in immunopathogenesis as they could be recognised by specific antibodies, form immune complexes and are deposited on basal lamina or tissue lesions. These events may contribute to the perpetuation of deleterious autoimmune processes (Silva et al., 1985; Brener, 1987). This possibility is reinforced by our data that sera from chronically *T. cruzi*-infected rabbits

recognised several polypeptides mainly ranging from 85 to 170 kDa present in the preparations of trypomastigote-released antigens. Previous work has shown that the recognition of 45-55 kDa and shed acute phase antigen (SAPA) polypeptides was characteristic of acute infection, and reactivity against 160-170 kDa trypomastigote antigens was detected in sera of chronic chagasic patients (Jazin et al., 1991). The 160-kDa antigen attached to the membranes has received much attention (Martins et al., 1985; Norris et al., 1989; Yoshida et al., 1986; Zweerink et al., 1984). This molecule may provide the trypomastigotes with a mean of evading the destructive effects of complement (Norris et al., 1991). The 160 kDa Oexoantigen may be similar to the SAPA circulating *T. cruzi* antigen shown to be a major antigen shed by trypomastigotes into cell culture medium, as well as an antigen found in the blood of acutely infected individuals and specifically recognised by acute phase sera (Affranchino et al., 1989). Another well-characterized SAPA is the *trans*-sialidase (100 to 220 kDa) (Affranchino et al., 1989; Schenkman et al., 1992; Schenkman et al., 1994), a surface trypomastigote released enzyme (Pollevick et al., 1991; Ouassi et al., 1991; Jazin et al., 1991; Schenkman et al., 1991) that plays a role in parasite evasion (Nasser et al., 1997). Using immunoblotting we showed that *trans*-sialidase characterized as antigens ranging from 120-220 kDa (Schenkman et al., 1992) is present in our preparations of trypomastigote-released antigens. Further, the 51 kDa protein characterized as cysteine proteinase (Scharfstein et al., 1986) using the monoclonal antibody anti-gp 51 was detected in these preparations of *T. cruzi* released antigens.

Different mechanisms may account to the release of *T. cruzi* antigens. The released polypeptides could derive either from parasite lysis or from spontaneous release as result of secretion and/or excretion as a result of parasite metabolism (Ouassi et al., 1990). In our experiments, the first possibility can be ruled out since the parasites were viable and able to infect cell cultures at the end of the incubation period used to obtain the released antigens. The presence of glycoposphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in trypomastigotes has been described (Schenkman et al., 1988). In addition, there is evidence that *T. cruzi* posses phospholipase C-like enzyme as well as proteases that could be involved

in the solubilisation process of parasite surface antigens (Schenkman et al., 1988). Although it is possible that part of the released antigens are soluble molecules, the immunoelectron microscopy study showed that most of the parasite antigens are released as membrane vesicles, as previously described (Gonçalves et al., 1991). These findings reinforce the hypothesis that the detected released antigens result of shedding of parasite plasma membrane. This could reflect an escape mechanism triggered by the *in vivo* binding of immune effectors molecules such as antibodies and/or complement, or a spontaneous process as suggested by the detection of these vesicles in *in vitro* conditions, as described here and elsewhere (Gonçalves et al., 1991). Furthermore, herein we showed that when incubated with mammalian cells, these antigen-containing vesicles were found associated with microvilli membranes or as internalised material localised in membrane-bounded vacuoles. This suggests that the antigen-containing vesicles were endocytosed by the mammalian cells. In view of the subcellular localisation of *T. cruzi* released antigens, it can be inferred that *in vivo* these antigens could be processed and presented in the context of MHC by host cells. In this way, *T. cruzi* released antigens could elicit an anti-parasite immune response. However, this possibility requires further investigation. It is also reasonable to propose that antigen adsorption could be involved in immunopathogenesis, as discussed below.

Using gel electrophoresis we detected that 85-110 and 160-170 kDa polypeptides were bound to non-infected mammalian cells at both 37°C and 4°C indicating that adsorption is not result of fluid-phase endocytosis, this process is unlikely at 4°C (Boschetti et al., 1987). By electron microscopy, we found that most of the released antigens were adsorbed to cells while only a few cells showed endocytosed material. Interestingly, a 45 kDa faint band antigen was only detected when the incubation was performed at 37°C. We could not exclude the possibility that other antigens bind to non-infected cells at low, undetectable concentrations.

Our results showing adsorption of antigen to mammalian cells is in agreement with the demonstration those soluble *T. cruzi* antigens obtained from disrupted amastigotes sensitise human and mouse neuronal cells (Ribeiro dos Santos and Hudson, 1980a). Moreover, we showed that the cell-bound antigens were

recognised by sera obtained from chronically *T. cruzi*-infected rabbits. Using monoclonal antibodies in an immunocytochemical assay, we showed that cruzipain, a well characterized cysteine proteinase of *T. cruzi*, is adsorbed to these non-infected cells. In addition, using Western blot analysis purified cysteine proteinase was shown to adsorb to non-infected LLC-MK₂ epithelial cells. Although the molecular mass of the cell-adsorbed enzyme was slightly lower than expected, such variations are common in glycoproteins and active proteinases. Interestingly, although *trans*-sialidase was detected in the released antigens, it was unable to bind to the mammalian cells tested in the present work. These results suggest that there is selectivity in the adsorption of released antigens to mammalian cells. The biological meaning of this finding is not clear. Nevertheless, released antigens bound to non-infected epithelial (results not shown), fibroblast and muscle mammalian cells, indicating that *in vivo* adsorption of released parasite antigens may be a widespread phenomenon that could trigger inflammation in several tissues of the infected host as previously proposed (Ribeiro dos Santos and Hudson, 1980a). In this context, a recent study demonstrated that neuronal cells sensitised *in vitro* with soluble extract of *T. cruzi* are targets for activated splenic CD4⁺ T cells isolated from chronically infected mice (Soares and Ribeiro dos Santos, 1999). This finding, besides the demonstration that *T. cruzi* released antigens when adsorbed to non-infected mammalian cells were recognised by immune sera from chronically *T. cruzi*-infected rabbits, and that sera of chronic chagasic patients react to the 160-170 kDa released antigen (Jazin et al., 1991), supports the hypothesis that released antigens might contribute to the pathogenesis of inflammation observed during Chagas' disease. Thus, it is conceivable to think that *in vivo* non-infected cells sensitised with parasite antigens become targets for a humoral and cellular immune response. Self-antigens released as a consequence of cell lysis induced by antibody binding or T cell cytotoxicity (Ribeiro dos Santos and Hudson, 1980 a;b; Araujo, 1982) could also contribute to an auto reactive response. This response could be transient or perpetuated, depending on the presence or absence of the parasite. This possibility finds support in recent data showing that the parasite is necessary and

sufficient for the perpetuation of chronic myocarditis (Tarleton et al., 1997). Furthermore, *T. cruzi* amastigotes (Higuchi et al., 1993; 1997) and antigens, including cruzipain, are detected in inflammatory infiltrates of cardiac tissue from chronically *T. cruzi*-infected patients (Morrot et al., 1997) and mice as a diffuse material surrounding areas where parasites were detected (Santos et al., 2001).

A further biological consequence of the association of *T. cruzi* released antigens with non-infected mammalian cells, was the observation that cells treated with trypomastigote released antigens increased the expression of extracellular matrix. It is proposed that the ECM molecules direct or indirectly affect biological events involved in immune response via parasite/host cell and cell/cell interactions (Velge et al., 1988; Savino et al., 1993), as well as leukocyte activation, migration, differentiation and antigen recognition (Nathan and Sporn, 1991; Tanaka et al., 1993; Shimizu and Shaw, 1991). In this context, it was shown that an 85 kDa surface antigen of *T. cruzi* is member of the fibronectin/collagen receptor proteins (Ouassi et al., 1984). Moreover, the involvement of these proteins in the interaction between *T. cruzi* and vertebrate cells has been reported (Velge et al., 1988). It is tempting to propose that the increasing in the expression of ECM components observed in the mammalian cells treated with *T. cruzi* released antigens may increase the *in vivo* entrance of parasite into non-infected host cells, enhancing parasitism, and/or increase cell-cell interactions leading to tissue damage. In this regard, increased expression of the ECM glycoproteins fibronectin and laminin were observed in cardiac tissue (Andrade et al., 1989; Santos et al., 2001) and central nervous system (Silva et al., 1999) during experimental *T. cruzi* infection. Moreover, mononuclear cells expressing ECM receptors, such as VLA-4 and CD44, were immunohistochemically detected in the myocardium of chronic chagasic patients (D' Avila Reis et al., 1993) and *T. cruzi*-infected mice (Zhang and Tarleton, 1996; Santos et al., 2001), as well as in the central nervous system of infected mice (Silva et al., 1999). Interestingly, we showed that the FN mesh present in the inflamed central nervous system and heart involves VLA-4⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Silva et al., 1999; Santos et al., 2001), suggesting that these inflammatory cells are activated and able to interact with ECM components.

Another point that deserves to be considered is the observation that cruzipain binds to ECM molecules, including FN, and degrades the adjacent ECM molecules *in vitro* (Scharfstein and Morrot, 1999). Therefore, the adsorption of released antigens to cell surface of non-infected cells could, at least in part, be due to association of these antigens with cell membrane-bound extracellular matrix.

Altogether, our results reinforce the possibility that *T. cruzi* released antigens could directly trigger and perpetuate inflammation in multiple tissues of an infected individual as targets for effectors mechanisms of the immune response and indirectly by modulating other biological cell functions such as ECM expression.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Dr. David J.M. Lewis and Dr. S. Giovanni de Simone for helpful discussions. We are indebted to Dr. Julio Scharfstein (Instituto de Biofísica-IBCCF, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos (Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fiocruz, Salvador, BA, Brazil) for providing cruzipain (purified cysteine proteinase –51/57 kDa) and monoclonal antibody [mAb 39] that recognises *trans*-sialidase, respectively. This work was supported by the Fundação Banco do Brasil, FAPERJ, PRONEX/MCT, PAPES 2 - Fundação Oswaldo Cruz and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). (J. Lannes-Vieira and M.A.Vannier-Santos are research fellows from CNPq).

References

- Affranchino, J.L., Ibanez, C.F., Luquetti, A.O., Rassi, A., Reyes, M.B., Macina, R. A., Aslund, L., Petterson, U., Frasc, A.C.C., 1989. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 221-228.
- Andrade, S.G., Grimaud, J.A., Stocker-Guerret. S., 1989. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of the cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40, 252-260.
- Araujo, F.G., Chiari, E., Dias, J.C.P., 1981. Demonstration of *Trypanosoma cruzi* antigen in serum from patients with Chagas' disease. *Lancet* 1, 246-249.
- Araujo, F.G., 1982. Detection of circulating antigens of *Trypanosoma cruzi* by enzyme immunoassay. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 76, 25-36.
- Ben Younes- Chennoufi, A., Hontebeyrie-Joskowics, M., Tricottet, V., Einsen H., Rey-nes, M., Said, G., 1988. Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 77-83.
- Bongertz, V., Hungerer, K.D., Galvão Castro, B., 1981. *Trypanosoma cruzi*: circulating antigens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 76, 71-82.
- Boschetti, M.A., Piras, M.M., Henríquez, D., Piras, R., 1987. The interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface protein with Vero cells and its relationship with parasite adhesion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24, 175-184.
- Brener, Z. 1987 Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82, 205-213.

- Chagas, C., 1909. Nova tripanosomiase humana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1, 159-218.
- Chagas, C., 1934. Estado atual da trypanosomiase americana. Rev. Biol. Hyg. 5, 58-64.
- Corral, R.S., Orn, A., Freilij, H.L., Bergman, T., Grinstein, S., 1989. Purification and characterization of an 80-kilodalton *Trypanosoma cruzi* urinary antigen. J. Clin. Microbiol., 27, 145-151.
- Corral, R.S., Orn, A., Grinstein, S., 1992. Detection of soluble exoantigens of *Trypanosoma cruzi* by a dot-immunobinding assay. Am. Soc. Trop. Med. Hyg. 46, 31-38.
- Corral, R.S., Altcheh, J, Alexandre, S.R, Grinstein, S., Freilij, H., Katzin, A.M, 1996. Detection and characterization of antigens in urine of patients with acute, congenital, and chronic Chagas' disease. J. Clin. Microbiol. 34, 1957-1962.
- Cunha-Neto, E., Coelho, V., Guilherme, L., Fiorelli, A., Stolf, N., Kalil, J., 1996. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas'cardiomyopathy patient. J. Clin. Invest. 98, 1709-1712.
- D'avila Reis, D., Jones, E.M., Tostes Jr., S., Lopes, E.R, Chapadeiro, E., Gazzinelli, G., Colley, D.G., Mc Curley, T.L., 1993. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49, 192-200.
- De Siqueira, A.F., Ferrioli Filho, F., Domingues Ribeiro, R., 1979. Aspectos imunitários iniciais observados em ratos infectados por *Trypanosoma cruzi*. A

- circulação de antígenos solúveis e as modificações do complemento sérico dos animais em dias sucessivos da infecção. Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol. 12, 75-79.
- Dias, J.C.P., 1997. Present and future of human Chagas' disease in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 92, 13-15.
- Dzibénski, T.H., 1974. Exoantigens of *Trypanosoma cruzi* in vivo. Tropenm. Parasitol. 25, 485-491.
- Federici, E.E., Abelmann, W.H., Neva, F.A., 1964. Chronic and progressive myocarditis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 13, 272-280.
- Fernandez-Ferreira, E., Bongertz, V., Galvão-Castro, B., 1988. *Trypanosoma cruzi* circulating antigens. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 83, 120-121.
- Freilij, H.L., Corral, R.S., Katzin, A.M., Grinstein, S., 1987. Antigenúria in infants with acute and congenital Chagas' disease. J. Clin. Microbiol. 25, 133-137.
- Gonçalves, M.F., Umezawa, E.S., Katzin, A.M., Souza, W., Alves, M.J.M., Zingales, B., Colli, W., 1991. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. Exp. Parasitol. 72, 43-53.
- Gottlieb, M., 1977. A carbohydrate-containing antigen from *Trypanosoma cruzi* and its detection in the circulation of infected mice. J. Immunol. 119, 465-470.
- Higuchi, M.L., Gutierrez, P.S., Aiello, V.D., Palomino, S., Bocchi, E., Kalil, J., Bellotti, G., Pileggi, F., 1993. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol. 423, 157-160.

- Higuchi, M.L., Reis, M.M., Aiello, V.D., Benvenuti, L.A., Gutierrez, P.S., Bellotti, G., Pileggi, F., 1997. Association of an increase in CD8⁺ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human chagasic myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 485-489.
- Hudson, L., Hindmarsh, P.J., 1985. The relationship between autoimmunity and Chagas' disease: casual or coincidental? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 117, 167-171.
- Jazin, E.E., Luquetti, A.O., Rassi, A., Frasch, A.C.C., 1991. Shift of Excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* during human Chagas' disease. *Infect. Immun.* 59, 2189-2191.
- Katzin, A.M., Marcipar, A., Freilij, H.L., Corral, R.S., Yanovsky, J.F., 1989 Rapid determination of *Trypanosoma cruzi* urinary antigens in human chronic Chagas' disease by agglutination test. *Exp. Parasitol.* 68, 208-215.
- Khan, T., Corral, R.S., Freilij, H.L., Grinstein, S., 1983. Detection of circulating immune complexes, antigens and antibodies by enzyme linked immunosorbent assay in human *Trypanosoma cruzi* infection. *IRCS Med. Sci.* 11, 670-671.
- Köberle, F., 1968. Chagas' disease and Chagas' syndrome: The pathology of American Trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* 6, 63-116.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural process during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lannes-Vieira, J., Dardenne, M., Savino, W., 1991. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. Ontogenic studies and modulation by glycocorticoid hormones. *J. Histochem. Cytochem.* 39, 1539-1546.

- Lowry, H. Rosebrough, N.J., Farr, L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Martins, M.S., Hudson, L., Krettli, A.U., 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.
- Morrot A., Strickland, D.K., Higuchi, M.L., Reis, M., Pedrosa, R., Scharfstein, J., 1997. Human T cell responses against the major cysteine proteinase (cruzipain) of *Trypanosoma cruzi*: role of the multifunctional alpha2-macroglobulin receptor in antigen presentation by monocytes. *Int. Immunol.* 9, 825-834.
- Nasser, J.R, Gómez, L.E, Sanchez, D., Guerin, M., Basombrío, M.A., 1997. Immunogenicity of the recombinant SAPA protein of *Trypanosoma cruzi* for mice. *J. Parasitol.* 83, 76-81.
- Nathan, C., Sporn, M., 1991. Cytokines in context. *J. Cell. Biol.* 113, 981-986.
- Norris, K.A., Harth, G., So, M., 1989. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Infect. Immun.* 57, 2372-2377.
- Norris, K.A., Bradt, B., Cooper, N.R., So, M., 1991. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay accelerating factor. *J. Immunol.* 147, 2240-2247.

- Norris, K.A., Schimpf, J.E., 1994. Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 6, 236-243.
- Ouassi, M.A., Afchain, D., Capron, A., Grimaud, J.A., 1984. Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* and their biological function. *Nature* 308, 380-382.
- Ouassi, M.A., Taibi, A., Cornette, J., Velge, P., Marty, B., Loyens, M., Esteva, M., Rizvi, F.S., Capron, A., 1990. Characterization of a major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitology* 100, 115-124.
- Ouassi, M.A., Taibi, A., Loyens, M., Martin U., Afchain, D., Maidana, C., Caudioti, C., Cornette, J., Martelleur, A., Velge, P., Marty, B., Capron, A., 1991. *Trypanosoma cruzi*: a carbohydrate epitope defined by monoclonal antibody as a possible marker of the acute phase of human Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45, 214.
- Petry, K., Eisen, H., 1989. Chagas' disease: a model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol. Today* 5, 111-116.
- Pollevick, G.D., Affranchino, J.L., Frash, A.C.C., Sánchez, D.O. 1991. The complete sequence of a shed acute-phase antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47, 247-250.
- Rassi, A., Luquetti, A.O., Rassi, A. Jr., Rassi, S.G., Rassi, A.G., 1992. Chagas' disease clinical features, In Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M.E. Rassi, A. (Eds.), *Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine*. Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, Rio de Janeiro, Brazil. pp. 81-101.

- Ribeiro dos Santos, R., Hudson, L., 1980a. *Trypanosoma cruzi*: binding of parasite antigens in mammalian cell membranes. *Parasite Immunol.* 2, 1-10.
- Ribeiro dos Santos, R., Hudson, L., 1980b. *Trypanosoma cruzi*: immunological consequences of parasite modification of host cell. *Clin. Exp. Immunol.* 40, 36-41.
- Ribeiro dos Santos, R., Rossi, M.A., Laus, J.L., Silva, J.S., Savino, W., Mengel, J., 1992. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 175, 29-39.
- Santos-Buch, C.A., Teixeira, A.R.L., 1974. The Immunology of experimental Chagas' disease. III Rejection of allogeneic heart cells *in vitro*. *J. Exp. Med.* 140, 38-53.
- Savino, W., Villa-Verde, D.M.S., Lannes-Vieira J., 1993. "Extracellular matrix proteins in intrathymic T-cell migration and differentiation? *Immunol. Today* 14,158-161.
- Scharfstein,J., Schecther, M., Senna, M. Peralta, J.M., Mendonça-Previato, L., Miles, A.M., 1986. *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of a 57/51000 molecular mass surface glycoprotein (GP-57-51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J. Immunol.* 137,1336-1341.
- Scharfstein,J., Morrot, A., 1999. A role for extracellular amastigotes in the immunopatology of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 51-63.
- Schenkman, S., Yoshida, N., Aimuda, M.L. C., 1988. Glycophosphatidylinositol-anchored proteins in metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29, 141-152.

- Schenkman, S., Diaz, C., Nussenzweig, V., 1991. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. *Exp. Parasitol.* 72, 76-86.
- Schenkman, S., Pontes de Carvalho, L.C., Nussenzweig, V., 1992. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *J. Exp. Med.* 175, 567-575.
- Schenkman, S., Eichinger, D., Pereira, M.E.A., Nussenzweig V., 1994. Structural and functional properties of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 499-523.
- Shimizu, Y., Shaw, S., 1991. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *Faseb J.* 5, 2292-2299.
- Silva, A.A., Roffê, E., Lannes-Vieira, J., 1999. Expression of extracellular matrix components and their receptors in the central nervous system during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 593-600.
- Silva, J.C., Pirmez, C., Morgado, M., Galvão-Castro, B., 1985. Immunopathology of experimental *Trypanosoma cruzi* infection: relation of immune complexes and others features with muscle lesions during infection. *Parasite Immunol.* 7, 457-466.
- Silva, L.H.P., Nussenzweig, V., 1953. Sôbre uma cepa do *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* 20, 191-207.
- Soares, M.P.B., Ribeiro dos Santos, R., 1999. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 257-262.

- Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., Shaw, S., 1993. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 β . *Nature* 3, 79-82.
- Tarleton, R.L., Zhang, L., Downs, M.O., 1997. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas' disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 3932-3937.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- Umezawa, E.S., Nascimento, M.S., Kesper N. Jr., Coura, J.R.; Borges-Pereira, J.; Junqueira, A.C.V., Camargo, M.E., 1996. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute and chronic Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2143-2147.
- Velge, P., Ouassi, M.A., Cornette, J., Afchain, D., Capron, A., 1988. Identification of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding protein: possible role in cell-parasite interaction. *Parasitology* 97, 1-14.
- Williams, G.T., Fielder, L., Smith, H., Hudson, L., 1985. Adsorption of *Trypanosoma cruzi* proteins to mammalian cells *in vitro*. *Acta Trop.* 42, 33-38.

- Yokayma-Yasunaka, J.K.U., Pral, E.M.F., Oliveira Jr., O.C., Alfieri, S.C., Stolf, A.M.S., 1994. *Trypanosoma cruzi*: Identification of proteinases in shed components of trypomastigote forms. *Acta Trop.* 57, 307-315.
- Yoshida, N., 1986. *Trypanosoma cruzi*: recognition of trypomastigote surface antigen by lytic antisera from mice resistant to acute infection. *Exp. Parasitol.* 61, 184-191.
- Zhang, L., Tarleton, R. L., 1996. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associate MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp. Parasitol.* 84, 203-21
- Zweerink, H.J., Weston, H.D., Andersen, F., Garber, S., Hayes, E.C., 1984. Immunity against infection with *Trypanosoma cruzi* in mice correlates with presence of antibodies against three trypomastigote polypeptides. *Infect. Immun.* 46, 826-830.

Figures Legends

Fig. 1. Autoradiography of total parasite antigens and released polypeptides. Parasites were metabolically labeled, with [³⁵S] methionine for 1h at 37°C. The pattern of total labeled trypomastigotes proteins (A) and released polypeptides (12 µg) in culture medium after 3 hours at 37°C (B) are shown. The molecular mass markers are indicated.

Fig. 2. Reactivity of anti-*T. cruzi* polyclonal rabbit antisera and monoclonal antibodies to trypomastigote released proteins. The antigens (20 µg/slot) were resolved by SDS-PAGE in 8.5% polyacrilamide gels. The Western blots were probed with sera from *T. cruzi* infected rabbits (A), monoclonal antibody (m Ab 39) that recognises *trans*-sialidase (B) and monoclonal antibody anti-gp 51 (C).

Fig. 3. Detection of *T. cruzi* antigens adsorbed to L929 fibroblast cells. Cell cultures non-treated (a and c) or treated with released parasite antigens (b and d) were stained with polyclonal anti-*T. cruzi* antibody (a and b) and monoclonal antibody anti-gp51 (c and d). Immunocytochemistry is described under Materials and Methods. Original magnification x 400.

Fig. 4. Interaction of trypomastigote released antigens with L929 cells revealed by electron microscopy. L929 cells were incubated with *T. cruzi* antigens for 8h and afterward embedded in lowicryl hydrophilic resin. Parasite antigens were revealed by anti-*T. cruzi* polyclonal rabbit serum. Gold-labeled membrane vesicles were observed attached to L929 cell microvilli. Bar (1 cm)=200 nm (A). These parasite-derived antigens were sometimes internalized by the cultured cells. Bar (1 cm)=460 nm (B).

Fig. 5. Autoradiography of *T. cruzi* polypeptides adsorbed to cells. The supernatants containing released antigens from trypomastigotes (over 3 h at 37°C) were incubated at 37°C and 4°C (2 h) with L929 and C2C12 cells. After washing and extraction with lysis and sample buffer, the proteins were resolved by SDS-PAGE; in (1) and (2) C2C12 and 929 cells were incubated at 4°C; in (3) and (4) C2C12 and L929 cells were incubated at 37°C. The pattern of total released antigens before interaction is shown in (5). The molecular mass markers are indicated.

Fig. 6. Detection of cysteine proteinase adsorbed to non-infected cells. 3×10^3 LLC-MK₂ cells/well were incubated with (5µg/ml) cysteine proteinase (2 h, 37°C) and after washing (RPMI medium and PBS) the cells underwent extraction with lysis and sample buffer. The proteins were resolved by SDS-PAGE and the gel eletroblotted. The enzyme was revealed by anti-gp51 monoclonal antibody: (A)

control enzyme, (B) enzyme detected after incubation with cells, (C) non-treated control cells.

Fig. 7. Detection of extracellular matrix components expressed by L929 fibroblast. Non-treated (a, c and e) or treated with released parasite antigens (b,d and f) cell cultures were stained with polyclonal antibodies recognizing fibronectin (a and b), laminin (c and d) and type 1 collagen (e and f). Immunocytochemistry is described under materials and methods. Original magnification X 400.

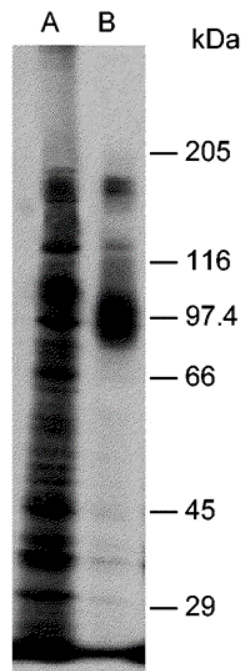


Figure 1

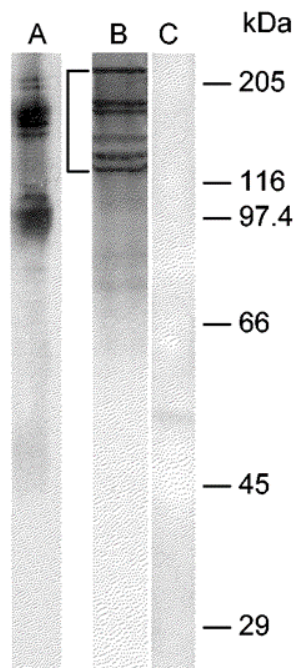


Figure 2

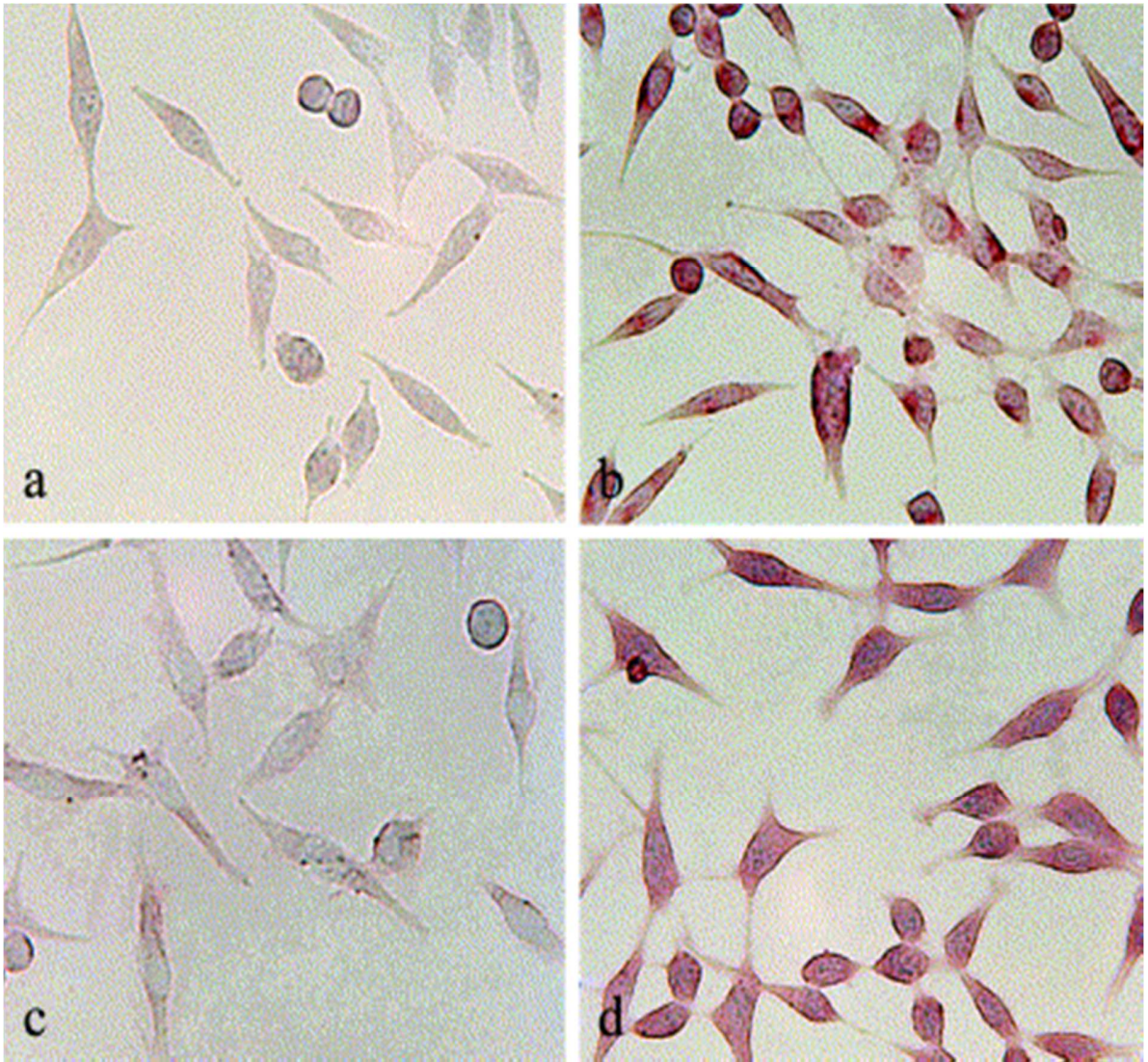


Figure 3

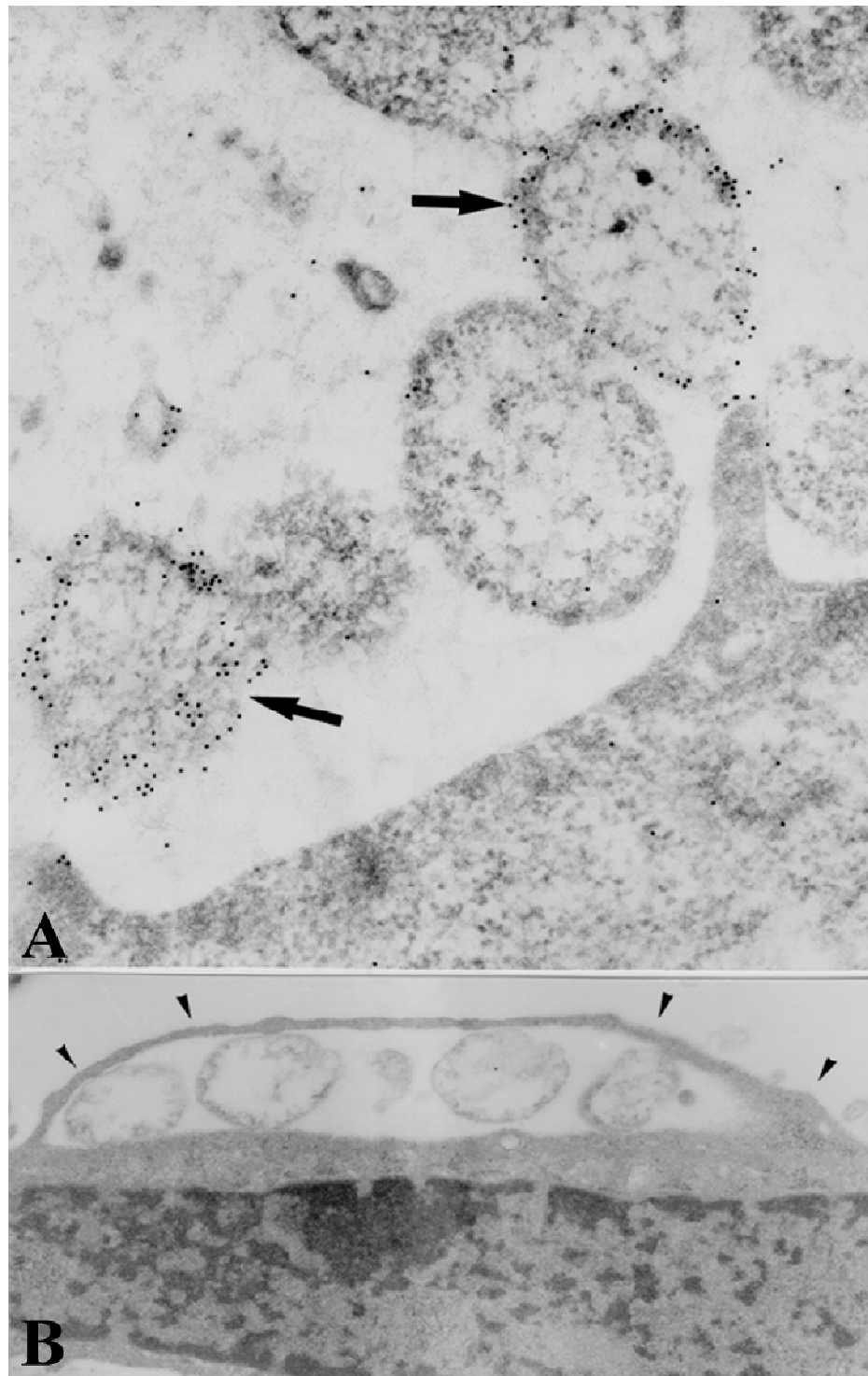


Figure 4

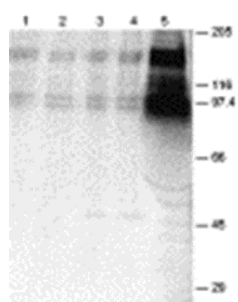


Figure 5

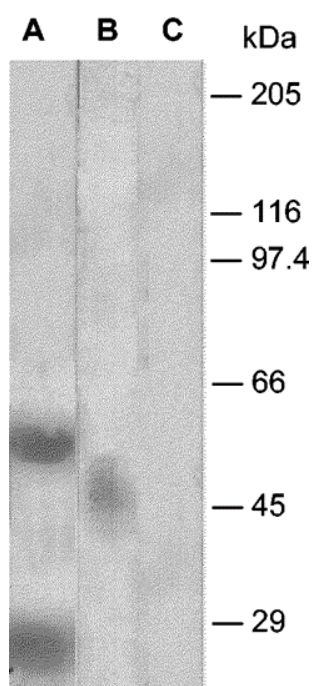


Figure 6

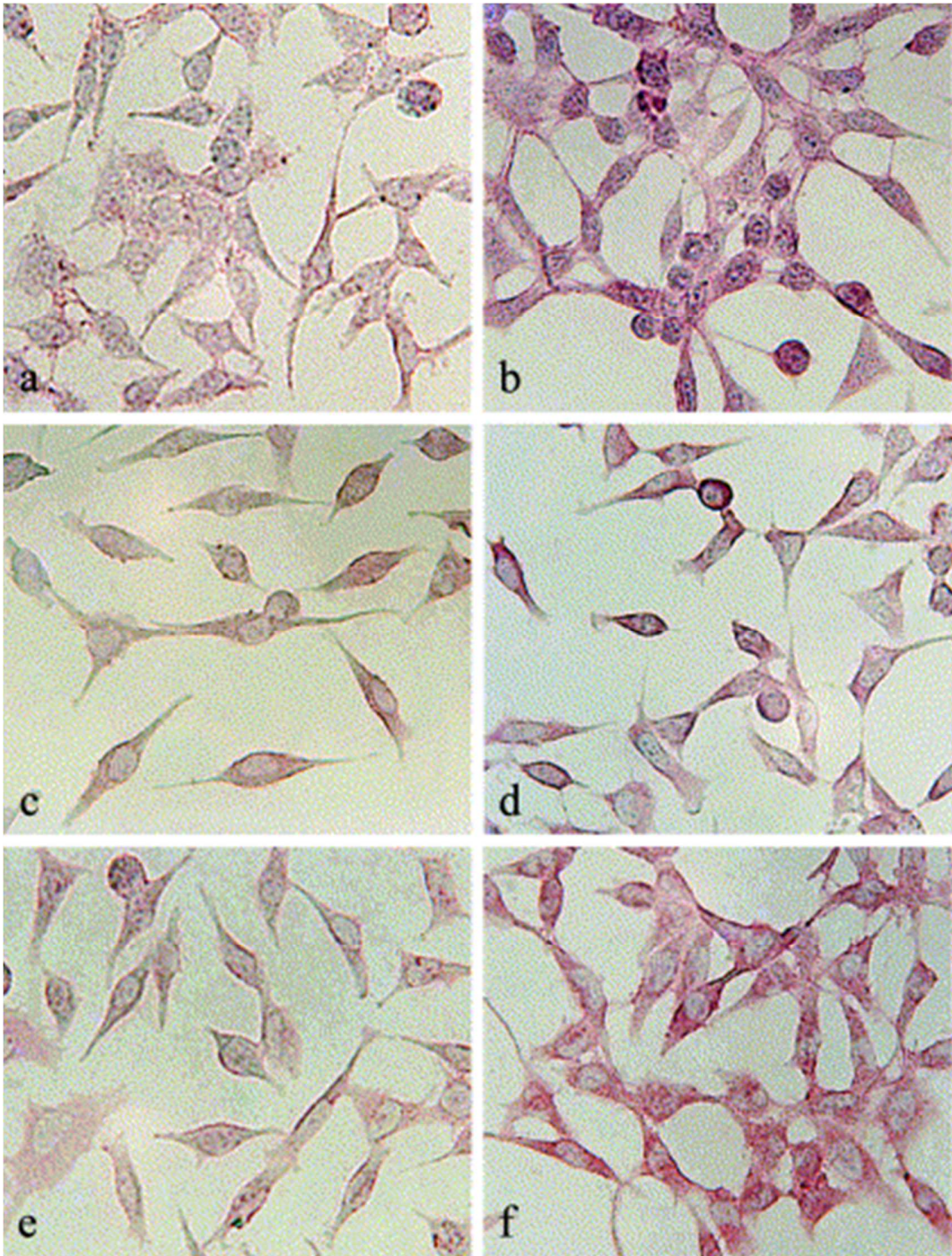


Figure 7

Table 1 . Detection of different components of extracellular matrix in mammalian cells treated with *T. cruzi* released antigens

	Extracellular matrix components		
	Fibronectin	Laminin	Type I collagen
L929			
Non-treated	+ ^a	+	+
Released antigen	++	++	++
C2C12			
Non-treated	+	+	-
Released antigen	+++	++	-

^a Intensity of labelling defined as: -, no reaction; +, weak reaction; ++, moderate reaction; +++, intense reaction.

***Documento 3**

As enzimas de protozoários têm sido amplamente estudadas, tendo papéis fundamentais tanto na sobrevivência do parasito como na patologia causada ao hospedeiro. Deste modo, o isolamento e a caracterização destes antígenos podem ser ferramentas importantes tanto no diagnóstico como no tratamento da doença de Chagas. Aqui, nos propusemos a isolar e identificar novas proteinases do *Trypanosoma cruzi*.

Para isto, obtivemos através de coluna de afinidade de agarose-pepstatina A, duas proteinases (CZP-I e CZP-II). A atividade destas enzimas foi observada através de SDS-PAGE copolimerizado à gelatina na região de 56-48 kDa e esta atividade enzimática ocorreu em pH 3,5. Ambas as enzimas foram inibidas pela pepstatina A e pelo 1,2-epoxy-3-(phenyl-nitrophenoxy) propane (EPNP). Soros produzidos em coelhos contra estas enzimas detectaram a presença destas em todas as formas evolutivas do parasito (Anexo II) e também foram reconhecidas por soro e salivas de pacientes (Anexo III, Anexo IV). A análise do dicroísmo circular demonstrou que a estrutura secundária de CZP-I, porém não a de CZP-II, é afetada pelo detergente CHAPS - (3-[colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato (Anexo V). O Km e a Vm da enzima CZP-I foi de 90,93 μ M e de 0,517 D.O./min/mg/proteína. O conteúdo de α -hélice, estruturas β , e estruturas não ordenadas foi de 9, 62 e 17, respectivamente.

Nossos estudos bioquímicos mostraram a presença de duas formas de aspártico proteinases em *T. cruzi*.

*Artigo submetido para publicação

Trypanosoma cruzi: Isolation and characterization of aspartyl proteases

Rosa T. Pinho a, Leila M. Beltramini d, Carlos R. Alves b,, Salvatore G. De-Simonec,

Abstract

Two aspartyl proteases activities were identified and isolated from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: cruzipain-I (CZP-I) and cruzipain-II (CZP-II). One was isolated from a soluble fraction (CZP-II) and the other was solubilized with 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CZP-I). The molecular mass of both proteases was estimated to be 120 kDa by HPLC gel filtration and the activity of the enzymes was detected in a doublet of bands (56 and 48 kDa) by substrate-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide-gelatin gel electrophoresis. Substrate specificity studies indicated that the enzymes consistently hydrolyze the cathepsin D substrate Phe-Ala-Ala-Phe (4-NO₂)-Phe-Val-Leu-O₄MP but failed to hydrolyze serine and other protease substrates. Both proteases activities were strongly inhibited by the classic inhibitor pepstatin-A ($\geq 68\%$) and the aspartic active site labeling agent, 1,2-epoxy-3-(phenyl-nitrophenoxy) propane ($\geq 80\%$). These findings show that both proteases are novel *T. cruzi* acidic proteases. The physiological function of these enzymes in *T. cruzi* has under investigation.

Keywords

Trypanosoma cruzi; Proteases; Cathepsin D; Pepstatin-A; Chromatographic

1. Introduction

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas' disease, infects 18 million people in the Americas. The World Health Organization (WHO) estimates that 300,000 new cases of Chagas' disease occur every year (WHO, 2001). The maintenance of the chronic infection is due to the development of resistance to available drugs. Unfortunately, despite impressive advances in understanding the biology of *T. cruzi*, the only drugs currently available against this organism are those that have been available for 21 years ago: nifurtimox and benznidazole. These drugs are toxic and the efficacy of the therapy is significantly greater during the acute rather than the established chronic phase. Since no immunoprophylactic vaccine for the prevention of the disease has been available, it is important to identify new targets of therapy such as key parasitic enzymes.

Parasite proteases are being extensively studied to elucidate their roles in parasite survival and pathogenicity. Biochemical characterization of these enzymes is of interest not only to understand specificities of proteases in general, but also to evaluate their possible roles in parasitic infections and exploit them as targets for rational drug development.

Various proteases have been detected in *T. cruzi*, such as cysteine (Rangel et al., 1981, Ashall, 1990 and Nort et al., 1990) and serine proteases (Bongertz and Hungerer, 1978). The major cysteine protease (cruzipain) is immunogenic and was suggested as a useful tool for diagnostic purposes (Scharfstein et al.,

1985 and Kaplan et al., 1998). Other proteases include the oligopeptidase B, a member of the prolyl-oligopeptidase family of serine peptidases, involved in cell invasion by trypanosomes (Burleigh and Andrews, 1998). Additionally, the expression of metalloprotease activities during metacyclogenesis in various strains and clones of *T. cruzi* has been investigated (Lowndes et al., 1996). However, the class of enzymes known as aspartic proteases (APs) has not yet been characterized in *T. cruzi*, until now. APs are widely distributed in living organisms and have been extensively studied and characterized in mammalian, plants (Rawlings and Barrett 1995), HIV (Kohl et al., 1988 and Wlodawer) and some protozoa such as *P. falciparum* (Goldberg et al., 1991 and Gluzman et al., 1994).

The aspartic proteases are active at acidic pH, inhibited by pepstatin-A, and show a conserved three dimensional structure with two Asp residues in the active cleft (Tang and Wong, 1987 and Davies, 1990). These proteins are produced as larger inactive pre-pro-enzymes (zymogens), which are subsequently converted into active enzymes upon acidification. In general, activation involves cleavage of the N-terminal region (James and Sielecki, 1986 and Rawlings and Barrett, 1995) and APs in the mature state are predominantly found in a two chain form (Tang and Lin, 1994).

The treatment against diseases such as acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and hypertension by aspartyl-proteinase inhibitors have generated enormous interest in the characterization of these enzymes (Scharpe et al., 1991) Herein, we describe for the first time the isolation of two aspartic proteases activities from *T. cruzi*, which we have named CPZ-I and CPZ-II, and evaluate some of their biochemical properties.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Resin and detergents (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA): pepstatin-A agarose and 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), Triton X-100. Peptide substrates (Sigma): cathepsin D, Phe-Ala-Ala-Phe(4-NO₂)-Phe-Val-Leu-O₄MP; elastase, Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide; chymotrypsin, N-Succinyl-Ala-Ala-Val-Ala-p-nitroanilide and N-Succinyl-Gly-Gly-Phe-p-nitroanilide; papain, p-Glu-Phe-Leu p-nitroanilide; chymotrypsin, N-Glutaryl-Gly-Gly-Phe- α -naphthylamide; cathepsin B and L, N-Cbz-Phe-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide; collagenases, N-Cbz-Pro-Ala-Gly-Pro 4-methoxy- β -naphthylamide; substrate for rANP precursor processing enzyme, N-t-Boc-Ala-Gly-Pro-Arg-7-amido-4-methylcoumarin; pig calpain I and II. N-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methyl-coumarin. Protease inhibitors (Sigma): serine protease, phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) and benzamidine; chymotrypsin-like serine protease and cysteine protease: 1-1-chloro-3-[4-tosylamido]-4-phenyl-2-butanone (TPCK); cysteine proteases, 1-trans-epoxysuccinyl-leucylamide-(4-guanidino)-butane (E-64); metallo-proteases, 1,10-phenanthroline (O-Phe); aspartic proteases, pepstatin-A and 1,2-epoxy-3-(phenyl-nitrophenoxy) propane (EPNP).

2.2. Isolation of the aspartyl proteases

Epimastigotes forms of *T. cruzi* Y strain were maintained in liver infusion tryptose (LIT) medium (Camargo, 1964), and harvested at the log phase (5th

day) by centrifugation (three times, 1500g, 30 min), in PBS. Immediately, the parasites were disrupted by 10 cycles of freezing and thawing, in the same buffer, and the pellet and supernatant were obtained by centrifugation (100,000g, 45 min, 4 °C). The supernatant was reserved (aqueous) and 0.1 M Tris-HCl, pH 7.2, containing 1% CHAPS was added to the pellet (detergent fraction); at all the steps with the detergent fraction the buffers contain 1% CHAPS. The suspension was stirred for 16 h at 4 °C and after centrifugation, as above, the new pellet was discarded. Both fractions (aqueous and detergent) were dialyzed separately, overnight, against 0.1 M sodium acetate, pH 3.5, containing 1.0 M NaCl buffer. Then, the soluble and detergent proteins were obtained by centrifugation (100,000g, 45 min, 4 °C) and applied onto a pepstatin-A agarose column (1 × 2.5 cm). The equilibrating buffer was 0.1 M sodium acetate, pH 3.5, containing 1.0 M NaCl and the elution buffer was 0.1 M Tris-HCl, pH 8.6, containing 1.0 M NaCl. All steps of affinity chromatography were carried out at 5 °C, and the effluent was monitored at 280 nm. The aqueous and detergent-soluble obtained fractions were denominated as CZP-I and CZP-II, respectively. The protein concentration was determined using the Lowry's method (Lowry et al., 1951) with bovine serum albumin as standard.

2.3. Size exclusion HPLC and molecular mass determination

An aliquot of 100 µg (20 ml) of the pooled pepstatin-A chromatographic peak was injected onto a Shinpack Diol-150 HPLC column (50 cm × 7.9 mm, ID), previously equilibrated in 50 mM phosphate buffer (pH 7.2), and the proteins were fractioned at a flow-rate of 1 ml min⁻¹ for 28 min at 25 °C. For

molecular mass characterization, the column was calibrated with standard molecular mass MWGF-70 kit, (Sigma) in the same buffer. For the detergent-extractable fraction, the analysis was carried out in 50 mM phosphate buffer containing 1% CHAPS. The enzymatic protease activity was monitored using Phe-Ala-Ala-p-NO₂-Phe-Phe-Val-Leu-4PME as substrate.

2.4. Polyacrylamide gel electrophoresis

The SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) was performed using 12.5% or 10% gels in buffers under reducing and non-reducing conditions (Laemmli, 1970). The gels were silver or Coomassie blue stained. Protease activities were examined after electrophoretic separation in 12% resolving SDS–PAGE containing copolymerized 1% gelatin. After electrophoresis, gels were washed for 1 h at room temperature, under agitation, in 2.5% (v/v) Triton X-100 and then incubated (16 h, 37 °C) in 0.1 M sodium acetate buffer pH 3.5, containing 1.0 M NaCl. The active bands were revealed by staining with Coomassie blue. The molecular mass markers used were SDS-6H (Sigma) and LMW-SDS (Amersham Pharmacia Biottech).

2.5. Enzyme assays

Peptide substrates were digested in 0.1 M sodium acetate, pH 3.5, at 25 °C for 60 min since the enzymes showed the highest activity at pH 3.5–4.0 on denatured haemoglobin (data not shown). After addition of the enzymes (10 µg), digestion of substrates (0.1 mM) was monitored by changes in absorbance at 300 nm (Phe-Ala-Ala-Phe (4-NO₂)-Phe-Val-Leu-O₄MP); 340 nm (N-Gly-

Gly-Gly-Phe-NHnap, N-CBZ-Phe-Arg-NHnap, N-CBZ-Pro-Ala-Gly-Pro-NHnap); 380 nm (N-t-Boc-Ala-Gly-Pro-Arg-HMec, N-Suc-Leu-Tyr-NHMec); and 405 nm (Ala-Ala-Ala-pNan, N-Suc-Ala-Ala-Val-Ala-pNan, N-Suc-Gly-Phe-pNan, p-Glu-Phe-Leu-pNan). The variation of the absorbance at each wavelength was followed for 60 min and the speed of the reaction defined using the formula $v = [s - s_0]/(t - t_0)$, where v is the velocity, $[s - s_0]$ is the final substrate concentration minus initial substrate concentration, and $(t - t_0)$ is the final time minus initial time (Alves et al., 2005). The assays were controlled for self-liberation of the conjugated chromogenic over the same time interval. The enzymatic activity was expressed in $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}$ of protein⁻¹.

2.6. Effects of inhibitors

The type of protease was determined using specific inhibitors for each of the known protease classes. The following inhibitors were used PMSF, TPCK, benzamidine, TLCK, EPNP, and pepstatin-A. All the inhibitors were used at 10 μM final concentration and were pre-incubated with the enzyme for 5 min at room temperature before addition of the substrate. For stock solutions, PMSF was prepared in isopropanol, TPCK and O-Phe in methanol, and the other inhibitors were dissolved directly in the assay buffer (0.1 M sodium acetate, pH 3.5, with 1% CHAPS added for assays of the detergent fraction). The pre-incubated solution of protease with inhibitors was then added to a peptide substrate (Phe-Ala-Ala-Phe (4-NO₂)-Phe-Val-Leu-O₄MP) solution for 60 min, at 25 °C. Appropriate controls were carried out in parallel using the same enzyme solutions free of inhibitor.

3. Results

3.1. Isolation of AP from *T. cruzi*

The electrophoresis analysis of CZP-I and CZP-II partially purified enzymes were performed under reducing and non reducing conditions. SDS-PAGE under reducing conditions resolved CZP-II into four main bands of molecular mass (Fig 1): 17, 34, 48 and 56 kDa. The final preparation of CZP-I, under non reducing conditions, gave bands corresponding to a molecular mass of 48 and 56 kDa and 34 kDa (Fig 1A). Additionally, an identical pattern of bands was observed by SDS-PAGE either with CZP-I and CZP-II preparations (Fig. 1A), being the 48 and 56 kDa proteins active against gelatin by substrate-SDS-PAGE (Fig. 1B). On the other hand when the gel was Coomassie blue stained a single major band of 56 kDa was detected in both enzymes (Fig 1C). HPLC gel filtration analysis of CZP-II preparation showed two major peaks centered at 120 and 56 kDa (Fig. 2). A similar profile was obtained with the CZP-I fraction (data not shown).

3.2. Enzymatic activities and inhibitors

The specificity toward various synthetic substrates was analyzed and the results are shown in Table 2. Among all assayed substrates, both proteases activities proved to be most active toward Phe-Ala-Ala-Phe (4-NO₂)-Phe-Val-Leu-O₄MP (Table 2) with the activity for the CZP-I fraction being ~5-fold greater than CPZ-II. The activities proteases were confirmed by substrate-SDS-PAGE. The CZP-I and the CZP-II showed two major bands of

acid activities with masses of 56–48 kDa (Fig. 1B). The proteases activities of the CZP-I and CZP-II fractions were inhibited by EPNP and pepstatin-A but not by various others inhibitors of serine, cysteine, or metalloproteases (Table 3).

4. Discussion

Aspartic peptidases are a relatively small group of proteins that has received enormous interest because of their significant roles in human diseases. Aspartic proteases have been successfully targeted for therapy in pathogens such as HIV (Wlodawer and Vondrasek, 1998), *Candida* (Hoegl et al., 1999). The inhibitors of plasmepsins and renin are considered a viable therapeutic strategy for the treatment of malaria and hypertension.

Herein, two pepstatin sensitive proteases activities were isolated by ultracentrifugation and detergent extraction from *T. cruzi* epimastigotes. Both showed maximal proteolytic activity as measured with Phe-Ala-Ala-Phe (4-NO₂)-Phe-Val-Leu-O₄MP as substrate around pH 3.5–4.0.

The active form of the enzyme obtained after ultracentrifugation of the freeze/thawed soluble supernatant extract was named cruzipsin II (CZP-II), in correspondence to the orthologus AP identified in *P. falciparum* (Gluzman et al., 1994). The second active protease was extracted using the detergent CHAPS from the sedimented cellular material and therefore was named cruzipsin I (CZP-I). Both proteases migrated in SDS–PAGE as four bands with 56, 48, 34 and 17 kDa and by substrate-SDS–PAGE as a doublet of active bands with approximately 56 and 48 kDa masses (Fig 1). These profiles of

bands appear to be a common and characteristic result obtained with preparations of affinity columns from different cell types such as mammalian, fungal, and plant enzymes (Barrett and Heat, 1977 and Barrett and Rawlings, 1998) and nematodes (Geier et al., 1999). We (Zamora-Veyl et al., manuscript in preparation) and others (Hasilik et al., 1982) had previously noted that this class of proteins undergoes an elevated process of acid-dependent auto-activation in vitro and thus, the various smaller bands may derive from self-hydrolysis. This fact is reinforced by the results of the HPLC-gel filtration analysis (Fig. 2). However, the multiple bands may correspond to more than one molecular entity as demonstrated in *Caenorhabditis elegans* (Geier et al., 1999). In *C. elegans* Genome Sequencing Consortium were detected 12 genes for this enzyme family (Geier et al., 1999) and at least ten genes in *P. falciparum* genome that encodes aspartic proteases (Coombs et al., 2001). *Toxoplasma gondii* possesses seven genes coding for putative aspartic proteases, identified in the completed genome by homology with known human proteases). Although it would be surprising to find a hydrophobic aspartyl protease in *T. cruzi*, we have perceived that this is possible).

Conversely, both *T. cruzi* enzymes were inhibited by the potent AP inhibitor pepstatin-A ($\geq 68\%$) that binds with high affinity to the active site and also by EPNP ($\geq 80\%$), an active site Asp-label inhibitor. Selective inhibition by EPNP indicated that both *T. cruzi* proteases activities possess the dual aspartates at the active site, the signature configuration of A1 family aspartic proteases a pepsin type member. The other well-characterized aspartic protease families are the viral family A2—type member HIV-1 protease but the isolated proteins in this paper do not have any biochemical proprieties.

Moreover, a set of synthetic peptides substrates and specific inhibitors of APs, established the optimum catalytic efficiency of both *T. cruzi* enzymes against substrates involving hydrophobic residues (preferable aromatic, side-chains) such as the Phe-Ala-Ala-Phe (4-NO₂)-Phe-Val-Leu-O₄MP, a specific substrate for cathepsin-D AP.

Eukaryotic aspartyl proteases are monomeric enzymes which consist of two domains. Each domain contains an active site centered on a catalytic aspartyl residue. These enzymes are synthesized as zymogens that are subsequently proteolytically processed. Crystal structures of native and pepstatin-inhibited forms of some of these enzymes have revealed a high degree of tertiary structural similarity despite the significant differences in their primary structure (Geier et al., 1999). Most of them possess a proregion that interacts with high affinity with the catalytic domains and maintains the zymogen in an inactive state. enzymes of vertebrate/fungal origin consist of ~350 amino acid residues and thus have molecular mass of approximately 40 kDa

An extra Cys residue located at position-6 is responsible for dimerization of two identical 40 kDa subunits to give rise to the 80 kDa form of the native enzyme. By contrast, the retroviral members of the family including the proteinases from HIV-1 and HIV-2 contain only 100 residues and form active enzymes by non-covalent dimerization (Kay and Dunn, 1990). The active *T. cruzi* hydrolases seem to be dimeric proteins composed of identical subunits of 56–60 kDa associated by disulphide bridges, similar to the vertebrate AP (Fig. 1). The incongruous results are in relation to the molecular mass of the

precursor form (120 kDa) that appears to be larger than all APs described so far, except for the planarian AP (Zamora-Veyl et al, manuscript in preparation).

In conclusion, the purification of these proteinases opens the possibility of employing biochemical approaches to clarify aspects relevant to their pathophysiology or for a better understanding of *T. cruzi* biology and its potential as target for chemotherapy and the design of inhibitors to these enzymes. Future studies on the role of this enzyme activity in this parasite and its potential as target for *T. cruzi* chemotherapy are therefore required.

Acknowledgments

This work has been partially supported by the CNPq, FAPERJ, FAPESP and FIOCRUZ (PAPES). Dr. Carlos R. Alves, Dr. Leila M. Beltramini and Dr. Salvatore G. De-Simone are fellows of the CNPq Institution.

References

F. Ashall Characterization of an alkaline peptidase of *Trypanosoma cruzi* and other trypanosomatids *Molecular and Biochemical Parasitology*, 38 (1990), pp. 77–87

A.J. Barrett, M.F. Heat 1978. Lysosomal enzyme and lysosomes

J.J. Diegle (Ed.), *Laboratory Handbook* (second edition), Elsevier North-Holland, Biomedical Press (1977)

A.J. Barrett, N.D. Rawlings, J.F. Woessner (Eds.), *Aspartic peptidases Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, San Diego, CA (1998), pp. 799–986

V. Bongertz, K.D. Hungerer 1978. Trypanosoma cruzi: isolation and characterization of a protease. *Experimental Parasitology*, 45 (1978), pp. 8–18
B.A. Burleigh, N.W. Andrews 1998. Signaling and host cell invasion by Trypanosoma cruzi. *Current Opinion in Microbiology*, 1 (1998), pp. 461–465

E.P. Camargo EP 1964 Growth and differentiation in Trypanosoma cruzi. I—Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 6 (1964), pp. 93–100

G.H. Coombs, D.E. Goldberg, M. Klemba, C. Berry, J. Kay., 2001 Aspartic proteases of Plasmodium falciparum and other parasitic protozoa as drug targets *Trends in Parasitology*, 17 (2001), pp. 532–537

D.R. Davies The structure and function of the proteinases *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 19 (1990), pp. 189–215

G. Geier, H.J. Banai, H. Heid, L. Bini, V. Pallini, R. Zwillig Aspartyl proteases in Caenorhabditis elegans. Isolation, identification and characterization by a combined use of affinity chromatography, two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and databank analysis *European Journal of Biochemistry*, 264 (1999), pp. 872–879

I.Y. Gluzman, S.E. Francis, A. Oksman, C.E. Smith, K.L. Duffin, D.E. Goldberg Order and specificity of the Plasmodium falciparum haemoglobin degradation pathway *Journal of Clinical Investigation*, 93 (1994), pp. 1602–1608

D.E. Goldberg, A.F.G. Slater, R. Beavis, B. Chait, A. Cerami, G.B. Henderson Haemoglobin degradation in the human malaria pathogen Plasmodium falciparum: a catabolic pathway initiated by a specific aspartic protease *Journal of Experimental Medicine*, 173 (1991), pp. 961–969

A. Hasilik, K. von Fugura, E. Conzelmann, H. Nehr Korn, K. Sandhoff Lysosomal enzyme precursors in human fibroblasts. Activation of cathepsin D precursor in vitro and activity of beta-hexosaminidase A precursor towards ganglioside GM2 *European Journal of Biochemistry*, 125 (1982), pp. 317–321

L. Hoegl, H.C. Korting, G. Klebe. Inhibitors of aspartic proteases in human diseases: molecular modeling comes of age. *Pharmazie*, 54 (1999), pp. 319–329

M.N. James, A.R. Sielecki 1986. Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution. *Nature*, 319 (1986), pp. 33–38

D. Kaplan, C. Baldi, G.M. Chiamonte, M.M. Fernandez, M.J. Levin, E. Malchiodi, A. Baldi. Expression of a recombinant Fab antibody fragment against cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*

Biochemical and Biophysical Research Communications, 253 (1998), pp. 53–58

J. Kay, B.M. Dunn. Viral proteinases: weakness in strength Biochemical and Biophysica Acta, 1048 (1990), pp. 1–18

N.E. Kohl, E.A. Emini, W.A. Schleif, L.J. Davis, J.C. Heimbach, R.A. Dixon, E.M. Scolnick, I.S. Sigal. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. Proceedings of National Academy of Science United States of America, 85 (1988), pp. 4686–4690

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

C.M. Lowndes, M.C. Bonaldo, N. Thomaz, S. Goldenberg Heterogeneity of metalloprotease expression in Trypanosoma cruzi Parasitology, 112 (1996), pp. 393–399

O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, L.A. Farr, R.J. Randall Protein measurement with the Folin phenol reagent The Journal of Biological Chemistry, 193 (1951), pp. 265–275

A.M.J. Nort, J.C. Mottram, G.H. Coombs. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. Parasitology Today, 6 (1990), pp. 270–275

H.A. Rangel, P.M. Araujo, I.J. Camargo, M. Bonfitt, D. Repka, J.K. Sakurada,

A.M. Atta. Detection of a proteinase common to epimastigote, trypomastigote and amastigote of different strains of *Trypanosoma cruzi* *Tropenmed Parasitology*, 32 (1981), pp. 87–92

N.D. Rawlings, A.J. Barrett Families of aspartic peptidases and those of unknown catalytic mechanism

A.J. Barrett (Ed.), *Methods in Enzymology*, vol. 248, Academic Press, New York (1995), pp. 105–120

J. Scharfstein, A. Luquetti, A.C. Murta, M. Senna, J.M. Rezende, A. Rassi, L. Mendonça-Previato Chagas' disease: serodiagnosis with purified Gp25 antigen *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34 (1985), pp. 1153–1160

S. Scharpe, I. De Meester, P. Hendriks, G. Vanhoof, M. van Sande, G. Vriend Proteases and their inhibitors: today and tomorrow *Biochimie*, 73 (1991), pp. 121–126

M. Shea, U. Jäkke, Q. Liu, C. Berry, K.A. Joiner, D. Soldati-Favre Rawlings ND, A.J. Barrett AJ. Families of aspartic peptidases and those of unknown catalytic mechanism A.J. Barrett (Ed.), *Methods in Enzymology*, vol. 248, Academic Press, New York (1995), pp. 105–120

J. Tang, X. Lin. Engineering aspartic proteases to probe structure and function relationships. *Current Opinion in Biotechnology*, 5 (1994), pp. 422–427

J. Tang, R.N. Wong Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *Journal of Cellular Biochemistry*, 33 (1987), pp. 53–63

A. Wlodawer, Gustchina A. Structural and biochemical studies of retroviral proteases *Biochimica Biophysica Acta*, 1477 (2000), pp. 16–34

A. Wlodawer, J. Vondrasek 1998. Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 27 (1998), pp. 49–84

World Health Organization, 2001. Control of Chagas disease (<http://www.who.int/en/>), WHO Technical Report Series 905, 109. F.B.

Zamora-Veyl, H.L.M. Guedes, S.G. De-Simone Aspartic proteinase in *Dugesia tigrina* (Girard) planaria. Manuscrito em preparação

Figures Legends

Fig. 1. Electrophoresis profiles of CZP-I and CZP-II fractions obtained by pepstatin-A agarose columns. Electrophoresis profiles of CZP-I and CZP-II fractions (15 μ g) obtained by pepstatin-A agarose columns analyzed in absence (A1 and A 3; and B1 and B3) and in presence (A2 and A4; B2 and B4) of β -mercaptoethanol. The resolved gels (12% A, B and 10% C) were

silver stained (A) or analyzed by gelatin-SDS-PAGE (B). The total aqueous soluble (100,000g) extract of epimastigotes prior to affinity chromatography (C1), the CZP-I (C2) and CZP-II (C3) fractions obtained by Coomassie blue stained. Molecular masses of marker proteins are indicated on the left of each gel.

Fig. 2. HPLC-gel filtration chromatography analysis of the pepstatin-A agarose purified protease (CZP-II) using a Shinpack Diol-150 HPLC column (50 cm × 7.9 mm ID). About 100 µg of protein was analyzed and elution performed using 10 mM phosphate buffer (pH 7.3) at a flow rate of 1 ml min⁻¹. Absorbance was measured at 280 nm using absorbance units full scale (AUFS) = 4.0.

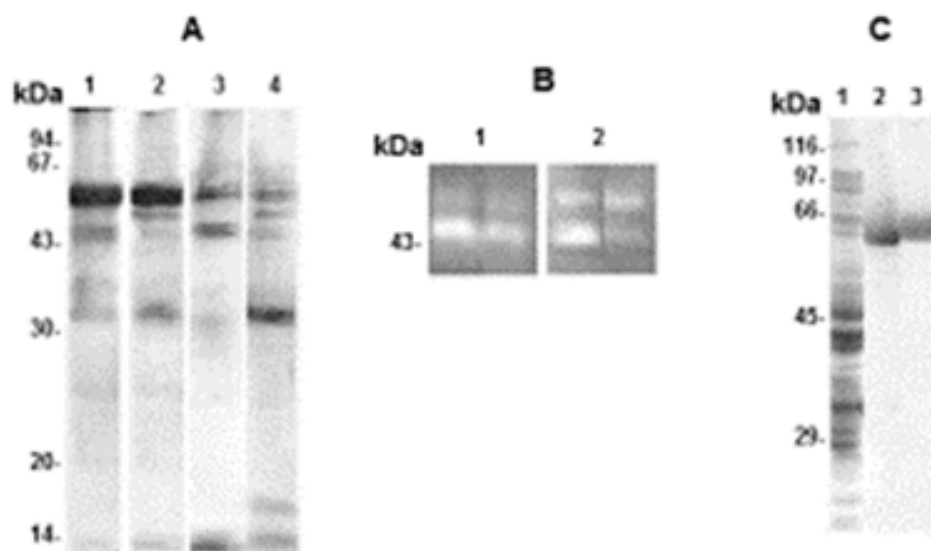


Figure 1

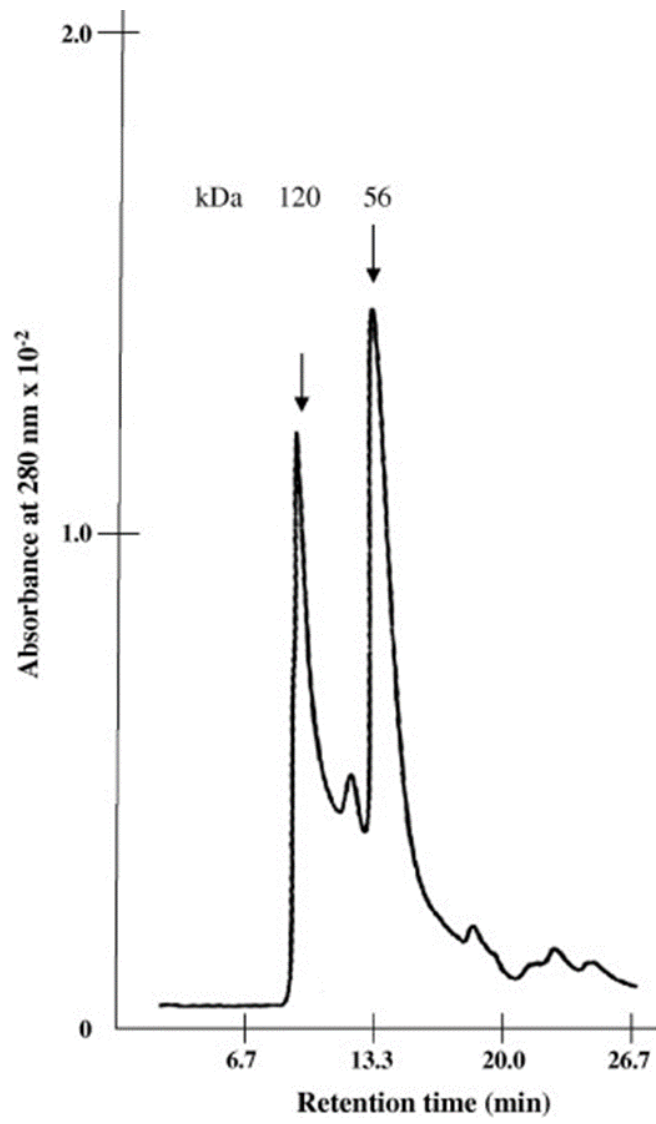


Figure 2

Table 1: Recuperation steps of cruzipain-I and cruzipain-II proteases activities.

Fraction	Total protein (mg)	Total enzymatic activity	Specific activity	Purification (X)	Yield (%)
TcSF	37 ± 2.0	740 ± 10	20 ± 2.0	1	100
CZP-II	1,6 ± 0.3	352 ± 10	220 ± 50	11	43
TcDF	84 ± 4.0	9240 ± 10	110 ± 10	1	100
CZP-I	3.0 ± 0.1	3300 ± 20	1100 ± 90	10	35

Table show the representative data of the protein isolation experiments: *Trypanosoma cruzi* soluble fraction (TcSF) and detergent fraction (TcDF), and cruzipain-I (CZP-I) and cruzipain-II (CZP-II). The assay was performed with Phe-Ala-Ala-Phe(4-NO₂)-Phe-Val-Leu-O₄MP substrate. The total activity of the fractions was expressed as μM of substrate hydrolyzed min⁻¹ and specific activity was expressed as μM of substrate hydrolyzed min⁻¹ mg protein⁻¹.

Table 2

Hydrolysis of chromogenic peptide substrates by cruzipain-I and cruzipain-II enzymes.

Substrates	CZP-I [□]	CZP-II [□]
(1) Phe-Ala-Ala-Phe(4-NO ₂)-Phe-Val-Leu-O ₄ MP	1100 ± 90	220 ± 10
(2) Ala-Ala-Ala- <i>p</i> -nitroanilide	3 ± 0.1	5 ± 0.3
(3) <i>N</i> -Succinyl-Ala-Ala-Val-Ala- <i>p</i> -nitroanilide	15 ± 0.3	14 ± 1.0
(4) <i>N</i> -Glutaryl-Gly-Gly-Phe- α -naphthylamide	0 ± 0.0	0 ± 0.0
(5) <i>p</i> -Glu-Phe-Leu <i>p</i> -nitroanilide	20 ± 1.0	17 ± 2.0
(6) <i>N</i> -Succinyl-Gly-Gly-Phe- <i>p</i> -nitroanilide	0 ± 0.0	21 ± 1.5
(7) <i>N</i> -Cbz-Phe-Arg-4-methoxy- β -naphthylamide	37 ± 1.1	47 ± 3.0
(8) <i>N</i> -Cbz-Pro-Ala-Gly-Pro 4-methoxy- β -naphthylamide	14 ± 2.1	0 ± 0.0
(9) <i>N</i> - <i>t</i> -Boc-Ala-Gly-Pro-Arg-7-amido-4-methylcoumarin	120 ± 9.0	40 ± 2.0
(10) <i>N</i> -Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methyl-coumarin	15 ± 2.0	17 ± 1.5

The assay was performed in a final volume of 500 μ L in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 3.5, containing 1 M NaCl for cruzipain-I (CZP-I) and cruzipain-II (CZP-II).

□

The enzymatic activity values represented by the average and standard deviation (\pm) of three independent experiments. The values are presented in μ M of substrate hydrolyzed min^{-1} mg protein^{-1} .

Table 3.

Effect of various inhibitors on the enzymatic activity of cruzipain-I and cruzipain-II.

Inhibitors (10 μ M)	Inhibitor specificity proteinase	Residual activity (%)	
		CZP-I	CZP-II
PMSF	Serine	100 \pm 9.0	100 \pm 7.0
TPCK	Serine/cysteine	100 \pm 7.0	100 \pm 9.0
Benzamidine	Serine	95.6 \pm 7.0	100 \pm 8.0
E-64	Cysteine	94 \pm 5.0	100 \pm 10.0
O-Phe	Metallo	100 \pm 15.0	97.3 \pm 9.00
EPNP	Aspartic	20 \pm 1.0	14.0 \pm 1.0
Pepstatin-A	Aspartic	32.2 \pm 4.0	5.8 \pm 3.0

The assay was performed in a final volume of 500 μ l in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 3.5, containing 1 M NaCl. The proteases activities cruzipain-I (CZP-I) and cruzipain-II (CZP-II) (10 μ g) were preincubated with 0.1 mM of the substrate Phe-Ala-Ala-Phe(4-NO₂)-Phe-Val-Leu-O₄MP. All the assays were performed in triplicate and the standard deviation of measures were less 10%.

***Documento 4**

Uma vez que obtivemos a partir de formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*, em coluna de afinidade proteínicas com atividade enzimática na faixa de 48-56 kDa (documento 3) e constatamos, através de anticorpos específicos, a presença destas proteinases em todos os estágios do parasito, nos propusemos neste trabalho a estudar a imunogenicidade da proteinase CZP-II no modelo murino.

Deste modo, imunizamos camundongos BALB/c e suíços com a fração CZP-II. Verificamos que a análise de populações celulares isoladas de linfonodos de camundongos BALB/c ao serem estimuladas *in vitro* com esta fração proliferaram com índices de até 10 em relação aos controles. O aumento da proliferação foi proporcional à quantidade de enzima adicionada. Também, foram avaliadas através de imunofenotipagem, as subpopulações das células proliferativas e verificamos um ligeiro aumento de proporção de células CD8+ com decréscimo da população CD4+. A análise de citocinas no sobrenadante mostrou um predomínio de IFN- γ em relação à produção de IL-4. Também detectamos a presença das enzimas em ninhos de *T. cruzi* em miocárdio de camundongos infectados pela cepa Colombiana tanto na fase aguda como crônica (Anexo VI). Deste modo, observamos que esta fração tem atividade imunogênica. A modulação de populações celulares leva-nos a aventar sobre seu papel na imuno-regulação da infecção pelo *T. cruzi*.

*Manuscrito em fase de finalização.

Immunogenicity of a new *Trypanosoma cruzi* aspartic proteinase

R.T. Pinho^{a,*}, C.R Alves^b, T.C.B. Andrade^a, L.R.R. Castello-Branco^a, and S. Giovanni-De-Simone^{b,c},

^aDepartamento de Imunologia, ^bDepartamento Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365 Manguinhos, CP 926, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ^cDepartamento Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, R J.

*Corresponding author: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Imunologia, Laboratório de Imunologia Clínica Av. Brasil, 4365 Manguinhos, CP 926, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

ABSTRACT

The immunogenicity of a new isolated fraction of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes (CZP) was analyzed in an experimental mice assay. Proliferative responses of lymph nodes cells from mice previously immunized with the CZP fraction were higher in BALB/C mice with a 10 fold stimulation index, when the cells were incubated with 2 µg of the CZP) fraction. In the proliferative response a decreased of CD4⁺ cells and a predominance of CD8⁺ T-cell subsets with presence of IFN-γ was detected in the supernatant cultures. Additional studies also detected a low IL-4 cytokine production in these animals. Furthermore the IFN-γ production was detected in sera of Swiss and BALB/C mice previously immunized with the CZP fraction. These data show that the CZ fraction isolated from *T. cruzi* has immunogenic activity in mouse and characteristics of aspartic proteinases class of enzymes.

Key words: *Trypanosoma cruzi*; Chagas' disease; CD4 and CD8 T-cell subset; proteinases; IFN- γ and IL-4.

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi, a hemoflagellate protozoan parasite, is the aetiological agent of American trypanosomiasis (Chagas' disease), which is prevalent in South and Central America affecting up to 18-20 millions of people (WHO, 2001).

The *T. cruzi* can infect a variety of host cell types including macrophages. Inside these cells, replication of amastigotes is followed by the release of trypomastigotes that can virtually reach all host organs through the blood-stream (Brenner, 1973). The resistance to *T. cruzi* infection is observed during the vertebrate infection, and is critically dependent on cytokines-mediated activation and cell-mediated effector mechanisms (reviewed by Abrahamsohn, 1998). The control of the parasite replication can involve cytokines as IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL-2, in innate and specific immune systems of the vertebrates host (Abrahamsohn, 1998). This fact can be related with CD4 T cell-dependent (T helper; Th) protective antibody response and macrophage activation for intracellular killing of the protozoan. Also, the CD8 T cells (T cytotoxic; Tc) effectors mechanisms (Tarleton et al, 1992; Nickell, Stryker & Arevalo, 1993; Rottenberg et al, 1995; Tarleton et al, 1996) take part in immune resistance to *T. cruzi*. Additionally, natural killer cells (NK) have also been shown to play a role in host defense against the infection (Cardillo et al, 1996). After infection, in spite of the vigorous immune response, small numbers of parasites can persist in the host. It has been demonstrated that, *in vivo* activation of Th2 cells can abrogate resistance to *T. cruzi* infection through production of IL-10 and IL-4, indicating that imbalances of Th1/Th2 cell activation might lead to increased or

longer persisting tissue parasitism with consequent worsening of inflammation and tissue damage (Barbosa-de Oliveira et al, 1996).

In spite of these studies of immunological response *T. cruzi* infection, few studies have been developed to investigate the participation of proteinases on the parasite survival and their pathogenicity. Some important studies have been proposed for cysteine proteinases (gp 57/51; cruzipain), which are present during all parasite cycle forms (Cazzulo et al., 1989; Cazzulo, 1999). They are highly immunogenic and may play a role in diverting the host immune response (Arnholdt & Scharfstein, 1991). Humoral immune responses against cysteine proteinase from *T. cruzi* have been detected in human sera obtained from patients with chronic Chagas' disease (Martinez et al., 1991). Therefore, it could be possible to use this molecule for the diagnosis of Chagas' disease (Kaplan et al., 1998). Analysis of T cell response against *T. cruzi* antigens indicated that chronic patients often develop T lymphocyte proliferative responses in culture (Gazzinelli et al, 1990). These cells have been characterized as T cell lines that belong to the inflammatory Th1 subsets (Arnholdt et al., 1993). The cruzipain T cell stimulatory activity, combined with its ability to promote tissue damage by proteolysis, could contribute to the initiation and/or amplification of some pathological processes. The preferential localization of T cell epitopes in the catalytic domain of these antigens can be predicted, based on some general considerations of antigen-processing mechanism (Scharfstein et al, 1993).

The regulatory role of the proteinases from *T. cruzi* may be very important in controlling the pathogenesis associated with activation of Th1-type cytokine response. Thus, in the present study we intend to investigate some aspects of the immunogenicity of a new acidic proteinase (CZP-II) isolated from *T. cruzi*.

MATERIAL AND METHODS

Mice and parasites

Female BALB/C and Swiss mice, 5 to 7 weeks old, were obtained from breeding stocks maintained at the FIOCRUZ facility. Epimastigotes of *T. cruzi* Y strain (Silva

and Nussenzweig, 1953) maintained in liver infusion tryptose (LIT) medium (Camargo, 1964) were harvested by centrifugation, washed three times at 1500 x g with 150 mM phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4.

Isolation of the aspartic proteinase

The purification of the proteinase was conducted as previously described using a pepstatin A-agarose (Sigma) column (1cm x 2.5cm, D.I.). Protein concentration was determined according to the Lowry's method (Lowry et al., 1951).

Immunization procedures

Groups of 6 animals were injected subcutaneously at the base of tail with 50µg of proteinase fraction (CZP-II), at a seven-day interval, for three times: the first time, CZP was emulsified in 100µl of complete Freund's adjuvant (Sigma), the second injection was done with incomplete adjuvant and third time, the protein was injected alone. Control group received adjuvant with PBS. One week later the last booster, the mice were scarified and the lymph node cells used for proliferation assays.

Proliferative assays

Cells from lymph node tissue were obtained through steel mesh screen (Sigma) filtration and the cells, resuspended in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 2% fetal calf serum, 10mM Hepes, 1.5mM L-glutamine, 100 IU/ml gentamicin and 0.05% β-mercaptoetanol. The cells (2×10^5 /well) were distributed in 96-well flat-bottomed microtiter plates (Nunc A/S, Roskilde, Denmark), in final volume of 200 µl and incubated for three days at 37° C in a 5% CO₂, humidified atmosphere. Tested cells were incubated in the presence of concanavalin A (2 µg) and CZP proteins (2-20µg). The cells were pulsed with 1µCi of [³H] thymidine (Amersham) for 16 h and harvested on paper filters (Titertek, Flow Laboratories, Rockville, MD). The radioactive uptake was measured in a β-counter (1600 CA, Packard Instrumental Company, Downers Grove, IL, USA). Each proliferation assay was done in triplicate at least twice. Results were expressed as stimulation index (SI = mean cpm in wells containing antigens divided by background [mean cpm in non-stimulated wells]). Values equal or higher than 2.5 were considered positive.

Phenotypic analysis of T cells

Lymph node cells (10^6 /ml) from immunized mice were cultured in 24-well flat-bottomed plates (Nunc) in a final volume of 1 ml/well under the same conditions described above. After three days in culture, the cells were harvested, washed twice (500 g, 10 min at 4° C) and resuspended in fixative solution (0.1% formalin and 0.05% sodium azide, in PBS pH 7.2). The cell number was then adjusted to 10^6 cells/200 μ l and incubated for 30 min at 4° C with anti-mouse monoclonal antibody specific for either CD4 and CD8 molecules (Sigma). Cells were then washed three times and analyzed by flow cytometry (EPICS 751, Coulter). The analysis was done in lymph node cells from three mice.

Cytokine assays

Samples of serum and supernatant of cell cultures of immunized animals were collected, stored at -70° C until use. IL-4 and IFN- γ levels were determined by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using commercial kits (Genzyme, Cambridge, MA, USA). The results were expressed as pg/ml of cytokine and compared with standard curves provided by the kit manufacturer. Each experiment was done at least twice.

RESULTS

The immunogenicity of the CZP fraction was studied in immunized BALB/C mice and a high proliferative responses of T cells was observed. The results of proliferative response against CZP-II protein are shown in figure 1. An increase in the proliferative response of BALB/C mice lymph node cells was observed in the presence of CZP-II proteins. The maximal response was obtained in presence of 20 μ g of the CZP protein, ($4\ 400 \pm 20$ cpm - mean SI - 12.6 ± 1.6). The lymphoproliferative response of cells stimulated with 2 μ g of Con A, was 4000 ± 200 cpm.

The phenotyping analysis of the T-cell population showed a decreased of CD4+ cells and a predominance of CD8+ T cells in the cultures of mice immunized with

CZP-II protein. The addition to the wells of 2-20 μg of CZP-II protein decreased the CD4⁺ T-cell population (Table I).

Cytokine detection was done in supernatants of the cell cultures and in the sera of mice immunised with CZP-II protein. Upon incubation with 2 μg (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of CZP-II proteins an increase in IFN- γ in supernatant cells of BALB/C mice. This cytokine was detected in sera from Swiss and BALB/C mice immunized. While the quantity of IL-4 was low both in the sera and supernatant (Fig 2, Table II). The mean of IFN- γ production was 1.160 pg ml^{-1} (± 700) when challenged with 2 μg of CZP-II protein. The production of cytokine in control cells (2 μg of concanavalin A) was detected in the supernatant of BALB/C cell cultures (IL-4, 75 pg ml^{-1} and IFN- γ , 1634 pg ml^{-1}).

DISCUSSION

We have isolated from epimatigotes a pepstatin A binding fraction which contains mainly polypeptides with 56, 48 and 32 kDa. This protein contains aspartic proteinase activity whose molecular mass appears to be 56-48 as demonstrated by substrate SDS-PAGE (Pinho et al., unpublished results).

The predominance of CD8⁺ T cells indicate that MHC class I molecules are able to recognize epitopes from the CZP fraction. The role of CD8⁺ T cell population in immune control of *T. cruzi* infection and subsequent development of disease has been examined using gene knockout mice deficient in the expression of class I MHC (Tartelon et al., 1996).

Innate and acquired immune responses are crucial to control the *T. cruzi* infection. During the early acute phase the activation of phagocytic cells by IFN- γ are the key elements in the resistance of *T. cruzi* infected host. The central role of IFN- γ *in vivo* seems to be the activation of inducible nitric oxide synthetase of macrophages and the production of nitric oxide for intracellular destruction of the parasite (James, 1995) as part of a Th1 response.

Therefore, our results, with lymph node T cells are compatible with a predominant Th1 response profile that is detected in experimental (Cardoni et al.,

1999) as well as human (Arnholdt et al., 1993) *T. cruzi* infection. These data suggest that cells other than Th1 cells may be involved in the BALB/C response to immunization.

On the other hand, IFN- γ production was detected in the serum of the inbred and outbred animals and a low IL-4 production in serum of BALB/C mice. This fact can be related to cell activation in other lymphoid organs, as observed in the extensive activation and proliferation of spleen cells during *T. cruzi* infection (Meyer et al., 1997). Thus the detection of cytokine in serum is indicative of systemic action of epitopes from CZP proteins during infection with *T. cruzi*. Moreover, these data suggest that one or more epitopes from CZP-II fraction can stimulate the production of IFN- γ and it could in the long term influence the evolution of the infection. Moreover, the immune system of mice can produce some desired cytokine once the appropriated antigenic stimulus is used similar to that observed by others (Cuna et al., 2000). In addition, its possible that the CZP-II protein may undergo different processing in secondary lymphoid organs for presentation by MHC. At this moment is not possible to define which proteins are involved in the immune response of mice. However, considering that the aspartic proteinases have a high content of β structures (Davies, 1990), it is reasonable to suppose that these molecular species are mainly involved in T response observed in this study.

In conclusion, our studies shown that the CZP-II fraction of *T. cruzi* is highly immunogenic in mice and may be involved in the modulation of the immune system in experimental Chagas' disease. The preliminary biochemical parameters assayed indicate that the 48-56 kDa bands present in the CZP-II fraction is an aspartic proteinase (Pinho et al., unpublished results) and is responsible for molecules inducing an immune response in the host.

Other polypeptides with proteinases activity have been identified in *T. cruzi* parasites (Cazzulo et al., 1989; Polgar, 1999; Lowndes et al., 1996). However few information about these enzymes on immune response have been described so far. Thus our study has shown that an aspartic proteinase fraction of *T. cruzi* is immunogenic in mice and may be involved on the modulation of the response in experimental Chagas' disease. In addition, the assays described in this paper can

may reflect some physiological conditions that occur during the interaction of some parasite polypeptides with and host.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Dr David J. M. Lewis for helpful discussions and we would like to thank the Image Treatment Laboratory of Instituto Oswaldo Cruz for the photography work. This investigation received financial support from Fundação Banco do Brasil, CNPq, FAPERJ and FIOCRUZ.

References

- Abrahamsohn I.A. (1998). Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res.* 31, 117-121.
- Arnholdt, A.C., Piuvezam, M.R., Russo, D.M., Lima, A.P., Pedrosa, R.C., Reed, S.G. and Scharfstein, J. (1993) Analysis and partial epitope mapping of human T cell responses to *Trypanosoma cruzi* cysteinyl proteinase. *J. Immunol.* 151, 3171-3179.
- Arnholdt A.C., Scharfstein J. (1991). Immunogenicity of *Trypanosoma cruzi* cysteine proteinase. *Res Immuno.* 142, 146-51.
- Babosa-de-Oliveira L.C., Curotto-de-Lafaille M.A., Lima G.M.C. and Abrahamson I.A. (1996) Antigen-specific IL-4 and IL-10 secreting CD4⁺ lymphocytes increases *in vivo* susceptibility to *Trypanosoma cruzi*. *Cellular Immunology.* 170, 41-53.
- Brener Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 27, 347-382.
- 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.

- Cardillo F., Voltarelli J.C., Reed S.G., Silva J.S. (1996) Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect. Immun.* 64, 128-134.
- Cardoni, R.L., Antunez, M.I. and Abrami, A.A. (1999) TH1 response in the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (B. Aires)* 59, 84-90.
- Cazzulo, J.J., Couso, R., Raimondi, A., Wernstedt, C. and Hellman, U. (1989) Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 33-41.
- Cazzulo, J.J. (1999) Cruzipain, major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: sequence and genomic organization of the codifying genes. *Medicina (B Aires)* 59, 7-10.
- Cuna, W.R., Encina, J.L.R. and Cuna, C. R. (2000) Interferon- or interleukin-10 production is induced by related *Trypanosoma cruzi* antigens. *J Parasitol.* 86, 295-299.
- Davies, DR (1990) The structure and function of aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19, 189-215.
- Gazzinelli R.T., Leme V.M., Cancado J.R., Gazzinelli G., Scharfstein J. (1990) Identification and partial characterization of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by T cells and immune sera from patients with Chagas' disease. *Infect Immun.* 58, 1437-1444.
- James, S. (1995) Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol. Rev.* 59, 535-547.
- Kaplan, D., Baldi, C., Chiaramonte, M.G., Fernandez, M.M., Levin, M.J., Malchiodi, E. and Baldi, A. (1998). Expression of a recombinant Fab antibody fragment against cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 53-58

- Lowndes, C.M., Bonaldo, M.C., Thomaz, N. and Goldenberg, S. (1996) Heterogeneity of metalloprotease expression in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 112, 393-399.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Martinez, J., Campetella, O., Frasch, A.C., and Gazzulo, J.J. (1991) The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is antigenic in human infections. *Infect. Immun.* 59, 4275-4277.
- Meyer, Z., Buschenfelde, C., Cramer, S., Trumpfheller, C., Fleischer, B., Frosch, S. and Bernhard. (1997). *Trypanosoma cruzi* induces strong IL-12 and IL-18 gene expression in vivo: correlation with interferon-gamma (IFN-gamma) production. *Clin. Exp. Immunol.* 110, 378-85.
- Nickell S.P., Stryker G.A., Arevalo C. (1993). Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8+, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. *J. Immunol.* 150, 1446-1457.
- Pinho R.T., Alves C.R., Beltramini L.A. and Giovanni De Simone S. Molecular and enzymatic properties of aspartyl proteinases from *Trypanosoma cruzi* (unpublished results)
- Polgar, L., (1999) Oligopeptidase B: a new type of serine peptidase with a unique substrate-dependent temperature sensitivity. *Biochemistry* 38, 15548-15555.
- Rangel, H.A., Araujo, P.M., Camargo, I.J., Bonfitto, M., Repka, D., Sakurada, J.K. and Atta, A.M. (1981) Detection of a proteinase common to epimastigote, trypomastigote and amastigote of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Tropenmed Parasitol.* 32, 87-92.
- Rottenberg M.E., Riarte A., Sporrang L., Altchek J., Petray P., Ruiz A.M., Wigzell H., Orn A. (1995) Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunol Lett.* 45, 53-60.

- Scharfstein, J (1993). Structural and functional aspects of human immune response against the major cysteine proteinase form *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 88, 8-10
- Silva, L.H.P. and Nussenzweig, V. (1953). Sobre uma cepa do *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin. Biol. 20, 191-207.
- Tarleton R.L., Koller B.H., Latour A., Postan M. (1992). Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. Nature. 356, :338-340.
- Tarleton, R.L., Grusby, M.J., Postan, M. and Glimcher, L.H. (1996) *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. Int. Immunol. 8, 13-22.
- W.H.O. - World health Organization (2001). Health topics: Chagas' disease. <http://www.who.inf> .

Figures Legends

Figure 1. Lymphoproliferative responses of lymph node cells from BALB/C mice immunized with CZP fraction of *Trypanosoma cruzi*. The animals were inoculated three times with 50 μ g of the CZP fraction and PBS as control; and after the last inoculation were sacrificed. Lymph nodes cells were harvested and assayed *in vitro* with the CZP fraction (2-20 μ g) and Con A (2 μ g) as control (σ). The cells of immunized mice (\bullet) and control cells (\circ) of inoculated mice with PBS is shown. The cells were pulsed with [3 H] thymidine for 16h. The results represent the average \pm SD of two experiments.

Figure 2. Supernatant cells cytokine detection. The lymph node cells from mice immunized three times with 50 μ g of the CZP fraction and PBS, were analyzed for IFN- γ and IL-4 cytokines production. Cells supernatants were collected (three days after cultured) and incubated with CZP proteins (2-20 μ g) and Con A (2 μ g) as control (IFN- γ , σ and IL-4, \blacklozenge). Cytokine production is shown as close symbols (\blacksquare , \bullet) and the control cells from PBS inoculated mice as open symbols (\square , \circ). The results represent the average \pm SD of two experiments.

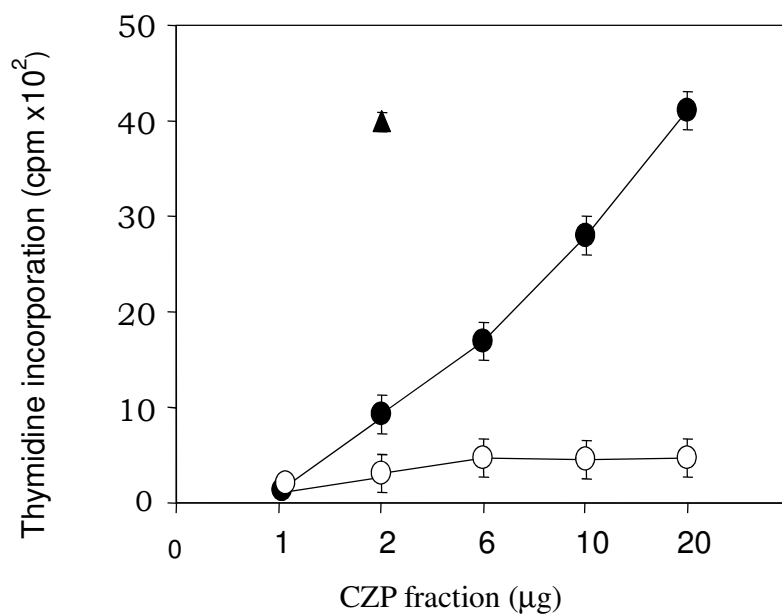


Figure 1

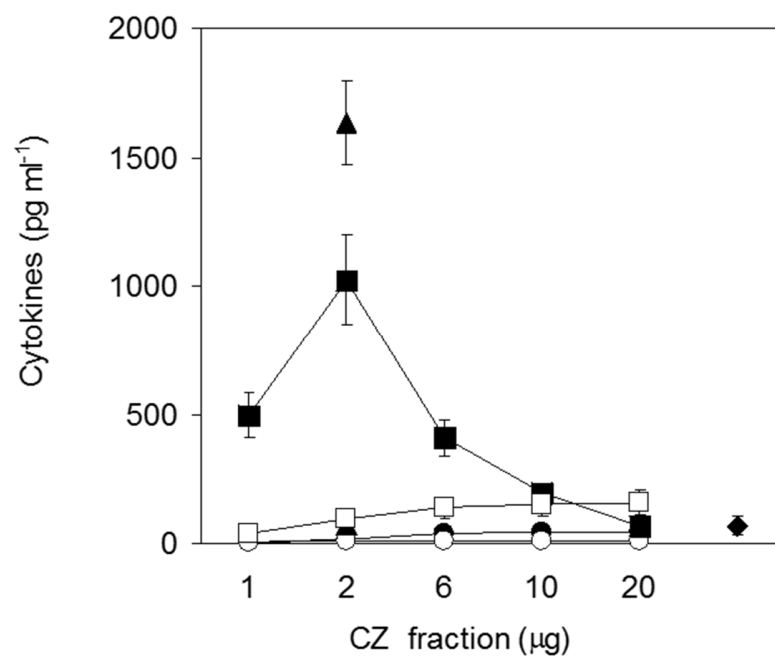


Figure 2

Table I. Phenotypic analysis of lymph node cells from BALB/C mice immunized with CZP fraction and cultured by 3 days.

Antigenic stimulation	CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/CD8
Medium	15.0 ± 0.71	25.0 ± 5.30	0.60
Con A	10.0 ± 1.84	20.0 ± 1.55	0.50
CZP _{2μg}	10.0 ± 0.14	23.0 ± 1.89	0.43
CZP _{20μg}	5.0 ± 0.06	18.0 ± 1.00	0.28
*Medium	33.0 ± 5.20	20.0 ± 3.10	1.65

*Lymph node cells from non CZP immunized mice

Table II. Cytokine detection in BALB/C and Swiss mice sera.

Immunized with	IL-4 (pg/ml)		IFN-γ (pg/ml)	
	BALB/C	Swiss	BALB/C	Swiss
PBS (control)	21 ± 0.5	24 ± 0.5	29.0 ± 3.0	50 ± 7.0
CZP fraction	40 ± 2.0	22 ± 0.7	512 ± 50	615 ± 80

Ponderações Finais

A doença de Chagas é uma infecção endêmica nas Américas Central e do Sul. O controle de sua transmissão pode ser feito principalmente através de medidas que atuem no vetor, delimitando a proximidade do homem com os reservatórios deste parasito e através da qualidade do sangue utilizado em transfusões, com a utilização de testes diagnósticos. Contudo, ainda não dispomos de medicamentos que revertam ou anulem a patologia desencadeada nos humanos infectados e as tentativas de produção de uma vacina eficaz têm sido infrutíferas. Portanto, já que as medidas preventivas atuais não se mostram eficazes, há uma crescente necessidade de investigação em todas as áreas sobre esta infecção, objetivando tanto elucidar seus mecanismos patológicos, como seu controle através de diagnósticos adequados, assim como elaborar possíveis estratégias que visem a cura dos pacientes infectados, e principalmente tendo como meta a erradicação desta infecção.

O conjunto de resultados obtidos nesta tese visou contribuir para o imunodiagnóstico testando a saliva como um fluído alternativo ao soro e para a os prováveis efeitos imunopatológicos da doença de Chagas, uma vez que investigam os aspectos das interações de polipeptídios de origem parasitária com células de vertebrado e os efeitos desta interação na infecção pelo *T. cruzi*. Deste modo, em nossos estudos, investigamos a presença de anticorpos específicos em saliva de pacientes na fase crônica da doença, as interações entre células e antígenos do *T. cruzi*, assim como isolamos proteinases ácidas do parasito.

O estudo 1 foi baseado nos dados sobre a doença de Chagas que relatam que os isotipos de anticorpos produzidos durante a infecção podem ser tanto marcadores das fases de infecção; quanto associados às manifestações clínicas desta. Assim, têm sido descrito que os pacientes infectados com o *T. cruzi* e que apresentam manifestações clínicas digestivas têm um predomínio de anticorpos da classe igA (Sá-Ferreira et al., 1983; Primavera et al., 1988; Primavera et al., 1990).

Quando iniciamos este trabalho não encontramos na literatura dados referentes à investigação de anticorpos na saliva de pacientes com doença de Chagas. A saliva total é um fluído resultante da secreção da mucosa, das glândulas sublinguais, submaxilares, parótidas e, também flui através da região gengivo-crevicular. Deste modo, neste fluído são encontrados os produtos de secreção destas glândulas assim como àqueles provenientes do soro através de extravasamento pela região gengivo-crevicular. Anticorpos da classe IgA são predominantes na mucosa na forma dimérica e ocasionalmente tetramérica (Brandtzaeg et al, 1970), ao contrário da IgA encontrada no soro que é predominantemente monomérica. Ainda, na mucosa é encontrada a IgA associada a um receptor polimérico e esta associação é chamada IgA secretória (SigA) (Mostov, 1994). Baseado nisto iniciamos o estudo 1 no qual o principal objetivo era detectar anticorpos da classe IgA na saliva de pacientes na fase crônica da doença de Chagas e verificar sua possível associação com a patologia do paciente. Porém, quando investigamos a presença de anticorpos da classe IgA na saliva destes pacientes não obtivemos bons índices de sensibilidade e especificidade através da metodologia utilizada (Anexo I). Contudo, há relatos que indicam que a detecção de anticorpos IgA em pacientes com a forma digestiva da doença, estaria também na dependência do antígeno utilizado para sua detecção, já que os melhores resultados foram obtidos quando se utilizaram amastigotas obtidos de tecido (Primavera et al., 1988).

Por outro lado, quando utilizamos a saliva destes pacientes para pesquisa de anticorpos específicos da classe IgG, à diluição de $\frac{1}{2}$, foram detectados anticorpos específicos em 103 das 114 amostras de saliva dos pacientes infectados e em 5 dos 100 controles (sensibilidade 90,4%, especificidade 95%). Entretanto, não foi encontrada correlação significativa entre o título de anticorpos e a doença cardíaca ou do trato gastrointestinal.

Embora, este teste utilizando saliva, quando comparado aos resultados obtidos com testes sorológicos, demonstre menores índices de especificidade e sensibilidade, uma vez que na saliva os anticorpos encontram-se em menor

proporção, quando comparado aos do soro (Malamud, 1997), este fluido apresenta vantagens sobre a coleta de sangue, podendo ser utilizado como um teste alternativo em áreas com poucos recursos, uma vez que não é um teste invasivo e não requer a utilização de material estéril. Além disso, também pode ser usado em crianças e pessoas debilitadas.

No estudo 2 procuramos identificar os antígenos liberados do parasito que poderiam ser adsorvidos a células não infectadas, uma vez que isto não estava descrito na literatura. A liberação destes antígenos por tripomastigotas tinha sido relatada (Affranchino et al., 1989; Ouassi et al., 1990; Gonçalves et al., 1991) Portanto, iniciamos um estudo, no qual utilizamos o amino-ácido radioativo (^{35}S) metionina em tripomastigotas visando caracterizar a massa molecular dos antígenos liberados e a ligação destes antígenos às células. Também utilizamos anticorpos monoclonais para *trans*-sialidase e cisteína proteinase para identificar esta ligação. Através desta metodologia, constatamos que antígenos de 85-110 kDa e 160-170 kDa, assim como cisteína proteinase ligaram-se às células não infectadas. Entretanto, a ligação de *trans*-sialidase às células não foi detectada através desta mesma metodologia. Verificamos também que em presença de antígenos liberados pelo parasito ocorre um aumento da expressão de componentes da matriz extracelular. Estes resultados nos levam a sugerir que estes antígenos podem ser importantes no estabelecimento inicial da inflamação, principalmente na fase aguda da infecção quando os parasitos circulam em grande quantidade. Esta conclusão é baseada também em inúmeros relatos da literatura que associam a presença do parasito ou de seus antígenos à inflamação que ocorre na doença de Chagas (Higuchi, 1999; Andrade, 1999; Tarleton et al., 1987).

Continuando nossos estudos, mediante a importância dos antígenos do parasito que possam interagir durante o processo infeccioso com os tecidos do hospedeiro, tivemos oportunidade de isolar polipeptídeos com atividade catalítica e, inclusive, descrever suas características bioquímicas e imunológicas. Estes resultados nos sugerem sua participação nos fenômenos de imuno-regulação da doença no hospedeiro. Então, iniciamos um estudo visando isolar polipeptídeos

com atividade catalítica que devem ter papel fundamental na sobrevivência do *T. cruzi*, como as enzimas proteolíticas (estudos 3 e 4).

Embora, no *T. cruzi* tenham sido descritas várias enzimas chamaram-nos a atenção, os relatos da detecção de aspártico proteinases e sua importância em outros organismos tais como mamíferos, plantas, fungos, bactérias, retrovírus e, especialmente, em protozoários. Então, decidimos investigar a presença destas enzimas no *T. cruzi*. Deste modo, iniciamos nossos estudos tentando obter estas proteinases através de sua ligação com um de seus inibidores, a pepstatina A ligada à agarose. Obtivemos assim duas frações com atividade enzimática em pH ácido, e com algumas semelhanças entre si. Estes resultados, somados àqueles dados obtidos através do espectro de dicroísmo circular, da detecção de estruturas secundárias predominantemente de fita tipo β (Davies, 1990), nestas enzimas, nos permitiu concluir que as mesmas fazem parte da classe das aspártico proteinases já descritas em outros organismos e ainda não descritas em tripanosomatídeos.

Finalmente, quando desenvolvemos os estudos posteriores da antigenicidade e imunogenicidade destas frações, obtivemos resultados interessantes, tais como, a detecção da reatividade de soros e saliva de pacientes para estas frações (Anexo III Anexo IV) e, a detecção desta enzima no foco inflamatório mononuclear com predomínio de subpopulação de células CD8+ (Anexo VI) no tecido murino (Santos et al., 2001).

O conjunto dos resultados obtidos nos permitem especular sobre a importância destes antígenos tanto no imunodiagnóstico, na sobrevivência do parasito, como mediadores, na inflamação e na resposta imunológica desencadeadas no hospedeiro, assim como sua possível utilização como alvo na quimioterapia. Aliado aos dados gerados ao decorrer deste trabalho, estamos ainda, desenvolvendo estudos sobre estes aspectos em nossos laboratórios.

Conclusões

- Detectamos anticorpos específicos da classe IgG para o *T.cruzi* na saliva de pacientes com doença de Chagas, na fase crônica. Este fato nos permite concluir que fluídos corpóreos, como a saliva, podem ser melhor investigados e utilizados como um método alternativo para diagnóstico de doença de Chagas nesta fase da infecção.
- Identificamos e constatamos que *in vitro* antígenos liberados pelo parasito podem interagir diretamente com as células do hospedeiro, favorecendo efeitos biológicos, como aumento da expressão de matriz. Portanto, podemos especular sobre a influência do conjunto de antígenos liberados pelo parasito
- Neste trabalho isolamos pela primeira vez duas novas aspártico-proteinases ácidas de *T. cruzi*. Os dados obtidos nos permitiram somar informações de que estas duas enzimas apresentam características bioquímicas, fisicoquímicas e estruturais gerais típicas da família das aspártico proteinases descritas em outros organismos.
- O nosso conjunto de resultados indica que as aspártico proteinases podem estar envolvidas nos mecanismos imuno-reguladores e imunopatológicos da doença de Chagas. Ainda, acrescentamos a informação de que estes polipeptídeos quimicamente definidos podem ser utilizados no imunodiagnóstico da doença e, também, como alvo direcionado à quimioterapia.

Referencias Bibliográficas

Abrahamsohn IA, Coffman RL 1996. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol* 84: 2231-2244.

Abrahamsohn IA, da Silva AP, Coffman RL 2000. Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 68: 1975-1979.

Affranchino JL, Ibañez CF, Luquetti AO, Rassi A, Reyes MB, Macina RA, Aslund L, Pettersson U, Frasch ACC 1989. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 34: 221-228.

Alberti Amador E, Fachado Carvajales A, Montavo AM, Isquierdo Perez LA, Fonte Galindo L 1998. Cysteine-dependent protease in *Trypanosoma cruzi* useful for the diagnosis of Chagas' disease. *Rev Cubana Med Trop* 50: 75-81.

Aliberti JC, Cardoso MA, Martins MGA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* 64: 1961-1967.

Amato-Neto V 1968. Heart transplant and Chagas' disease (resume of a scientific meeting to discuss the subject) *Hospital* (RJ) 74: 1039-1050.

Amato-Neto V 1993. Conduta frente ao doador chagásico. *Rev Soc Brasil Med Trop* 26 (Suppl. 11): 86-87.

Amato-Neto V 1999. Ethiological treatment for infection by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 337-339

- Amato-Neto V, Higuchi M, Amato VS 1995. Absence of cardiac lesion attributable to *Trypanosoma cruzi* after at least 17 years of a course of Chagas' disease due to transfusions. *Rev Soc Bras Med Trop* 28: 415-7.
- Amato-Neto V, Pasternak J, Uip DE 1995. Doença de Chagas no contexto dos transplantes de órgãos. *Arq Bras Cardiol* 65: 389-391.
- Andrade SG 1974. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop* 3: 65-121.
- Andrade SG 1985. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev Soc Bras Med Trop* 18 (Supl.): 39-46.
- Andrade SG, Grimaud JA, Stocker-Guerret S. 1989. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 40: 252-60.
- Andrade SG, Stocker-Guerret S, Pimentel AS, Grimaud JA 1991. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* under specific chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 187-200.
- Andrade SG, Rassi A, Magalhães JB, Ferrioli Filho, F, Luqueti AO 1992. Specific chemotherapy of Chagas' disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strain. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 624-626.
- Andrade ZA 1991. Pathogenesis of Chagas' disease. Review. *Res Immunol* 142: 126-129.

- Andrade SG, Magalhães JB 1997. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 27-35.
- Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Wenthold RJ Jr, Hilbert SL, Ferrans VJ 1997. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am J Trop Med Hyg* 57: 328-336.
- Andrade ZA 1999. Immunopathology of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 71-80.
- Andreeva NS, Zdanov AS, Gustchina AE, Fedorov AA 1984. Structure of ethanol-inhibited porcine pepsin at 2-Å resolution and binding of the methyl ester of phenylalanyl-diiodotyrosine to the enzyme. *J Biol Chem* 259: 1353-1365.
- Andreeva NS 1992. Some aspects of structural studies on aspartic proteinases. *Scand J Clin Lab Invest* 2: 31-38.
- Angelo St AJ, Ory RL 1970. Properties of a purified proteinase from *hempseed*. *Phytochemistry* 9: 1933-1938.
- Apt W, Aguilera X, Arribada A, Pèrez C, Miranda C, Sánchez G, Zulantay I, Cortés P, Rodríguez J, Juri D 1998. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. *Am J Trop Med Hyg* 59: 133-138.
- Araujo FG 1985. *Trypanosoma cruzi*: Expression of antigens on the membrane surface of parasitized cells. *J Immunol* 135: 4149-4154.

- Araujo FG 1986. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related tripanosomatids. *Infect Immun* 53: 179-185.
- Arbige MV, Freund PR, Silver SC, Zelko JT 1986. Novel lipase for cheddar flavour development. *Food Technol* 40: 91-98.
- Ashall F 1990. Characterization of an alkaline peptidase of *Trypanosoma cruzi* and other trypanosomatides. *Mol Biochem Parasitol* 38: 77-88.
- Avila H, Borges-Pereira J, Thiemann O, De Paiva E, Degrave W, Morel CM, Simpson 1993. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol* 31: 2421-2426.
- Bailly E, Jambou R, Savel J, Jaureguiberry G 1992. *Plasmodium falciparum*: differential sensitivity in vitro to E-64 (cysteine protease inhibitor) and pepstatin A (aspartyl protease inhibitor). *J Protozol* 39: 593-599.
- Bakalinsky AT, Boulton R 1985. The study of an immobilized acid protease for the treatment of wine protein *Am J Enol Vitic* 36: 23-29.
- Baldwin ET, Bhat TN, Gulnik S, Hosur MV, Sowder II RC, Cachau RE, Collins J, Silva AM, Erickson JW 1993. Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: Implications for lysosomal targeting and drug design. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6796-6800.
- Bahia-Oliveira LM, Gomes JA, Rocha MO, Moreira MC, Lemos EM, Luz ZM, Pereira ME, Coffman RL, Dias JC, Concado JR, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R 1998.

IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz J Med Res* 31: 127-131.

Banyal HS, Misra GC, Gupta CM, Dutra GP 1981. Involvement of malarial proteases in the interaction between the parasite and host erythrocyte in *Plasmodium knowlesi* infections. *J Parasitol* 67: 623-626.

Barbosa de Oliveira LC, Curroto de Lafaille MA, Collet de Araujo Lima GM, Abrahamsohn IA 1996. Antigen-Specific IL-4 and IL-10-secreting CD4+ lymphocytes increase in vivo susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immun* 170: 41-53.

Barret AJ, Rhawlings ND, Davies ME, Machleidt W, Salvesen G, Turk V 1986, p. 515-569. In AJ Barret & G Salvesen (eds) *Proteinase Inhibitors: Cysteine-Proteinase Inhibitors of the Cystatin Superfamily*, Elsevier, Amsterdam.

Barret TV, Hoff RH, Mot KE, Miles MA, Godfrey DG, Teixeira R, Almeida de Souza JA, Sherlock IA 1980. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia state, Brasil. *Trans. R Soc Trop Med Hyg* 74: 84-90.

Ben Younes-Chennoufi A, Said G, Eisen H, Durand A, Hontebeyrie-Joskowicz M 1988. Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cells CD4+. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 84-89.

Bennet K, Levine T, Ellis JS, Samloff IM, Kay J, Chain BM 1992. Antigen processing for presentation by Class II histocompatibility complex requires cleavage by cathepsin. *Eur J Immunol* 22: 1519-1524.

Bittencourt AL 1976. Congenital Chagas' disease. *Am J Dis Children* 130: 97-103.

- Bonaldo MC, D' Escoffier LN, Salles JM, Goldenberg S 1991. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Exp Parasitol* 73: 44-51.
- Bongertz V, Hungerer KD 1978. *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of a protease. *Exp Parasitol* 45: 8-18.
- Bontempi E, Franke De Cazzalo B, Ruiz M, And Cazzulo AM 1984. Purification and some properties of an acid protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol* 778: 599-604.
- Bott R, Subramanian E, Davies DR 1982. Three-dimensional structure of the complex of the *Rhizopus chinensis* carboxyl proteinase and pepstatin at 2.5-Å^o resolution. *Biochemistry* 21: 6956-6962.
- Brandtzaeg P, Fjellanger I, Gjeruldsen ST 1970. Human secretory immunoglobulins. I. Salivary secretions from individuals with normal or low levels of serum immunoglobulins. *Scand J Haematol S* 12: 3-83.
- Brener Z 1961. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. Tese. BH: Faculdade de Odontologia e Farmácia. UFMG. Mimeografada 79 pg.
- Brener Z 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol* 27: 347-382.
- Brener Z, 1984 Laboratory acquired Chagas' disease: comment *Trans R soc Trop Med Hyg* (8) 527-527.
- Brener Z, Cançado JR, Galvao LM, Luz ZM, Filardi LS, Pereira ME, Santos LM, Cançado CB. 1993. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 149-153.

- Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 114 (1997), pp. 103–110.
- Britto C, Cardoso MA, Ravel C, Santoro A, Borges-Pereira J, Coura JR, Morel CM, Wincker P 1995. *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using amplification of Kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. *Exp Parasitol* 81: 462- 471.
- Brodskyn CI, Silva AM, Takehara HA, Mota I 1989. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Cell Biol.* 67: 343-348.
- Brumpt E 1913. Immunité partielle dans les infections à *Trypanosoma cruzi*, transmission de ce tripanosoma par *Cimex rotundatres*. Rôle régulateur des hôtes intermédiaires. Passage à travers la peau. *Bull Soc Pathol Exot* 6: 172-176.
- Brumpt E 1914. Le xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosomose de Chagas. *Bull Soc Pat Exot* 7: 706-710.
- Camargo ME, Hoshino-Shimizu S, Siqueira GRV 1973. Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of American trypanosomiasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 15: 81-85.
- Camargo ME, Segura EL, Kagan, IG, Souza JMP, Carneiro JR, Yanovsky JF, Guimarães MCS 1986. Collaboration on the standardization of Chagas' disease in the Americas: an appraisal. *PAHO Bul* 20: 233-244.

- Camargo, ME 1966. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 8: 227-234.
- Campbel, WB 1981. EKG of the month. (1) Muscular tremor (stimulating atrial flutter); (2) Inferior lateral infarction probably evolving, with strictly posterior component. *J Tenn Med Assoc* 74:(10) 746.
- Campetella O, Henrickson J, Aslund L, Frasch ACC, Petterson U, Cazzulo JJ 1992. The major cysteine protease (cruzipain) is encoded by multiple polymorphic tandemly repeated organized genes located in different chromosomes. *Mol Biochem Parasitol* 50: 225-234.
- Carbonetto CH, Malchiddi EL, Chiaramonte M, Durante de Isola E 1990. Isolation of a *Trypanosoma cruzi* antigen by affinity chromatography with a monoclonal antibody. Preliminary valuation of its possible applications in serological testes. *Clin Exp Immunol* 82: 93-96.
- Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS 1996. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun* 64: 128-134.
- Carrasco HJ, Frame IA, Valente AS, Miles MA 1996. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 54: 418-424.
- Carvalho TU, De Souza W 1989. Early events related with behaviour of *Trypanosoma cruzi* in the endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct Funct* 14: 383-392.

- Cazzulo JJ 1999. Cruzipain, major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: sequence and genomic organization of the codifying genes. *Medicina (B Aires)* 59: 7-10.
- Cazzulo JJ, Cazzulo Franke MC, Martinez J, Franke de Cazzulo BM 1990. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Acta* 1037: 186-191.
- Cazzulo JJ, Couso R, Raimondi A, Wernstedt C, Hellman U 1989. Further characterization and partial amino acid sequence of cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 33: 33-42.
- Cerisola JA, Chaben MF, Lazari JO 1962. Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Prensa Méd Argent* 49: 1761-1767.
- Chagas C 1909b. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schyzotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Chagas C 1922. Descoberta do *Trypanosoma cruzi* e verificação de tripanozomíase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 15: 67-76.
- Chagas C 1924. Infection naturelle des singes du Pará (*Crysotrix sciureus*) par *Trypanosoma cruzi*. *C R Soc Biol (Paris)* 90: 873
- Charazanowska J, Kolaczowska M, Dryjanski M, Stachowiak D, Polanowski A 1995. Aspartic proteinase from *Penicillium camemberti*: Purification, properties and substrate specificity. *Enzym Microbiol Technol* 17: 719-724.

- Chiller TM, Samudio MA, Zoulek G 1990. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 43: 650-656
- Clark CG, Pung OJ 1994. Host specificity or ribosomal DNA variation in sylvatic *trypanosoma cruzi* from North America. *Mol Biochem Parasitol* 6:6 175-179.
- Cooper JB, Khan G, Taylor G, Tickle IJ, Blundell TL 1990. X-ray analyses of aspartic proteinases. II. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* 21: 199-222.
- Coura JR, Barrett TV, Arboleda MN 1994a. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção chagásica? *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 251-253.
- Coura JR, Junqueira ACV, Giordano CM, Funatsu IRK 1994b. Chagas' disease in the Brazilian Amazon. I-A short review. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 36: 363-368.
- Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J 1996. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein cross-reactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest* 98: 1709-1712.
- Cura E, Wendel S 1994. p. 2-3. In *Manual de Procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serología de los Bancos de Sangre*, ÍNDIECHE, OPS, Buenos Aires.
- Davies DR 1990. The structure and function of aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 19: 189-215.
- Deane MP, Lenzi HI, Jansen AM 1984. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and

invertebrate cycles in the same mammal hosts, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79 (Suppl.): 513-529.

De Bernardis F, Agatensi L, Ross IK, Emerson GW, Lorenzini R, Sullivan PA, Cassone A 1990. Evidence for a role for secreted aspartyl proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis* 161: 1276-1283.

D'Hondt K, Bosch D, Van Damme J, Goethals M, Vandekerckhove J, Krebbers E 1993. An aspartic proteinase present in seeds cleaves *Arabidopsis* 2 S albumin precursors in vitro. *J Biol Chem* 268: 20884-20891.

Dias JCP, Schofield CJ 1999. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 103-121.

Diment S, Leech MS, Stahl PD 1988. Cathepsin D membrane-associated in macrophage endosomes. *J Biol Chem* 263: 6901-6907.

De Souza W 1984. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol* 86: 197-283.

Dos Reis GA 1997. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Today* 13: 335-341

Erickson AH, Conner GE, Blobel G 1981. Biosynthesis of a lysosomal enzyme. *J Biol Chem* 25: 1224-1231.

Factor SM, Tanowitz H, Wittner M, Ventura MC. 1993. Interstitial connective tissue matrix alterations in acute murine Chagas' disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 6):147-52.

Faro C, Veríssimo P, Lin YJ, Tang J, Pires E 1995. Cardosin A and B, aspartic proteases from the flowers of cardoon. *Adv Exp Med Biol* 362:373-377.

- Faust PL, Kornfeld S, Chirgwin JM 1985. Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4910-4914.
- Federici EE, Abelman WH, Neva FA. 1964. Chronic and progressive myocarditis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 13: 272-280.
- Filardi LS, Brener Z 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 755-759.
- Foltman B 1970. Prochimosin an chymosin (prorenin and renin). *Methods Enzimol* 19: 421-436.
- Fox PF 1988. Review: Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. *Biotech Appl Biochem* 10: 522-535.
- Francis SE, Gluzman IY, Oksman A, Knickerbocker A, Mueller R, Bryant ML, Sherman DR, Russell DG, Goldberg DE 1994. Molecular characterization and inhibition of a *Plasmodium falciparum* aspartic hemoglobinase. *J EMBO* 3: 306-317.
- Fujita H, Tanaka Y, Noguchi Y, Kono A, Himeno MND, Kato K 1991. Isolation and sequence of a cDNA clone encoding rat liver lysosomal cathepsin D and the structure of three forms of mature enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 190-196.
- Fusek M, Smith EA, Monod M, Foundling SI 1993. *Candida parapsilosis* expresses and secretes two aspartic proteinases. *Febs Lett* 327: 108-112.
- Gabay T, Ginsburg H 1993. Hemoglobin denaturation and iron release acidified red

blood cell lysate-a possible source of iron for intraerythrocytic malaria parasites. *Exp Parasitol* 77: 261-272.

Garcia MP, Nóbrega OT, Teixeira ARL, Sousa MV, Santana JM 1998. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* acidic 30 kDa cysteine protease. *Mol Biochem Parasitol* 91: 263-272.

Gaspar-Vianna 1911. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Molestia de Carlos Chagas". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 3: 276-294.

Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A 1993. Interleukin-12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6115-6119.

Gazzinelli RT, Talvani A, Camargo MM, Santiago HC, Oliveira MA, Vieira LQ, Martins GA, Aliberti JC, Silva JS. 1998. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. Review *Braz J Med Biol Res*;31 (1):89-104.

Gillat D, Cahalon L, Hershkovic R, Lider O 1996. Interplay of T cells and cytokines in the context of enzymatically modified extracellular matrix. *Immunol Today* 17 (1): 16-20.

Gilliland GL, Wimborne EL, Nachman J, Wlodawer A 1990. The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.4 Å resolution. *Proteins* 8: 82-101.

Giovanni De Simone S, Santos S, Pinho RT, Vanni CMM, Pontes de Carvalho LC 1991. Isolation and immunological analysis of *Trypanosoma cruzi* glycolipids. *Acta Trop* 48: 233-241.

- Gluzman IY, Francis SE, Oksman A, Smith CE, Duffin KL, Goldberg DE 1994. Order and specificity of the *Plasmodium falciparum*: hemoglobin degradation pathway. *J Clin Invest* 93: 1602-1608.
- Goldberg DE, Slater AF, Cerami A, Henderson GB 1990. Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. An ordered process in a unique organelle. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2931-2935.
- Goldberg DE, Slater AF, Beavis R, Chait B, Cerami A, Henderson GB 1991. Hemoglobin degradation in the human malaria pathogen *Plasmodium falciparum*: a catabolic pathway initiated by a specific aspartic protease. *J Exp Med* 173: 961-969.
- Gonçalves A, Nheme N, Morel C 1984. Trypanosomatid characterization by schizodeme analysis, p 95-109. In CM Morel, *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, 2 ed. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Gonçalves MF, Umezawa ES, Katzin AM, Souza W, Alves MJM, Zingales B, Coli W 1991. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp Parasitol* 72: 43-53.
- Guerreiro C, Machado A 1913. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Braz Med* 27: 225-226.
- Harth G, Andrews N, Mills AA, Engel JC, Smith R, McKerrow JH 1993. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 58: 17-24.
- Higuchi ML 1999. Human chronic chagasic cardiopathy: Participation of parasite antigens, subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 263-267.

- Higuchi ML, De Brito T, Reis MM, Barbosa A, Bellotti G, Pereira Barreto AC, Pileggi F 1993. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol* 2: 101-106.
- Higuchi ML, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, Bellotti G., Pileggi F 1993. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A, Pathol Anat Histopathol* 423: 157-160.
- Higuschi ML, Fukasawa S, De Brito T, Parzianello LC, Bellotti G, Ramires JAF 1999. Different microcirculatory and intestinal matrix patterns in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas'disease: a three-dimensional confocal microscopy study. *Heart* 81: 1-6.
- Hill J, Tyas L, Phylip LH, Dunn BM, Berry C 1994. High-level expression and characterization of Plasmepsin II, an aspartic proteinase from *Plasmodium falciparum*. *FEEBS Lett* 352: 155-158.
- Hoare CA 1972. *The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph*. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Hoft DF, Lynch RG, Kirchhoff LV 1993. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptibility mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 151: 7038-7047.
- Hudson L, Hindmarsh PJ 1985. The relationship between autoimmunity and Chagas'disease: causal or coincidental? *Curr Top Microbiol Immunol* 117: 167-177.
- James MNG, Sielecki AR 1983. Structure and refinement of penicillopepsin at 1.8

A° resolution. *J Mol Biol* 163: 299-361.

James S 1995. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Reviews* 59: 533-547.

Jazin EE, Luquetti AO, Rassi A, Frasch ACC 1991. Shift of Excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* during human Chagas'disease. *Infect Immun* 5: 2189-2191.

Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones C, Mc Curley TL 1993. Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 48: 348-357.

Junqueira AC, Chiari E, Wincker P 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas'disease in an endemic region of northeastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 129-32.

Kalil J, Cunha-Neto E 1996. Autoimmunity in Chagas'disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? *Parasitol Today* 12: 396-399.

Kay J 1985. Aspartic proteinases and their inhibitors, p 1-7. In V Kostka, Walter Guyter (eds) *Aspartic Proteinases and their inhibitors*, Berlin.

Kay J, Dunn BM 1992. Substrate specificity and inhibitors of aspartic proteinases. *Scand Clin Lab Invest* 210 (Suppl.): 23-30.

Kervinen J, Sarkkinen P, Kalkkinen N, Mikola L, Saarma M 1993. Hydrolytic specificity of the barley grain aspartic proteinase. *Phytochemistry* 32: 799-803.

Kervinen J, Tormakangas K, Runeberg-Roos P, Guruprasad K, Blundell T, Teeri TH

1995. Structure and possible function of aspartic proteinases in barley and other plants, p. 242-253. In H Takahashi (ed), *Aspartic Proteinases: Structure, Function, Biology and Biomedical Implications*. Plenum Press, New York.
- Kierszenbaum F 1976. Cross-reactivity of lytic antibodies against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 62: 134-135.
- Kierszenbaum F 1999. Chagas' disease and autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Reviews*: 210-223.
- Köberle F 1968. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 6: 63-116.
- Köberle F, Alcântara FG, Ribeiro dos Santos R 1983. Patogenia da forma digestiva p. 25-34. In A Raia (ed) *Manifestações Digestivas da Moléstia de Chagas*, Sarvier.
- Kohl NE, Emini EA, Schleif WA 1988. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4686-4690.
- Krettli AU, Brener Z 1982. Resistance against *Trypanosoma cruzi* is associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J Immunol* 128: 2009-2012.
- Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Lafaille JJ, Pereira JB, Krieger H, Carvalho MR, Goldenberg S 1992. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 46: 427-434.
- Kuhn RE, Mumane JE 1977. *Trypanosoma cruzi*: immune destruction of parasitized mouse fibroblasts in vitro. *Exp Parasitol* 41: 66-73.
- Kumar S, Tarleton RL 1998. The relative contribution of antibody production and

CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* 20: 207-216.

Lapatto R, Bundell TL, Hemmings A 1989. Three-dimensional structure of aspartyl protease at 2.7 Å^o resolutions confirms structural homology among retroviral enzymes. *Nature* 342: 299-302.

Lemesre JL, Afchain D, Orosco O, Louens M, Brenjere FS, Desjeux P, Carlir Y, Martin N, Nogueira JA, Leray D, Capron A 1986. Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas' disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *T. cruzi*-specific monoclonal antibody. *Am J Trop Med Hyg* 35: 86-93.

Lorca M, Veloso C, Munoz P, Bahamonde MI, Garcia A 1995. Diagnostic value of detecting specific IgA and IgM with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens in congenital Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 52: 512-515.

Lowndes CM, Bonaldo MC, Thomaz N and Goldenberg S 1996. Heterogeneity of metalloprotease expression in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 112: 393-399.

Luker KE, Francis SE, Gluzman IY, Goldberg DE 1996. Kinetic analysis of plasmepsins I and II, aspartic proteases of the *Plasmodium falciparum* digestive vacuole. *Mol Biochem Parasitol* 79: 71-78.

Luz ZMP 1999. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94 (Suppl. I): 295-298.

Luz ZMP, Coutinho MC, Cançado JR, Krettli AU 1994. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 143-148.

- Macedo AM, Pena S 1998. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas' disease. *Parasitol Today* 14: 119-124.
- Mady C, Pereira-Barreto AC, Lanni BM, Lopes EA, Pileggi F 1984. Right ventricular endomyocardial biopsy in undetermined form of Chagas disease. *Angiology* 35: 755-759
- Malamud D, 1997. Oral diagnostic testing for detecting human immunodeficiency virus-1 antibodies: a technology whose time has come. *Am J Med* 102 (suppl 4A) 9-14.
- Martins-Filho OA, Pereira MES, Carvalho JF, Cançado JR, Brener Z 1995. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. *Clin Diag Lab Immunol* 2: 569-573.
- Matsumoto TK, Hoshino-Shimizu S, Nakamura PM, Andrade HF Jr, Umezawa ES 1993. High resolution of *Trypanosoma cruzi* amastigote antigen in serodiagnosis of different clinical forms of Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 31: 1486-1492.
- Mccabe RE, Meagher SG, Mullins BT 1991. Endogenous interferon-gama macrophage activation, and murine host defence against acute infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 163: 912-915.
- Mckerrow JH 1989. Minireview: parasites proteases. *Exp Parasitol* 68: 111-115.
- McKerrow JH 1993. The diversity of protease function in parasitic infections. *J Braz Ass Adv Sci* 45: 319-321.
- Mckerrow JH, Mcgrath ME, Engel JC 1995. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasite drug design. *Parasitol Today* 11: 279-282.

- McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J 1993. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev. Microbiol* 47: 821-53.
- Meirelles MN, Juliano L, Carmona E, Silva SG, Costa EM, Murta AC, Scharfstein J 1992. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol Biochem Parasitol* 52: 175-184.
- Mendes RP, Takehara HA, Mota I 1979. *Trypanosoma cruzi*: homocytotrophic antibody response in mice immunized with unrelated antigens. *Exp Parasitol*. 48: 345-51.
- Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT 2001. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gama axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 159(5):1723-1733.
- Miles MA 1972. *Trypanosoma cruzi*-milk transmission of infection and immunity from mother to young. *Parasitology* 65: 1-9.
- Miles MA, Souza AA, Pova MM, Shaw JJ, Lainson R, Toyé PJ 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272: 819-821.
- Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey GD 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71: 217-225.
- Mineo JR, Rocha A, Costa-Cruz JM, da Silva AM, Silva DA, Goncalves-Pires MD, Lopes ER, Chapadeiro E 1996. Total and specific anti-*Trypanosoma cruzi*

immunoglobulin E in pericardial fluid samples from patients with chronic Chagas' disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 578-581.

Momen H 1999. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 181-184.

Moncada C, Repetto Y, Aldunate J, Letelier ME, Morello A 1989. Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. *Comp Biochem Physiol C* 94: 87-91.

Moncayo A, Luquetti AO 1990. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 489-495.

Morel C, Chiari E, Camargo EA, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6810-6814.

Morgado MG, Van Hoegarden M, Galvão-Castro B 1985. Antigenic analysis of *Trypanosoma cruzi* strains by crossed immunoelectrophoresis: demonstration and isolation of antigens particular to some strains. *Z Parasitenkd* 71: 169-178.

Morgado MG, Ivo-dos-Santos J, Pinho RT, Argüelles E, Rezende JM, Galvão-Castro B 1989. *Trypanosoma cruzi*: Identification of specific epimastigote antigens by human immune sera. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 309-314.

Morgan J, Colley DG, Pinto Dias JC, Gontijo ED, Bahia-Oliveira L, Correa-Oliveira R, Powell MR 1998. Analysis of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype specificities by Western blot in sera from patients with different forms of Chagas' disease. *J Parasitol* 84: 641-643.

- Morishima H, Takita T, Aoyagi T, Takeuchi T, Umezawa H 1970. The structure of pepstatin. *J Antibiot (Tokyo)* 23: 263-265.
- Morrot A, Dudley KS, Higuchi ML, Reis M, Pedrosa R, Scharfstein J 1997. Human T cell response against the major cysteine proteinase (cruzipain) of *Trypanosoma cruzi*: role of the multifunctional alpha2-macroglobulin receptor in antigen presentation by monocytes. *Inter Immunol* 9: 825-834.
- Mostov KE, 1994. Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu Review Immunol* 12: 63-84.
- Mottram JC, North MJ, Barry JD, Coombs GH 1989. A cysteine proteinase cDNA from *Trypanosoma brucei* predicts an enzyme with an unusual C-terminal extension. *FEBS Lett* 258: 211-215.
- Mottram JC, Robertson CD, Coombs GH, Barry JD. 1992. A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol*: 6:1925-1932.
- Muniz J, Freitas G 1944. Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade entre as reações de aglutinação e de fixação de complemento. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 41: 303-333.
- Munoz-Fernandez M, Fernandez MA, Fresno M 1992. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gama on macrophage activation for the killing of intra cellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 22: 301-307.

- Murta AC, Persechini PM, Souto-Padron T, de Souza W, Guimarães JA, Scharfstein J 1990. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol Biochem Parasitol* 43: 27-38.
- Murta SMF, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ 1998. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol* 93:203-214.
- Murta SMF, Romanha AJ 1999. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*:94 (Suppl. 1):177-180.
- Nathan CF, Hibbs JB Jr. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3:65–70.
- Neurath H 1989. Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem Sci* 14: 268-271.
- Nussenzweig V, Kloetzel J, Deane LM 1963. Acquired immunity in mice infected with strains of immunological types A and B of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 14: 233-239.
- Oelemann WMR, Teixeira MD, Verissimo Da Costa GC, Borges-Pereira J, De Castro JA, Coura JR, Peralta JM 1998. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 36: 2423-2427.
- Oelemann WMR, Vanderborght BOM, Verissimo da Costa GC, Teixeira MGM, Borges-Pereira J, de Castro JAF, Coura JR, Stoops E, Hulstaert F, Zrein M, Peralta JM 1999. A recombinant and peptide antigen line immunoassay optimized for confirmation of Chagas' disease. *Transfusion* 39: 711-717.

- Ouaissi A, Cornette J, Velge P, Capron A 1998. Identification of anti-acetylcholinesterase and anti-idiotypic antibodies in human and experimental Chagas disease: pathological implications. *Eur J Immunol* 18: 1889-1894.
- Ouassi MA, Taibi A, Cornette J, Velge P, Marty B, Loyens M, Esteva M, Rizvi FS, Capron A 1990. Characterization of a major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitology* 100: 115-124.
- Palácios-Pru E, Carrasco H, Scorza C, Espinoza R 1989. Ultrastructural characteristics of different stages of human chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg* 41: 29-40.
- Petry K, Eisen H, 1989. Chagas'disease: a model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol Today* 5: 111-116.
- Pearl L, Blundell T 1984. The active site of aspartic proteinases. *FEBS Lett* 174: 96-101.
- Peralta JM, Magalhães TCR, Abreu L, Manigot DA, Luquetti A, Dias JCP 1981. The direct agglutination test for chronic Chagas'disease. The effect of pre-treatment of test samples with 2-mercaptoethanol. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 75: 695-698.
- Pereira VL, Levy AM, Boianain E 1989. Xenodiagnóstico, hemocultura e lise mediada por complemento como critérios de seleção de pacientes chagásicos crônicos para quimioterapia. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 31: 301-307.
- Pinho RT, Pedrosa RC, Costa-Martins P, Castello-Branco LRR 1999. Saliva ELISA:

a method for the diagnosis of chronic Chagas'disease in endemic areas. *Acta Trop* 72: 31-38.

Pitts JE, Dhanaraj V, Dea Lwis CG, Mantafounis D, Nugent P, Orprayoon P, Cooper JB, Newman M, Blundell TL 1992. Multidisciplinary cycles for protein engineering: Site-directed mutagenesis and X-ray structural studies of aspartic proteinases. *Scand J Clin Lab Invest* 52: 39-50.

Plata F, Garcia-Pons F, Eisen H 1984. Antigenic polymorphism of *Trypanosoma cruzi*: clonal analysis of trypomastigote surface antigens. *Eur J Immunol* 14: 392-399.

Polgar L 1999. Oligopeptidase B: a new type of serine peptidase with unique substrate-dependent temperature sensitivity. *Biochemistry* 38: 15548-15555.

Prata A 1994. Chagas'disease. *Infect Dis Clin North Am* 8: 61-76.

Primavera KS, Hoshino-Shimizu, Umezawa ES, Peres BA, Manigot DA, Camargo ME 1988. Immunoglobulin A antibodies to *Trypanosoma cruzi* antigens in digestive forms of Chagas'disease. *J Clin Microbiol* 26: 2101-4.

Primavera KSC, Umezawa ES, Peres BA, Camargo ME, Hoshino-Shimuzi 1990. Chagas'disease: IgA, IgG antibodies to *T.cruzi* amastigote, tripomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 32: 172-180.

Rangel HA, Araujo PMF, Camargo IJB, Bonfitto M, Repka D, Sakurada JK, Atta AM 1981. Detection of proteinase common to epimastigote, trypomastigote and amastigote of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Tropenmed Parasitol* 32: 87-92.

- Rao-Naik CH, Guruprasad K, Batley B, Rapundalo S, Hill J, Dunn BM 1995. Exploring the binding preferences/specificity in the active site of human cathepsin. *E Proteins* 22: 168-181.
- Rassi A 1979. Clínica: fase aguda, p. 249-264. In Z Brener & Z Andrade (eds) *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasil.
- Ray BD, Rosch P, Rao BD 1988. ³¹P NMR studies of the structure of cation-nucleotide complexes bound to porcine muscle adenylate kinase. *Biochemistry* 27: 8669-8676.
- Reed SG 1988. In vivo administration of recombinant IFN- γ induces macrophages activation and prevents acute disease, immunosuppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 140: 4342-4347.
- Ribeiro dos Santos R, Hudson L 1980a. *Trypanosoma cruzi*: binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. *Parasite Immunol* 2: 1-10.
- Ribeiro dos Santos R, Hudson L 1980b. *Trypanosoma cruzi*: immunological consequences of parasite modification of host cells. *Clin Exp Immunol* 40: 36-41.
- Ribeiro dos Santos R, Rossi MA, Sauss JL, Silva JS, Savino W, Mengel J 1992. Anti-CD4 abrogates rejection and re-establishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* 175: 28-39.
- Richmond V, Tang J, Wolf S, Truco RE, Caputo R 1958. Chromatographic isolation of gastricsin, the proteolytic enzyme from gastric juice with pH optimum at 3.2. *Biochem Biophys Acta* 29: 453.
- Rocha A, Meneses ACO, Silva AM, Ferreira MS, Nishioka SA, Burgarelli MKN,

- Almeida E, Turcato Jr G, Metze K, Lopes ER 1994. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 50: 261-268.
- Rockett KA, Playfair JH, Ashall F, Targett GA, Angliker H, Shaw E. 1990. Inhibition of intraerythrocytic development of *Plasmodium falciparum* by proteinase inhibitors. *FEBS Lett.* 1;259: 257-259.
- Romaña C 1935. A area de un sintoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. *MEPRA* 22: 16-30
- Romaña C, Raciness VJ, Aviles H, Lema F 1994. Observaciones de domiciliación de *Rhodnius equadoriensis* em focos endêmicos de la enfermedad de Chagas em el Ecuador. *Microbiologia* 1. 59.
- Romeiro SA, Takehara HA, Mota I 1984. Isotype of lytic antibodies in serum of Chagas' disease patients. *Clin Exp Immunol* 55: 413-418.
- Roos IK, De Bernardis F, Emerson GW, Cassone A, Sullivan PA 1990. The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteins deficient mutants. *J Gen Microbiol* 136: 687-694.
- Rosenthal PJ, Kim K, McKerrow JH, Leech JH. 1987. Identification of three stage-specific proteinases of *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med.* 166: 816-21.
- Rosenthal PJ, Mckenrrow JH, Rasnick D, Leech H 1989. *Plasmodium falciparum*: inhibitors of lysosomal cysteine proteinases inhibit a trophozoite proteinase and block parasite development. *Mol Biochem Parasitol* 83: 131-139.
- Rosenthal PJ, Wollish WS, Palmer JT, Rasnick D. 1991 Antimalarial effects of peptide inhibitors of a *Plasmodium falciparum* cysteine proteinase. *J Clin Invest*

88: 1467-1472.

Rosenthal PJ, Lee GK, Smith RE 1993. Inhibition of a *Plasmodium vinckei* cysteine cures murine malaria. *J Clin Invest* 91:1052-1056.

Rosenthal PJ, Meshnick SR 1996. Haemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol* 83: 131-139.

Rosenthal PJ, Meshnick SR 1996. Haemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol* 83: 131-139.

Rosenthal PJ, 1998 Proteases of malaria parasites: new targets for chemotherapy. Review. *Emerg Infect Dis* 4: 49-57.

Rossi MA, Mengel JO 1992. The pathogenesis of chronic Chagas' myocarditis: the role of autoimmune and microvascular factors. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 34: 593-599.

Ruchel R, de Bernardis F, Ray TL, Sullivan PA, Cole GT..1992. Candida acid proteinases. Review. *J Med Vet Mycol* 30 (Suppl 1):123-132.

Runeberg-Roos P, Kervinen J, Kovaleva V, Raikhel NV, Gal S 1994. The aspartic proteinase of barley is a vacuolar enzyme that processes probarley lectin in vitro. *Plant Physiol* 105: 321-329.

Sá-Ferreira JA, Galvão-Castro B, Macedo W, Castro C 1983. Immunoglobulins and other serological parameters in Chagas'disease: evidence for increased IgA levels in the chronic digestive form. *Clin Exp Immunol* 52: 266-270.

Salas F, Fichmann J, Lee GK, Scott MD, Rosenthal PJ 1995. Functional expression of falcipain, a *Plasmodium falciparum* cysteine proteinase, supports its role as a

malarial hemoglobinase. *Infect Immun* 63: 2120-2125.

Santos-Buch CA, Teixeira AR 1974. The immunology of experimental Chagas disease. III. Rejection of allogeneic heart cells *in vitro*. *J Exp Med* 140: 38-53.

Santos PVA, Roffê E, Santiago H, Torres RA, Marino APMP, Paiva C, Silva AA, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J 2001. Prevalence of CD8⁺αβT cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L^{Low}LFA-1^{High}VLA-4^{High} activation phenotype and expression of IFN-γ inducible adhesion and chemottractant molecules. *Microbes Infect* 3: 971-984.

Sarkkinen P, Kalkkinen N, Tilgman C, Siuro J, Kervinen J, Mikola L 1992. Aspartic proteinase from barley grains is related to mammalian cathepsin D. *Planta* 186: 317-323.

Sartori AM, Lopes MH, Benvenuti LA, Caramelli B, di Pietro A, Nunes EV, Ramirez LP, Shikanai-Yasuda MA 1998. Reactivation of Chagas' disease in a human immunodeficiency virus-infected patient leading to severe heart disease with a late positive direct microscopic examination of the blood. *Am J Trop Med Hyg* 59: 784-786.

Savino W, Silva-Barbosa SD, Dardenne M, Ribeiro-dos-Santos R 1990. Anti-thymic cell autoantibodies in human and murine chronic Chagas' disease. *J Immunol Immunopharmacol* 4: 204-205.

Scharfstein J, Luquetti A, Murta ACM, Senna M, Rezende JM, Rassi A, Mendonça-Previato L 1985. Chagas' disease: serodiagnosis with purified Gp 25 antigen. *Am J Trop Med Hyg* 34: 1153-1161.

- Scharfstein J, Rodrigues MM, Alves CA, De Souza W, Mendonça-Previato L 1983. *Trypanosoma cruzi*: description of high-purified surface antigen defined by human antibodies. *J. Immunol* 131: 972-976.
- Scharfstein J, Schechter M, Senna M, Peralta JM, Mendonça-Previato L, Miles MA 1986. *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of a 57/51000 molecular weight surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J Immunol* 137: 1336-1341.
- Schechter I, Berger A 1967. On the size of the active site in proteases I papin. *Biochem Biophys Res Commun* 27: 157-162.
- Scher A, Oswald IP, Hieny S & Gazzinelli RT 1993. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN- γ response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumour necrosis factor- α . *J Immunol* 150: 3982-3989.
- Scheibel LW, Bueding E, Fish WR, Hawkins JT. 1984. Protease inhibitors and antimalarial effects. *Prog Clin Biol Res* 155:131-42.
- Schmunis GA 1991. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and non-endemic countries. *Transfusion* 31: 547-555.
- Schultz DC, Bazel S, Wright LM, Tucker S, Lange MK, Tachovsky SL, Niedbala S, Alhadeff JA 1994. Western blotting and enzymatic activity analysis of cathepsin D in breast tissue and sera of patients with breast cancer and benign breast disease and normal controls. *Cancer Res* 54: 48-54.
- Segui-Real B, Martinez M, Sandoval IV 1995. Yeast aminopeptidase I is post-translationally sorted from the cytosol to the vacuole by a mechanism mediated by its bipartite N-terminal extension. *EMBO J* 14: 5476-84.

- Seiffer MJ, Segal HL, Miller LL 1963. Separation of pepsin I, pepsin IIA, pepsin IIB, and pepsin III from human gastric mucous. *Am J Physiol* 205: 1099-1105
- Sher A, Gazzinelli RT, Jankovic D, Scharon-Kersten T, Yap G, Doherty TM, Wynn T 1998. Cytokines as determinants of disease and disease interactions. Review. *Braz J Med Biol Res* 31:85-7.
- Sielecki AR, Hayakawa K, Fujinaga M 1989. Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular active drugs, at 2.5 Å resolution. *Science* 243: 1346-1351.
- Silber AM, Búa J, Porcel BM, Segura L, Ruiz AM 1997. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/ BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Exp Parasitol* 85: 225-232.
- Silva, L.H.P., Nussenzweig, V 1953. Sobre uma cepa do *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol* 20: 191-207.
- Silveira AC 2000. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. *Cad Saúde Pública* 16 (Suppl. 2): 35-42.
- Silva-Jr, FP De Simone S.G. 2001 Proteases como alvos de quimioterapia. *Biotecnologia Ciencia & Desenvolvimento* 22. 12--17
- Soares MB, Santos RR 1999. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 257-62.
- Souto R, Fernandes O, Macedo AM, Campbell D, Zingales 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83: 141-152.

- Stolf NA, Higushi L, Bocchi E, Bellotti G, Auler JO, Uip D, Amato Neto V, Pileggi F, Jatene AD. 1987. Heart transplantation in patients with Chagas' disease cardiomyopathy. *J Heart Transplant* 6: 307-312.
- Suguna K, Bott RR, Padlan EA, Subramanian E, Sheriff S, Cohen GH, Davies DR 1987. Structure and refinement at 1.8 Å resolution of the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*. *J Mol Biol* 196: 877-900.
- Szecs PB 1992. The aspartic proteases. *Scand J Clin Lab Invest* 52: 5-22.
- Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JCS, Alves dos Santos PV, Michailowsky V, Farbar J, Lannes-Vieira J, Silva JSS, Gazzinelli RT 2000. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gama as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*'. *Microb Infect* 2: 1-16.
- Tang J 1971. Specific and irreversible inactivation of pepsin by substrate-like epoxides. *J Biol Chem* 246: 4510-4517.
- Tang J, Wong RNS 1987. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J Cell Biochem* 33: 53-63.
- Tarasova N, Denslow ND, Parten BF, Tran N, Nhuyen HP, Jones A, Roberts NB, Dunn BM 1995. A comparative study on amino acid sequences of three major isoforms of human pepsin A. *Adv Exp Med Biol* 362: 77-81.
- Tarleton RL, Grusby MJ, Zhang L 2000. Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 165: 1520-1525.

- Tarleton RL 1997. Immunity to *Trypanosoma cruzi*, p. 227-247. In SHE Kaufmann ed. RG. *Landes Host Response to Intracellular Pathogens*. Company, Austin, TX.
- Tarleton RL, Zhang L Downs MO 1997. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas' disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3932-3937.
- Teixeira MGM, Borges-Pereira J, Netizert E, Souza MLNX, Peralta JM 1994. Development and evaluation of an enzyme-linked immunotransfer blot technique for serodiagnosis of Chagas' disease. *Trop Med Parasitol* 45: 308-312.
- Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ 1990. A clonal theory of parasitic protozoa. The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2414-2418.
- Tibayrenc M 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol* 36: 47-115,
- Timms AR, Bueding E 1959. Studies of an enzyme from *Schistosoma mansoni*. *Brit J Pharmacol* 14: 68-73.
- Tökés ZA, Woon WC, Chambers SM 1974. Digestive enzymes secreted by the carnivorous plant *Nepenthes macfarlanei*. *L Planta* 119: 39-42.
- Toledo MJ, Guilherme AL, da Silva JC, de Gasperi MV, Mendes AP, Gomes ML, de Araujo SM 1997. *Trypanosoma cruzi*: chemotherapy with benznidazole in mice inoculated with strains from Paraná state and from different endemic areas of Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 39: 283-290.

- Tomas AM, Kelly JM 1996. Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine-proteinase of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA. *Mol Biochem Parasitol* 76: 91-103.
- Toogood HS, Prescott M, Daniel RM 1995. A pepstatin-insensitive aspartic proteinase from a thermophilic *Bacillus* sp. *J Biochem* 307: 783-789.
- Torrice F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y 1991. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 146: 3626-3632.
- Trischmann T, Tanowitz H, Wittner M, Bloom B 1978. *Trypanosoma cruzi*: Role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp Parasitol* 45: 160-168.
- Trischmann TM 1983. Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas'disease. *J Immunol* 30: 1953-1957.
- Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper Jr N, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira CV, Camargo ME 1996c. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas'disease. *J Clin Microbiol* 34: 2143-2147.
- Umezawa ES, Shikanai-Yasuda MA, Stolf AMS 1996a. Changes in isotype composition and antigen of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas'disease. *J Clin Lab Anal* 10: 407-413.
- Umezawa ES, Silveira JF 1999. Serological Diagnosis of Chagas'disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 285-288.

- Umezawa H, Aoyagi T, Morishima H, Matsuzaki M, Hamada M 1970. Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* 23: 259-262.
- Urbina JÁ, Payares G, Molina J, Sanoja C, Liendo A, Lazardi K, Piras MM, Piras M, Perez N, Wincker P, Ryley JF 1996. Cure of short-and long-term experimental Chagas 'disease using DO870. *Science* 273: 969-971.
- Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, Piras M, Piras R, Perez N, Wincker P, Loebenberg D. 1998. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and invivo studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:1771-1777.
- Van Noort JM, Jacobs MJM 1994. Cathepsin D, but not cathepsin B, releases T cell stimulatory fragments from lysozyme that are functional in the context of multiple murine class II MHC molecules. *Eur J Immunol* 24: 2175-2180.
- Van Voorhis WC 1992. Coculture of human peripheral blood mononuclear cells with *Trypanosoma cruzi* leads to proliferation of lymphocytes and cytokine production. *J Immunol* 1; 148:239-248.
- Vander-Jagt DL, Caughey WS, Campos NM, Hunsaker LA, Zanner MA 1989. Parasites proteases and antimalarial activits of proteases inhibitors. *Prog Clin Biol Res* 313: 105-18.
- Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Campos NM, Scarletti JV 1992. Localization and characterization of hemoglobin-degrading proteinases from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem Biophys Acta* 1122: 256-264.
- Veerapandian B, Cooper JB, Sali A, Blundell TL 1990. X-ray analyses of aspartic proteinases, III three-dimensional structure of endoyhiapepsin complexed with a

transition-state isostere inhibitor of a renin at 1.6 Å resolution. *J Mol Biol* 216: 1017-1029.

Venturini G, Salvati Muolo ML, Colasanti M, Gradoni L, Ascenzi P 2000. Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 270 (2): 437-441.

Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS 1994. Nitric oxide is involved in control of a *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun* 62: 1205-1214.

Vianna G 1911. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Carlos Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 3: 276-294.

Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E 1994. Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serological evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* 127: 151-162.

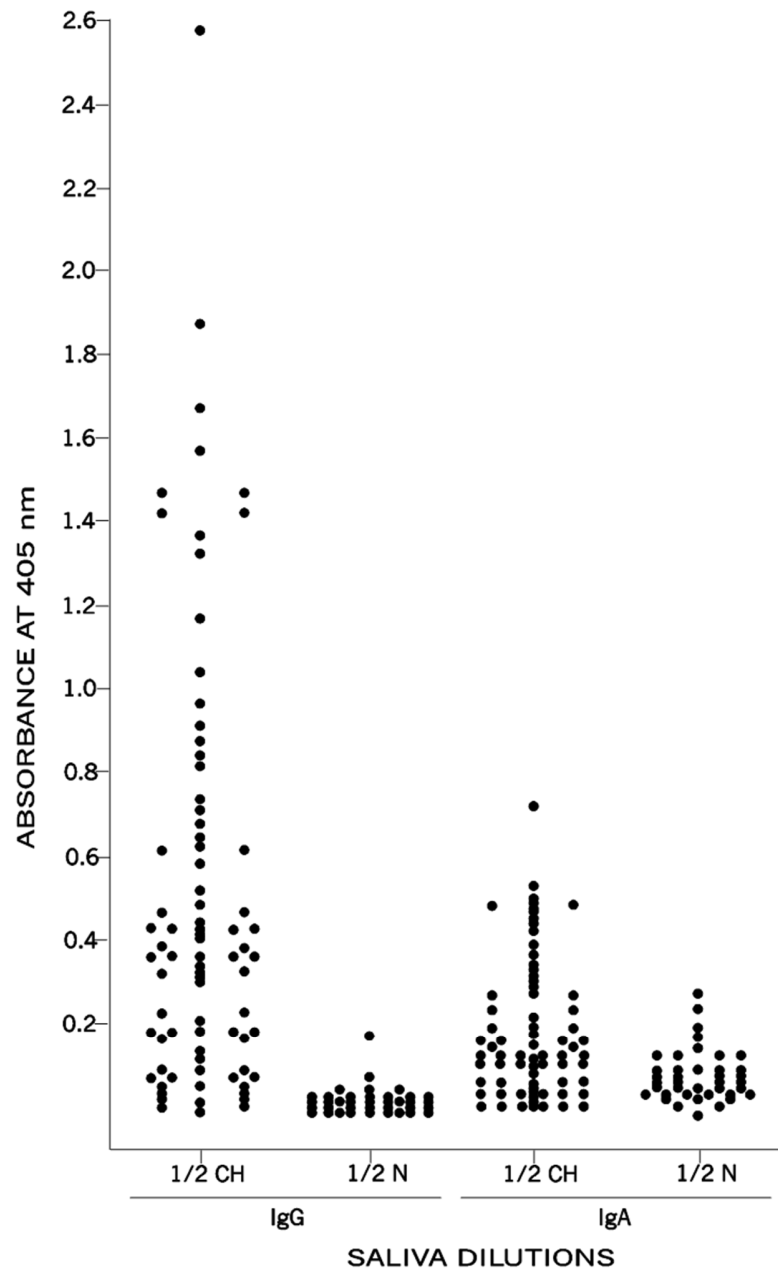
Voller A, Draper C, Bidwell DE, Bartlett AA 1975. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas' disease. *Lancet* 1: 426-429.

Weber IT 1990. Comparison of the crystal structures and intersubunit interactions of human immunodeficiency and Rous sarcoma virus proteases. *J Biol Chem* 265: 189-215.

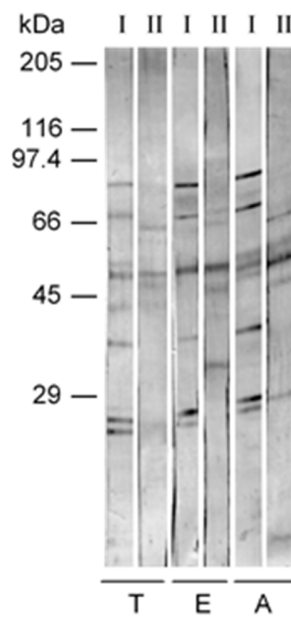
Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM, Breniere SF 1994. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiol Lett* 124: 419-23.

- White AC Jr, Molinari JL, Pillai AV, Rege AA. 1992. Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacestode proteases. *J parasitol* 78: 281-287.
- White TC, Miyasaki SH, Agabian N 1993. Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 175: 6126-6133.
- W.H.O–World Health Organization 2001. Health topics: Chagas'disease. <http://www.who.inf>.
- Wirth JJ, Kierszenbaum F, Zlotnik A 1989. Effects of IL-4 on macrophage functions: increased uptake and killing of a protozoan parasite (*T. cruzi*). *Immunology* 66: 296-301.
- Wong JYM, Harrop SA, Day SR, Brindley PJ 1997. Shistosomes express two forms of cathepsin D. *Biochem Biophys Acta* 1338: 156-160.
- Zhang L & Tarleton RL 1996. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production *Eur J. Immunol.*, 26 (1996), pp. 102–109
- Zhang L & Tarleton RL 1996. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp Parasitol* 84 (2): 203-213.
- Zotter C, Haustein UF, Schonborn C, Grimmecke HD, Wand H 1990. Effect of pepstatin A on *Candida albicans* infection in the mouse. *Dermatol Monatsschr* 176: 189-198.

ANEXO I



Detecção de anticorpos das classes IgG e IgA na saliva de pacientes com doença de Chagas de fase crônica. A saliva foi testada à diluição de 1/2. A metodologia utilizada foi a descrita em Pinho et al. (1999).

Anexo II

Western blot assay detect CYP-I and CYP-II in different stages from *T. cruzi*. Proteins (22 μg) of epimastigotes (E), trypomastigotes (T) and amastigotes (A), were homogenized in sample buffer (80 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 12 % glycerol, 5 % β -mercaptoethanol and 0.05 % bromophenol blue). Proteins were resolved by SDS-PAGE (8.5%), electrotransferred to nitrocellulose membrane and detected by using anti-CYP-I and anti-CYP-II antibodies from immunized rabbits. Molecular mass values of standard proteins ($M_r \times 10^3$) are indicated.

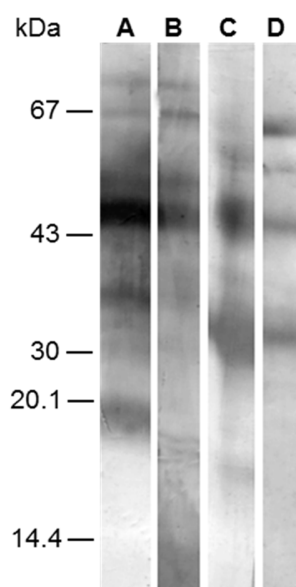
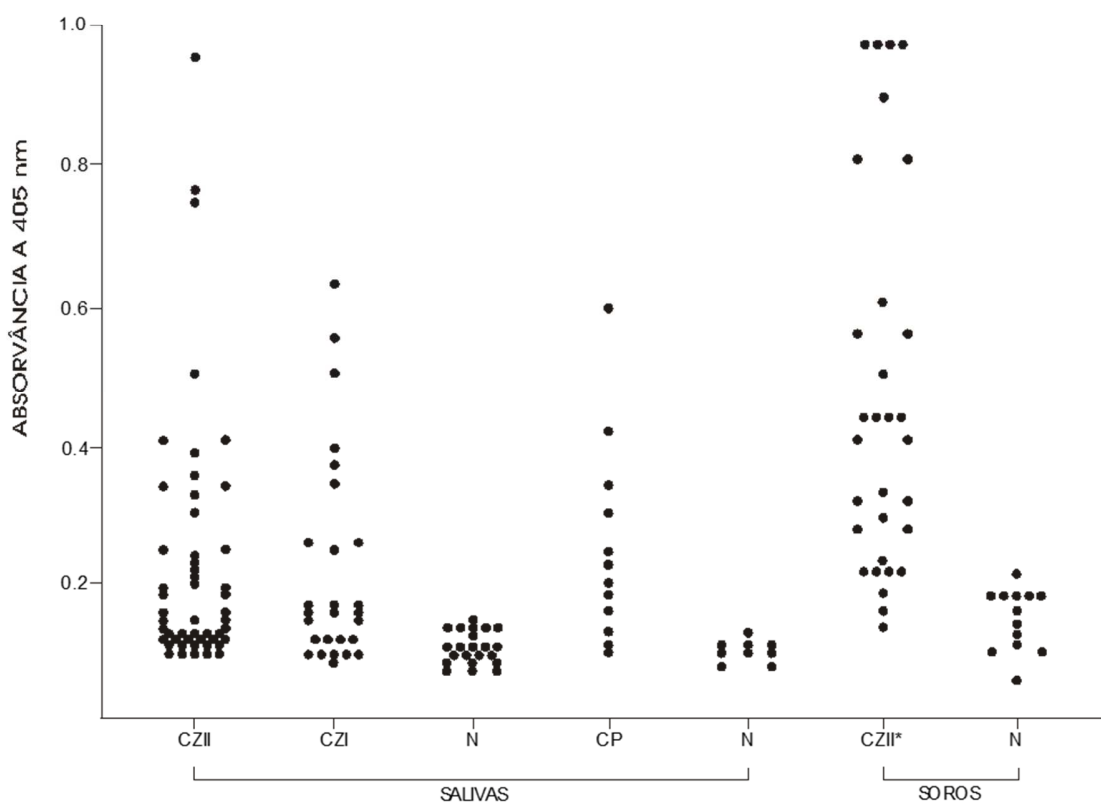
Anexo III

Fig. 4

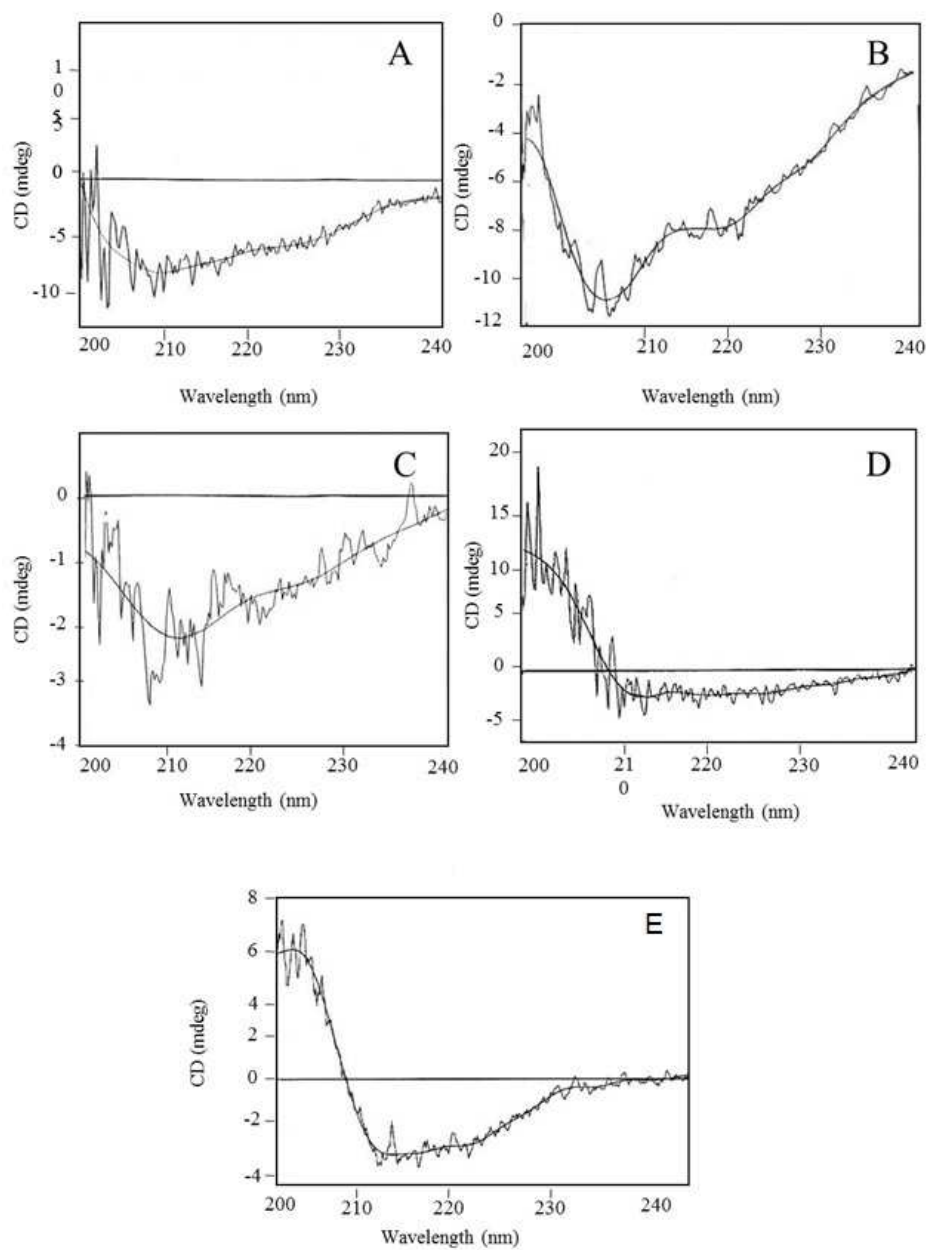
Western blot assay detect CZP-I (A, B) and CZP-II (C, D) specific antibodies in human chagasic serum. These fractions (23 ug) were resolved by SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membrane and assay was performed with anti-CZP-I (A), anti-CZP-II (C) rabbit immune serum and patient serum (B and D). The antibody reactivities were revealed with anti-rabbit and anti-human immunoglobulins peroxidase-conjugated, followed by incubation with H₂O₂ and 3,3'-Diaminobenzidine. Molecular mass values of standard proteins (Mr x10³) are indicated.

Anexo IV



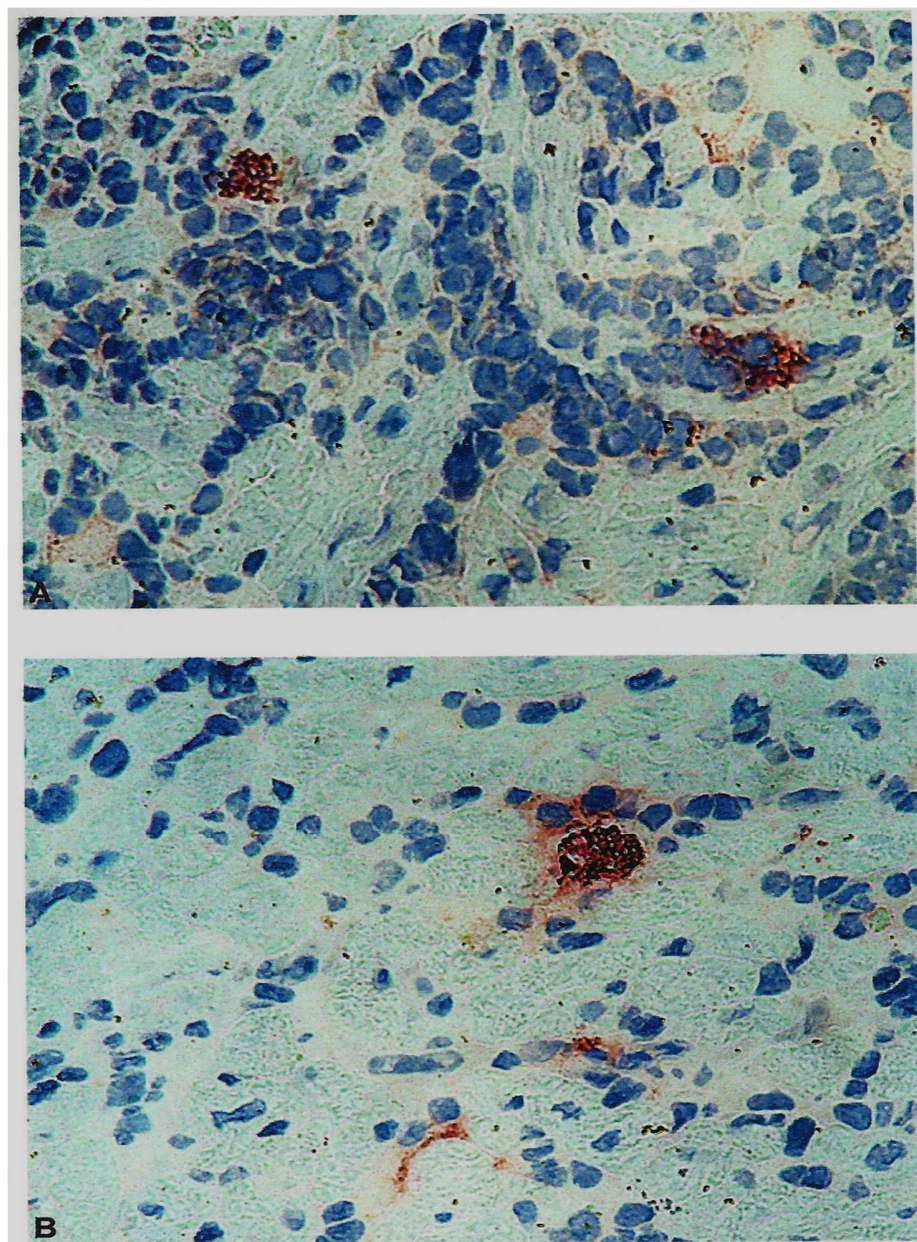
Detecção de anticorpos específicos da classe IgG, anti- CZP-I e anti CZP-II em saliva e soro de pacientes com doença de Chagas de fase crônica. A saliva foi testada à diluição de 1/2 e os soros a 1/250, com as frações CZP-I e CZP-II do *T. cruzi*. A enzima cisteína-proteinase (CP) do parasito foi testada com saliva. As placas de ELISA foram sensibilizadas com 0,1 µg (CP) e 0,17 µg (CZP-I e CZP-II) de proteína por poço.

Anexo V



Circular dichroism spectra of the CZP-I and CZP-II proteinases from *T. cruzi*. The CZP-I (A, B and C) and CZP-II (E) analysis was developed in the absence of CHAPS detergent. In (D) the CZP-I analysis was developed in presence of CHAPS.

Anexo VI



Detecção de enzimas CYP-I e CYP-II do *T. cruzi* em tecido murinho. As enzimas CYP-I (A) e CYP-II (B) foram detectadas usando soro policlonal de coelhos imunizados com CYP-I ou CYP-II, através de imuno-histoquímica (segundo Lannes-Vieira *et al* 1991) no infiltrado inflamatório mononuclear em coração de camundongos infectados com a cepa Colombiana. Aumento 400X