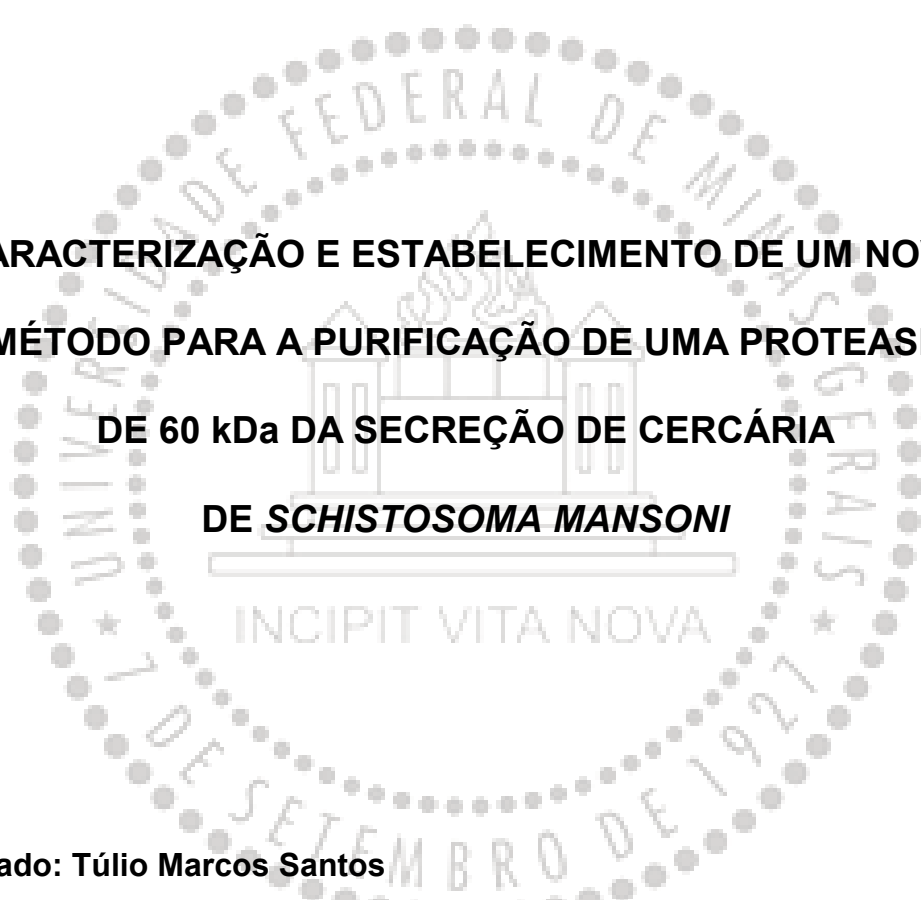


DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA



CARACTERIZAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE UM NOVO
MÉTODO PARA A PURIFICAÇÃO DE UMA PROTEASE
DE 60 kDa DA SECREÇÃO DE CERCÁRIA
DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

Orientado: Túlio Marcos Santos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares

Belo Horizonte – MG

Novembro, 1995

TÚLIO MARCOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE UM NOVO
MÉTODO PARA A PURIFICAÇÃO DE UMA PROTEASE
DE 60 kDa DA SECREÇÃO DE CERCÁRIA
DE *SCHISTOSOMA MANSONI***

Dissertação apresentada ao Departamento de
Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais como Requisito Parcial para a Obtenção
do Grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares

Belo Horizonte – MG

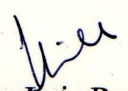
Novembro, 1995

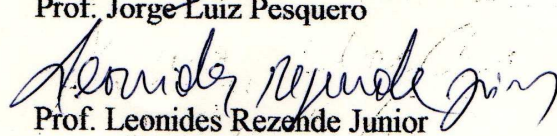


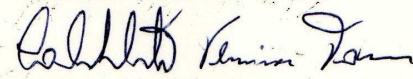
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


DECLARO para os devidos fins que TÚLIO MARCOS SANTOS cumpriu todas as obrigações curriculares do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais tendo em 24 de novembro de 1995 defendido sua dissertação de Mestrado intitulada "Caracterização e estabelecimento de um novo método para a purificação de uma protease de 60 Kda da secreção de cercária de *Schistosoma mansoni*" e sido aprovado pela Banca Examinadora composta pelos Professores Jorge Luiz Pesquero, Leonides Rezende Junior, Carlos Alberto Pereira Tavares-orientador.

Belo Horizonte, 24 de novembro de 1995


Prof. Jorge Luiz Pesquero


Prof. Leonides Rezende Junior

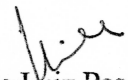

Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares
orientador

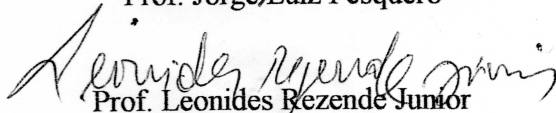

Prof. Paulo Sérgio Lacerda Beirão
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em
Bioquímica - Imunologia - I.C.B. - U.F.M.G.

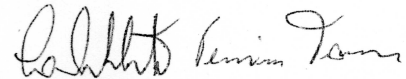
TÚLIO MARCOS SANTOS

“Caracterização e estabelecimento de um novo método
para a purificação de uma protease de 60 Kda da secreção de
cercária de *Schistosoma mansoni*”,

Defesa de dissertação aprovada em 24/11/1995
Banca Examinadora


Prof. Jorge Luiz Pesquero


Prof. Leonides Rezende Junior


Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares
orientador

Belo Horizonte - MG
UFMG - 1995

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Professor Carlos Alberto Pereira Tavares, pela oportunidade de fazer minha iniciação científica em seu laboratório, onde adquiri conhecimentos suficientes que me estimularam a continuar e a fazer o mestrado. Agradeço também por ter me aceito como seu aluno de mestrado e assim poder aprofundar meus conhecimentos. Durante este período tive a satisfação de estar sob sua orientação e pude contar com seu apoio e paciência, além de desfrutar de uma agradável convivência no dia-a-dia;

Aos Drs. Giovanni Gazzinelli e Rodrigo Corrêa Oliveira, da FIOCRUZ de Belo Horizonte, que gentilmente, por intermédio da Dra. Cecília P. de Souza, chefe do Setor de Malacologia, forneceram semanalmente as cercárias, indispensáveis à realização deste trabalho;

Ao Professor Paulo Marcos Zech Coelho, chefe do GIDE, a quem também sou muito grato pelas cercárias que puderam nos ceder;

Ao Dr. Carlos Chávez Olórtegui, pesquisador da FUNED, que admiro pela disposição e entusiasmo com que faz pesquisa, foi quem me iniciou nos experimentos de bancada, acompanhando seus trabalhos durante minha iniciação científica que sempre me incentivou e abriu as portas da FUNED para ajudar no que fosse preciso e assim muito tem contribuído;

À Rita de Cássia Soares França, eficiente e sempre prestativa laboratorista e excelente pessoa, pela amizade e pelo muito que me ajudou, além de tudo, se dispondo gentilmente em ir à FIOCRUZ de carro próprio trazer as nossas cercárias;

À Fernanda Coelho M. Jorge, estudante de iniciação científica, pela amizade e alegre convivência e pelo muito que ajudou enquanto estagiavam acompanhando meu trabalho;

À Kátia Moraes, Maria Ester S. Fontes e Aparecida F. S. Oliveira (Peu), todas eficientes e dedicadas laboratoristas, pela amizade e sempre espirituosa e agradável companhia no laboratório;

Aos companheiros de laboratório Luis Carlos Crocco, Ricardo Amaral e, em especial, à Rosângela Barbosa de Deus e Antônio Helvécio Totola, pela divertida amizade, companheirismo e sempre prestativa colaboração;

Ao Sr. Higino Andrade pela agradável companhia e apoio técnico e à Florence M. Rosa, laboratorista eficiente do moluscário do GIDE, pela sempre gentil atenção;

Aos Profs. Marcelo Santoro e Carlos Salas Bravo que sempre colocaram seus respectivos laboratórios à disposição daqueles que como eu deles, de uma forma ou de outra, sempre precisava;

Ao Jamil Silvano, dedicado e eficiente laboratorista, pela amizade e sempre pronta disposição em ajudar no que fosse preciso;

Ao funcionário Cássio M. Ferreira Costa, pelo apoio técnico no uso do aparelho de FPLC;

à Alessandra Starling, estudante de iniciação científica, e ao Luís e Gustavo, estagiários do COLTEC, que durante o período em que estiveram sendo treinados por mim também contribuíram para este trabalho;

Ao Wendel Meira, estudante de iniciação científica do laboratório do Prof. Sérgio Pena, pela amizade e prestativa e valiosa ajuda no preparo das fotografias deste trabalho;

Ao Professor Paulo S. L. Beirão, coordenador da Pós-Graduação, pelo bom trabalho que tem realizado pelos alunos de pós-graduação e, sobretudo pela paciência para comigo;

À Celise M. Ferreira Costa, secretária da pós-graduação, sempre eficiente, atenciosa e simpática;

Aos amigos de Departamento Márcio Arndt, Wanderley, Zé Maurício, Janete, Cristine e à Cláudia Lúcia, pela amizade e sempre divertida companhia.

A todos o meu **MUITO OBRIGADO!**

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Yvonne e José,
em reconhecimento aos seus esforços pela minha formação*

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	VIII
Lista de Tabelas	IX
Abreviaturas	X
Resumo	XI
Abstract	XIII
1. Introdução	1
1.1. Esquistossomose e o <i>Schistosoma mansoni</i>	2
1.2. Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	3
1.3. As glândulas acetabulares da cercária	7
1.4. Características da secreção de cercária e suas funções na penetração e migração da larva na pele do hospedeiro definitivo	9
1.5. Proteinases da secreção de cercária	11
1.6. Importância imunológica das proteinases da secreção de cercária de <i>S. mansoni</i>	15
2. Objetivos	21
3. Materiais e métodos	22
3.1. Obtenção das cercárias	23
3.2. Obtenção da secreção de cercárias	23
3.3. Dosagem de proteínas pelo método de Lowry	24
3.4. Cromatografia de filtração molecular	24
3.5. Cromatografia de afinidade em Sepharose-IgG de camundongo cronicamente infectado com <i>S. mansoni</i>	25

3.6. Cromatografia de troca iônica	26
3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	27
3.8. Coloração de géis de poliacrilamida com nitrato de prata	28
3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida polimerizado com gelatina	28
3.10. Determinação da atividade amidásica	29
3.11. Determinação do pH ótimo	30
3.12. Determinação da dependência de cálcio	30
3.13. Determinação da classe da enzima purificada	30
3.14. Reação imunoenzimática - ELISA (Enzyme Linked Immunesorbent Assay)	31
3.15. Reconhecimento imunológico de epítopos de carboidrato por reação imunoenzimática (ELISA) após oxidação com periodato	32
4. Resultados	33
4.1. Fracionamento da secreção de cercárias	34
4.2. Caracterização bioquímica e imunológica da protease de 60 KDa	38
5. Discussão	49
6. Conclusões	56
7. Referências bibliográficas	57

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo do <i>S. mansoni</i>	4
Figura 2. Cercária de <i>S. mansoni</i> mostrando o posicionamento das glândulas pré- e pós-acetabulares.	8
Figura 3. Cromatografia da secreção de cercária em Superdex 75	35
Figura 4. Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-IgG	36
Figura 5. Cromatografia de troca iônica em coluna de Mono Q	37
Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida das etapas de purificação da protease de 60 kDa da secreção de cercária de <i>S. mansoni</i>	40
Figura 7. Atividade amidásica da secreção de cercária de <i>S. mansoni</i> e da protease de 60 kDa.	41
Figura 8. Atividade proteolítica da enzima de 60 kDa após eletroforese em gel de poliacrilamida contendo gelatina como substrato	42
Figura 9. Demonstração da natureza glicoprotéica da protease de 60 kDa por oxidação de epítopos de carboidrato em ELISA	43
Figura 10. Determinação do pH ótimo de atividade da enzima de 60 kDa da secreção de cercárias	45
Figura 11. Temperatura ótima de atividade da enzima de 60 KDa	46
Figura 12. Influência do íon cálcio na atividade protease de 60 KDa	47

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela I. Purificação da protease de 60 KDa da secreção de cercárias	39
Tabela II. Efeito de inibidores específicos sobre a atividade da protease de 60 KDa	48

ABREVIATURAS

µl	micro litro
µm	micrômetro
BApNA	N _α -Benzoil-DL-Arginina p-NitroAnilida
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
kDa	quilo Dalton
M	Molar
mM	Milimolar
OPD	Ortofenilenodiamino
p/v	Peso por volume
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluoride
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TLCK	N _α -p-Tosyl-L-lysine Chloromethyl Ketone
TPCK	N-Tosyl-L-phenylalanine Chloromethyl Ketone
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
v/v	Volume por volume
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

RESUMO

SANTOS, T. M. **Caracterização e estabelecimento de um novo método para a purificação de uma protease de 60 kDa da secreção de cercária de *Schistosoma mansoni***. 1995. 67 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1995.

As glândulas acetabulares da cercária de *Schistosoma mansoni* produzem uma secreção que está envolvida no processo de penetração do parasita na pele do seu hospedeiro vertebrado. Nesta secreção existem proteinases que degradam macromoléculas da matriz extracelular da pele, participam da remoção do glicocálice e da transformação da larva cercariana em esquistossômulo e também induzem hipersensibilidade cutânea. Uma fração antigênica, capaz de induzir a liberação de histamina de mastócitos, foi obtida no nosso laboratório após passar uma fração parcialmente purificada da secreção de cercárias em uma coluna de Sepharose que continha IgGs de camundongos cronicamente infectados com *S. mansoni*. A fração imunogênica continha uma enzima de 60 kDa como componente principal que, entretanto, não estava isolada. Para concluir os estudos de caracterização bioquímica e imunológica desta enzima, desenvolvemos neste trabalho um novo método para a sua purificação. Filtração molecular, imunoafinidade e troca iônica foram as etapas de fracionamento cromatográfico utilizadas para obtenção da enzima purificada. A enzima de 60 kDa isolada é uma serino proteinase, inibida sobretudo por TLCK e TPCK, que apresenta atividade proteolítica sobre componentes de colágeno da pele. Sua atividade não é estimulada na presença de íons Ca^{2+} . O seu pH ótimo de atividade é 8,0 e sua temperatura ótima é a 40 °C. A enzima é de natureza glicoprotéica mas os carboidratos que fazem parte da sua estrutura não contém

resíduos de manose. A porção de carboidratos da proteinase de 60 kDa de cercária é o seu componente imunogênico principal apresentando em ELISA forte reação com soro de camundongo cronicamente infectado com *S. mansoni*.

Palavras chaves: *Schistosoma mansoni*, cercária, glândulas acetabulares, secreção de cercária, antígeno, serino proteases, glicoproteína.

ABSTRACT

SANTOS, T. M. **Characterization and establishment of a new method for purification of a 60 kDa protease from *Schistosoma mansoni* cercarial secretions.** 1995. 67 p. Dissertation (Marter's degree) - Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 1995.

The acetabular glands of the *Schistosoma mansoni* cercaria produce a secretion which is involved in the penetration process of this parasite into the vertebrate host skin. This secretion contains proteases that degrade macromolecules from the skin matrix, help to remove the glicocalix layer and in the transformation from cercaria into schistosomulum, and also induce cutaneous hypersensitivity reaction. An antigenic fraction able to induce histamine release from mastocytes was obtained previously by our group after passing a semi-purified fraction from cercaria secretion into a column which contained IgGs from mice chronically infected with *S. mansoni* bound to Sepharose beads. The antigenic fraction contained a 60 kDa enzyme as its main component that, nevertheless, was not completely purified yet. To conclude the biochemical and immunological characterization of this enzyme, we established in this work a new method for its purification. Gel filtration, immunoaffinity, and ion exchange were the chromatographic steps employed. The 60 kDa enzyme isolated is a serine protease, (inhibited mostly by TLCK and TPCK) that degrades collagen components from the skin. Its optimum activity is at 40 °C and at pH 8.0. Its activity is not stimulated in the presence of Ca²⁺. The enzyme is a glycoprotein but the carbohydrate in its structure does not contain manose. The carbohydrate portion of the 60 kDa protease purified from cercarial secretions is its main immunogenic component showing by ELISA strong reaction with serum from mouse chronically infected with *S. mansoni*.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, cercaria, acetabular glands, cercarial secretions, antigen, serine protease, glycoprotein.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esquistossomose e o *Schistosoma mansoni*

O gênero *Schistosoma* da família Schistosomatidae (LOOS, 1899) compreende os trematódeos digenéticos que vivem como parasitas no sangue do homem e de outros vertebrados. Deste gênero, as espécies *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* são as principais causadoras da doença humana conhecida como esquistossomose (NEVES, 1995).

A esquistossomose ocupa o 2^o lugar entre as parasitoses humanas mais disseminadas pelo mundo perdendo apenas para a malária. Sua área de abrangência envolve grandes extensões da África, Ásia, América do Sul e Caribe. Ao menos 200 milhões de pessoas, em 74 países, estão com esquistossomose e estima-se que 600 milhões correm risco de serem infectadas (WHO, 1993), que chega causar grave debilitação podendo ser letal ao indivíduo parasitado.

Na América do Sul, o Brasil é o país de maior incidência da esquistossomose. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (O. M. S.) apurados em 1981, 27% da população brasileira estava exposta ao *Schistosoma mansoni*, a espécie aqui encontrada, causadora da esquistossomose ou bilharziose intestinal.

O *Schistosoma mansoni* (SAMBOM, 1907) apresenta dimorfismo sexual assim como as demais espécies do seu gênero. Os machos têm as ventosas oral e ventral bem desenvolvidas, são achatados dorsoventralmente e menores que as fêmeas que são porém mais cilíndricas e delgadas. As extremidades laterais do corpo do macho se dobram ventralmente formando o canal ginecóforo. Durante seu ciclo de vida ocorre alternância de gerações onde a fase reprodutiva sexuada pelas formas adultas acontece no hospedeiro definitivo e o seu estágio assexuado multiplicativo ocorre em um molusco aquático (PESSÔA & MARTINS, 1982; NEVES, 1995).

1.2. Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*

Os vermes adultos de *S. mansoni* instalam-se nas veias mesentéricas ou no sistema porta hepático do hospedeiro onde ocorre o acasalamento. A fêmea, que vive a maior parte de sua vida alojada no canal ginecóforo do macho, é fecundada iniciando a postura de uma grande quantidade de ovos por dia. Parte destes ovos chega a atravessar a parede intestinal misturando-se às fezes (Fig. 1).

O ovo maduro, eliminado junto com as fezes do hospedeiro, ao entrar em contato com a água de lagos ou cursos d'água, eclode liberando uma larva ciliada de vida livre, o miracídio. No ambiente aquático, o miracídio nada ativamente até encontrar um molusco gastrópode planorbídeo do gênero *Biomphalaria* no qual penetra através do epitélio. No Brasil, *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* são as três espécies de caramujos que servem de hospedeiro intermediário ao *S. mansoni*.

Logo após a penetração no caramujo o miracídio torna-se sésil e começa a se diferenciar em esporocisto primário ou mãe. Células germinativas já existentes no miracídio proliferam por mitose e a partir delas desenvolvem-se, dentro do esporocisto I, os esporocistos filhos ou secundários. A maturação dos esporocistos filhos completa-se em torno do 15^o dia após a infecção pelo miracídio. Neste período a maioria deles abandona a forma mãe e avança por vasos e tecidos do molusco com destino ao hepatopâncreas ou ovotestis. Preferencialmente a larva se instala nos espaços linfáticos que cercam as glândulas digestivas do hepatopâncreas. Ao chegar ao seu destino final os esporocistos filhos têm a forma de pequenos sacos alongados, contendo dezenas de células germinativas na sua luz. Estas células germinativas incrementam em número por divisão mitótica podendo dar origem a cercárias, ou a massas germinativas que, por sua vez, produzem cercárias por poliembrionia. Em 20

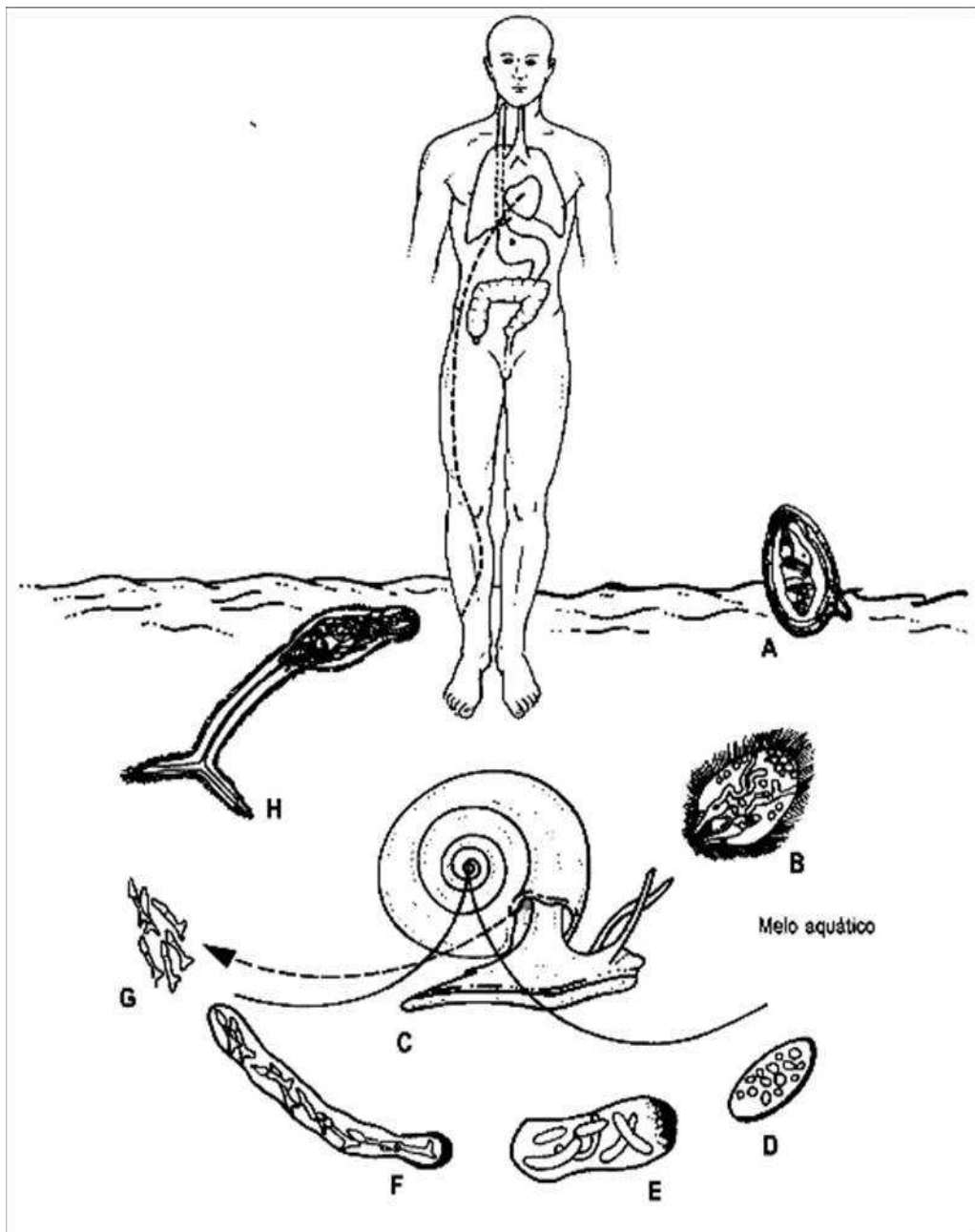


Figura 1. Ciclo do *S. mansoni*. A) ovo com miracídio alcançando a água; B) miracídio nadando para um caramujo — *Biomphalaria*; C) penetração do miracídio nas partes moles do caramujo; D) esporocisto; E) esporocisto; F) esporocisto 2º com cercárias dentro; G) cercárias saindo do caramujo; H) cercárias nadando para novo hospedeiro. Extraído de NEVES (1995).

ou 30 dias cercárias maduras começam a deixar o esporocisto e migram para o meio externo.

As cercárias são formas larvárias que medem ao todo 350 µm. Apresentam-se com tegumento recoberto por espículas e têm o corpo ovalado ligado a uma cauda longa e bifurcada que serve para natação. O verme adulto se desenvolverá a partir do corpo da larva, que contém células germinativas, as ventosas oral e ventral, os esboços embrionários de órgãos além dos sistemas glandulares de escape, na porção anterior, e de penetração, na metade posterior.

Sob influência da luz e temperatura nas horas mais quentes do dia, centenas de cercárias saem ativamente do corpo do caramujo através do colar do manto. Após ter emergido do hospedeiro intermediário *Biomphalaria sp.*, a larva tem um curto período de vida para encontrar e penetrar na pele do hospedeiro vertebrado.

Estando em contato com a pele do hospedeiro definitivo, a cercária adere-se a ela por meio da ventosa oral e inicia a penetração com fortes movimentos de contração do corpo e agitação da cauda secretando o material das suas glândulas (STIREWALT & FREGÉAU, 1966). O estímulo para penetração e transformação da cercária em esquistossômulo foi identificado como sendo devido a ácidos graxos essenciais livres insaturados existentes na superfície da pele do hospedeiro (MacINNIS, 1969; STIREWALT, 1971; SCHIFF & COLS., 1972; AUSTIN & STIREWALT, 1972). Em particular, o ácido linolênico é o mais potente estimulante da penetração bem como da liberação do conteúdo das glândulas das cercárias (SALAFSKY & COLS., 1984). Postula-se que papilas argentofílicas existentes na superfície apical da cercária sejam quimiorreceptores para a estimulação por lipídios (KING & HIGASHI, 1992) ativando proteína kinase C não dependente de cálcio (MATSUMURA & COLS., 1991).

A cercária perde a cauda ao penetrar na pele e começa a passar por mudanças na sua morfologia e fisiologia que determinam sua transformação em esquistossômulo. Este novo estágio larval caracteriza-se pela perda do glicocálice, mudança na estrutura do tegumento, sensibilidade à água, esvaziamento das glândulas além de outras alterações (STIREWALT, 1974).

Após passar pela camada córnea as cercárias progridem através do epitélio, atravessam a membrana basal atingindo a derme. Nas camadas mais profundas da pele, o esquistossômulo pode entrar num vaso periférico sangüíneo ou linfático. Num espaço de tempo de 20 a 70 horas após a penetração, os esquistossômulos já se acumulam no pulmão.

Do pulmão os esquistossômulos podem atingir o fígado passando pelo lado esquerdo do coração e daí para a circulação geral para, finalmente, chegar ao sistema porta. No interior dos vasos portais os vermes jovens alimentam-se de sangue pela primeira vez experimentando um rápido crescimento. Por volta do 23^o dia de infecção os vermes jovens migram para as veias mesentéricas onde se instalam, tornam-se adultos e acasalam. A postura dos ovos pode ter início 40 dias após a infecção pela cercária.

Caracteristicamente, os ovos de *S. mansoni* apresentam um espinho lateral que permite a eles resistir ao fluxo sangüíneo podendo auxiliar também na penetração da parede das vênulas. Enzimas histolíticas são liberadas pelo ovo a medida que ele passa através dos tecidos para a luz do intestino. Esta secreção histolítica é produzida durante o período de amadurecimento do embrião, permitindo o deslocamento dos ovos em meio aos tecidos do hospedeiro. A patologia da esquistossomose mansônica é caracterizada principalmente pela formação de reações granulomatosas eosinofílicas crônicas em torno dos ovos que ficam retidos no fígado e em outros tecidos. Os ovos maduros que conseguem atravessar a parede intestinal são

eliminados do corpo do hospedeiro em meio às fezes, completando-se assim o ciclo do parasita.

1.3. As glândulas acetabulares da cercária

A infecção do hospedeiro vertebrado pelo *S. mansoni* constitui um importante evento que depende da passagem da cercária pela pele. Ao entrar em contato com a pele do hospedeiro a cercária adere-se a ela por meio da ventosa oral e, para penetrar através dos tecidos da derme, a larva vale-se de abrasão física e rompimento mecânico dos tecidos além de secreções líticas produzidas por suas glândulas (STIREWALT & FREGÉAU, 1966).

O complexo secretório glandular utilizado na penetração ocupa grande parte da metade caudal do corpo da cercária. Estas glândulas foram observadas pela primeira vez por ITURBE (1917), que descreveu sua morfologia e sugeriu a possibilidade de participarem no processo de penetração e migração da larva através da pele.

STIREWALT & KRUIDENIER (1961) denominaram este grupo de glândulas cercarianas de acetabulares e, de acordo com a posição das mesmas em relação ao acetábulo (ventosa ventral), foram divididas em dois tipos: as pré-acetabulares e pós-acetabulares (**Fig. 2**). DORSEY & STIREWALT (1971) verificaram por microscopia eletrônica que as glândulas são morfologicamente exócrinas e funcionalmente holócrinas e têm seu material secretório armazenado em vesículas.

Não apenas pela posição, estes dois tipos de glândulas diferem entre si morfológica e funcionalmente, embora apresentem em comum poucas organelas pois grande parte do espaço celular foi ocupado pela secreção elaborada. As glândulas pré-acetabulares compreendem dois pares de células grandes, acidofílicas, de citoplasma macrogranular e em posição mais anterior que as demais. As pós-acetabu-

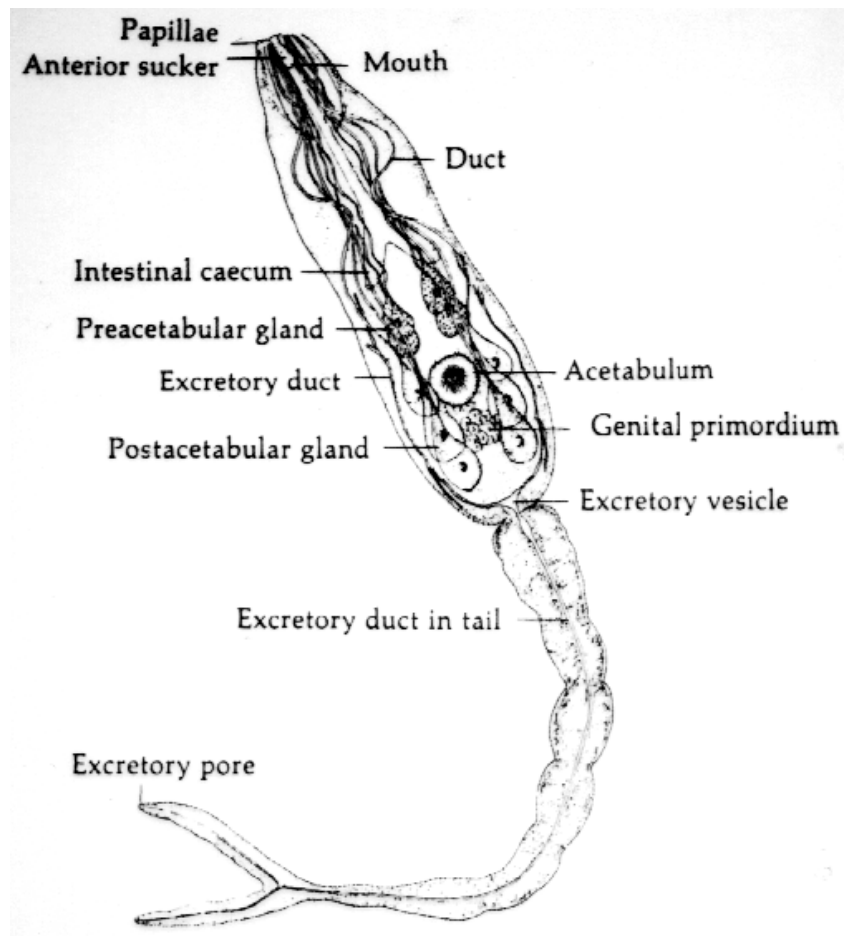


Figura 2. Cercária de *S. mansoni* mostrando o posicionamento das glândulas pré- e pós-acetabulares. Extraído de CHENG & BIER (1972).

lares compreendem outros três ou quatro pares de células menores, em posição posterior, basofílicas, de citoplasma microgranular (STIREWALT & KRUIDENIER, 1961; DORSEY & STIREWALT, 1971; KEMP & POWELL, 1970). Projeções do citoplasma de cada glândula formam um ducto que conduz o material secretório para fora da cercária (FISHELSON & COLS., 1992). Os ductos de cinco glândulas de cada lado da cercária unem-se em dois feixes que seguem anteriormente e se abrem para o exterior por duas aberturas dispostas uma ao lado da outra na ventosa oral (GORDON & COLS, 1934; STIREWALT & KRUIDENIER, 1961).

1.4. Características da secreção de cercária e suas funções na penetração e migração da larva na pele do hospedeiro definitivo

A importância das secreções glandulares no processo de penetração na pele tem sido enfatizada por diversos autores. CORT (1919) descreveu o fluxo dos conteúdos das glândulas durante a penetração da pele do hospedeiro pela cercária de *S. japonicum* e verificou que as glândulas desaparecem logo após a entrada da larva. FAUST (1920) concluiu que a cercária das principais espécies de *Schistosoma* que infectam o homem digeriam as camadas da pele do hospedeiro por meio do material secretado pelas glândulas e PINTO & ALMEIDA (1945) constataram a lise das células da camada malpighiana causada por uma substância histolítica produzida pelas glândulas acetabulares.

GORDON & GRIFFITHS (1951) verificaram que as glândulas pré-acetabulares foram usadas durante a penetração e passagem pelo extrato córneo e que o completo esvaziamento das glândulas pós-acetabulares estava relacionado com as últimas fases de migração na pele. LEWERT & LEE (1954) observaram extensas alterações na porção glicoprotéica da matriz extracelular da derme em especial na membrana basal e substância amorfa. Paralelamente mostraram também que os conteúdos das

glândulas foram liberados na superfície da pele e em túneis de migração nas camadas epidérmicas superficiais.

A purificação e caracterização de componentes do material secretado pela cercária tornaram-se importantes para elucidar a função das glândulas acetabulares. As glândulas pós-acetabulares coram fortemente pelo PAS indicando a presença de substâncias de natureza glicídica, como glicoproteínas e mucopolissacárides ricos em fucose e galactose (FAUST, 1920; KRUIDENIER & STIREWALT, 1954). Depósitos de secreção pós-acetabular coletados e analisados por cromatografia e histoquimicamente demonstraram conter aminoácidos, proteínas, carboidratos e lipídeos (STIREWALT & EVANS, 1960; STIREWALT & WALTERS, 1973). O material mucóide secretado por estas glândulas facilita a adesão da cercária na superfície da pele podendo também proteger o tegumento da larva durante os estágios iniciais da penetração, auxiliar na desagregação das camadas de queratina da pele do hospedeiro além de direcionar o fluxo do material restante a ser secretado (STIREWALT, 1974).

A existência de enzimas proteolíticas na cercária foi constatada por diversos autores a partir de extratos e secreções coletadas da larva, que demonstraram possuir atividade sobre vários substratos tais como hemoglobina, gelatina, Azocoll e cartilagem (LEWERT & LEE, 1954, 1956; MILLEMAN & THONARD, 1959; STIREWALT & FREGEAU, 1966), caseína (STIREWALT, 1963; DRESDEN & ASCH, 1972) e elastina (GAZZINELLI & PELLEGRINO, 1964). O material secretado pelas glândulas pré-acetabulares revelou ter atividade proteolítica (STIREWALT & HACKEY, 1956) tornando estas glândulas importantes para o processo de degradação observado *in situ* na pele. Esta atividade proteolítica foi detectada na cercária estando ausente no esquistossômulo (STIREWALT & FREGEAU, 1966). GAZZINELLI (1972) propôs que as enzimas pudessem atuar ainda no sentido de facilitar a nutrição da

larva na pele até que esta atingisse a circulação assim como poderiam desempenhar uma função desencadeante do processo de transformação da cercária em esquistossômulo. Secções histológicas de cercária incubadas em filmes de gelatina confirmaram a presença de enzimas proteolíticas nas glândulas pré-acetabulares (STIREWALT, 1973).

O conteúdo *in situ* das glândulas pré-acetabulares é alcalino , conforme determinado histoquimicamente, o que possibilitaria o “amolecimento” das camadas de queratina da pele facilitando a penetração da larva (LEWERT & COLS., 1966; CAMPBELL & COLS., 1976).

STIREWALT & KRUIDENIER (1961), LEWERT & COLS. (1966) e DRESDEN & EDLIN (1975) demonstraram por técnicas histoquímicas, microscopia eletrônica e raios-X a existência de uma grande quantidade de cálcio nestas glândulas, possivelmente na forma de carbonato de cálcio (DRESDEN & ASCH, 1977). O cálcio encontrado pode ter as funções de manter as proteinases pré-acetabulares num estado inativo até serem liberadas junto com a secreção e de participar como coenzima ou ativador das enzimas proteolíticas (LEWERT & LEE, 1956; DRESDEN & EDLIN, 1974, 1975). De outra forma, poderia atuar também como um agente estabilizante das secreções alcalinas das glândulas pré-acetabulares ou promover um aumento da viscosidade do muco secretado, permitindo a adesão das cercárias na pele, podendo estar envolvido também nas modificações químicas da superfície do parasita durante a transformação em esquistossômulo (STIREWALT, 1974).

1.5. Proteinases da secreção de cercária

As tentativas iniciais para purificar enzimas proteolíticas de cercária partiram de extratos e homogenatos da larva devido à inexistência de métodos eficientes de obter-se sua secreção em quantidade. GAZZINELLI & COLS. (1966), após fracionarem

extrato total de cercárias em coluna de troca iônica (DEAE-Sephadex), obtiveram três frações ativas sobre caseína. A fração de maior atividade foi submetida a uma cromatografia de filtração molecular em Sephadex G-100. Uma enzima, assim obtida parcialmente purificada, foi capaz de solubilizar elastina e apresentou atividade esterásica sobre ATEE (N-alfa-acetil-L-tirosinato de etila), com pH ótimo de atividade em torno de 8,0. Sua inibição por DPF (fluorofosfato de di-isopropila) permitiu caracterizá-la como uma serino proteinase.

Partindo de homogenatos de cercária LANDSPERGER & COLS. (1982) purificaram uma serino proteinase de 25 kDa capaz de degradar proteoglicanos de cartilagem. TZENG & COLS. (1983), utilizando esta mesma proteinase, verificaram que as cercárias de *S. mansoni* podem degradar enzimaticamente queratina, presente no extrato córneo da pele.

Duas outras enzimas de 28 e 60 kDa do tipo serino proteinases foram purificadas do sobrenadante usado na transformação de esquistossômulos por MARIKOVSKY & COLS (1988a). Estas enzimas têm atividade contra caseína, gelatina, fibronectina e elastina sendo que a de 28 kDa hidrolisa os componentes C3, C3b e C9 do complemento humano. Por imunohistoquímica a proteinase de 28 kDa foi encontrada estocada nas glândulas pré e pós-acetabulares da cercária, no glicocálice bem como na membrana dos esquistossômulos (MARIKOVSKY, 1990).

Dando sequência ao estudo destas enzimas, MARIKOVSKY & COLS. (1988b) apresentaram evidências de que estas proteinases participam da remoção do glicocálice e das moléculas ativadoras do complemento da superfície do esquistossômulo, conferindo a eles resistência à morte pelo complemento. Neste sentido, SAMUELSON & CAULFIELD (1985) já haviam sugerido que a perda do glicocálice fosse causada pelas secreções glandulares. Isto porque observaram que a

perda do glicocálice e a secreção dos conteúdos das glândulas acetabulares foram ambos inibidos por eserina sulfato.

McKERROW & COLS. (1985a) descreveram uma serino proteinase elastinolítica purificada de secreções das glândulas acetabulares estimuladas por lipídeos da pele. Esta enzima de 30 kDa degrada azocolágeno, gelatina, laminina e colágeno tipo IV e VIII, fibronectina e queratina (McKERROW & COLS., 1985b). Há pouco tempo, uma nova serino proteinase de 47 kDa, igualmente capaz de degradar macromoléculas existentes na pele, como elastina e colágeno tipo VI, foi purificada da secreção de cercária em nosso laboratório (CHÁVEZ-OLORTEGUI & COLS., 1992).

A relação temporal entre a secreção do conteúdo das glândulas acetabulares e o início da infecção junto com a observação que a migração da cercária/esquistosômulo em meio à pele resulta na degradação de componentes da matriz extracelular da pele, reforça a hipótese de que as enzimas proteolíticas encontradas no material secretado teriam o papel biológico de facilitar a penetração da cercária na pele do hospedeiro definitivo (McKERROW & DOENHOFF, 1988).

Um estudo mais aprofundado sobre as proteinases cercarianas foi feito depois que clones de cDNA da elastase purificada por McKERROW & COLS. (1985a) foram obtidos de uma biblioteca de esporocisto II de *S. mansoni* (NEWPORT & COLS., 1988). As sequências de aminoácidos determinadas a partir destes clones mostraram que a enzima cercariana é sintetizada como uma proenzima (zimógeno), o que permitiria uma regulação pós-traducional similar àquela dos fatores de coagulação e das proteinases digestivas dos vertebrados. Pesquisas de homologia feitas com estas sequências indicaram que a proteinase está mais estreitamente relacionada com as serino proteinases de mamíferos (família das tripsinas). Demonstrou-se também que a biosíntese desta proteinase é regulada ao nível transcricional estando limitada ao

período de desenvolvimento da cercária no interior do esporocisto (NEWPORT & COLS., 1990).

COHEN & COLS. (1991) determinaram a estrutura tridimensional desta enzima por modelagem computacional, com base na sua sequência primária, o que permitiu evidenciar um grande sítio de ligação hidrofóbico S1 além de um sítio de ligação S4. Inibidores peptídicos desenhados com base neste modelo foram produzidos e testados em cercárias vivas e impediram a penetração em secções de pele humana.

Hibridizações *in situ* utilizando sondas de cDNA evidenciaram que os transcritos da enzima de 30 kDa estão presentes em duas grandes células na porção posterior da cercária em desenvolvimento (FISHELSON & COLS., 1992). Estas células mais tarde se diferenciam nas glândulas acetabulares (DORSEY, 1975). Entretanto, os mesmos transcritos não foram detectados nas glândulas da cercária madura.

Por meio de anticorpos anti-proteinase de 30 kDa FISHELSON & COLS. (1992) demonstraram que a enzima acumula-se progressivamente nas glândulas pré e pós-acetabulares, durante o desenvolvimento embrionário da cercária, armazenada em vesículas. Durante a penetração da pele humana, grupos destas vesículas foram localizadas intactas nos ductos e à frente das cercárias. Vesículas de proteinase rompidas foram observadas adjacentes a células epidérmicas e membrana basal degradadas e ao longo do corpo da larva (FISHELSON & COLS., 1992).

A localização destas vesículas é, portanto, consistente com a proposta de uma função dupla para estas enzimas que participariam da digestão do tecido e remoção do glicocálice da superfície da larva, auxiliando na metamorfose para o próximo estágio do parasita (FISHELSON & COLS., 1992). Desta maneira, o aparato enzimático das glândulas acetabulares permite à cercária não só invadir a pele do hospedeiro como também escapar dos danos causados pelo sistema do

complemento. A perda do glicocálice é um fenômeno importante uma vez que ele é um poderoso ativador do complemento o que seria potencialmente letal para o parasita (FISCHELSON, 1989).

1.6. Importância imunológica das proteinases da secreção de cercária de *S. mansoni*

O material secretado pela cercária contém as primeiras moléculas potencialmente imunogênicas do parasita a entrar em contato com o hospedeiro. MINARD & COLS. (1978) demonstraram que o material de secreção de cercária é capaz de induzir a produção de anticorpos dos isotipos IgG e principalmente IgE em camundongos, embora não fossem suficientes para proteger contra infecções desafio.

Empregando antígenos de ovo, verme adulto e de cercária tem sido possível distinguir sorologicamente as fases aguda e crônica da esquistossomose por reação imunoenzimática (ELISA). LUNDE & COLS., (1979) observaram que soros de pacientes com esquistossomose aguda e de macacos com 2 meses de infecção reagem mais com antígeno de cercária do que com antígeno de verme adulto, enquanto que soros de pacientes com esquistossomose crônica e de macacos com mais de 4 meses de infecção reagem melhor ao antígeno de verme adulto.

Soros de camundongos infectados com *S. mansoni* e soros de pacientes portadores de esquistossomose têm mostrado reatividade com secreções de cercárias por ELISA ou Western-blot (PINO-HEISS & COLS., 1986), indicando a existência de uma resposta específica para estes antígenos. Estes autores observaram uma resposta temporária de IgM para enzimas de cercária com soros de camundongos infectados e de pacientes na fase aguda da esquistossomose.

CHÁVEZ-OLORTEGUI (1993), em sua tese de doutorado, verificou que anticorpos monoclonais, produzidos contra uma proteinase de 47 kDa da secreção de

cercárias, são capazes de mediar a atividade citotóxica do sistema do complemento para esquistossômulos *in vitro* e de inibir a atividade enzimática da secreção de cercárias. Além disso, conferiram proteção a camundongos imunizados passivamente, frente a uma infecção por cercárias. Este autor demonstrou também que imunizações de camundongos feitas com frações de secreção de cercária parcialmente purificadas, contendo a enzima de 47 kDa, foram capazes de induzir cerca de 30% de proteção, além de uma redução do número de ovos produzidos pelos vermes. Recentemente verificamos que a proteinase de 47 kDa, quando utilizada como antígeno em ELISA, permite discriminar 85% dos soros de pacientes de fase aguda daqueles de fase crônica com base nos seus títulos de IgM (JORGE & COLS., 1995).

Em diferentes espécies de animais, em humanos também, a penetração da cercária na pele está associada com uma reação inflamatória local. Esta reação é caracterizada pela formação de edema e de um infiltrado rico em células polimorfonucleares e mononucleares em camundongos normais e, na pele de cobaias vacinadas com cercárias irradiadas, por um incremento no número de eosinófilos (PEARCE & McLAREN, 1986). Entretanto, os mecanismos envolvidos, assim como o significado desta resposta inflamatória e sua relevância para a infecção do hospedeiro, não estão ainda bem definidos.

Em infecções primárias esta resposta inflamatória parece ser induzida por proteinases da cercária. TEIXEIRA & COLS. (1993) observaram que extratos de cercária e sobrenadante usados na transformação de esquistossômulos, quando injetados por via intradérmica em cobaias normais, induziram um aumento dose dependente na formação de edema local e acumulação de neutrófilos e eosinófilos. As respostas eram rápidas (maioria em 30 min) e independentes de nova síntese de proteínas quimiotáticas (como citocinas). Esta capacidade de induzir formação de edema e acumulação de leucócitos foi significativamente correlacionada com a

atividade proteolítica dos extratos. Quando os extratos eram injetados juntamente com Trasylol, inibidor de tripsina de soja, PMSF ou heparina e antagonistas de mediadores conhecidos da inflamação tais como leucotrieno e PAF (fator agregador de plaquetas) houve redução do edema e da acumulação de eosinófilos.

TEIXEIRA & COLS. (1993) postulam que a infiltração de células inflamatórias verificada, pode ser devida à liberação de citocinas pelos mastócitos em resposta a proteínas catiônicas ou devido à quebra de C3 pelas proteinases de cercária, fato já demonstrado por MARIKOVSKY & COLS. (1988a), ou de C5 do fluido extracelular, determinando a produção de C5a, um potente fator quimiotático de eosinófilos. A interação de proteinases com células inflamatórias pode induzir a liberação de PAF e leucotrieno, dois derivados de fosfolípidos que contribuem também para a acumulação de eosinófilos. Já a formação de edema, pode ocorrer devido a uma atividade das proteinases da cercária semelhante àquela das calicreínas levando a formação de cininas pró-inflamatórias (TEIXEIRA & COLS., 1993).

Permanece para ser determinado se esta resposta inflamatória é protetora para o hospedeiro ou benéfica para o parasita. A formação de edema local juntamente com a infiltração de células inflamatórias pode aumentar a destruição do tecido e assim facilitar o deslocamento do parasita, contribuindo para o sucesso da infecção. Por outro lado, a inflamação da pele permitiria que células do sistema imune migrassem para o sítio de penetração eliminando o parasita.

Resistência adquirida ou “imunidade concomitante” são termos utilizados para descrever a situação em que esquistossômulos de uma infecção secundária são susceptíveis à resposta imune, enquanto que os vermes adultos de uma infecção prévia indutores desses mecanismos não são afetados (SMITHERS & TERRY, 1969). Uma característica importante da imunidade concomitante parece ser a indução de uma resposta anafilática cutânea. Além do mecanismo citotóxico mediado por IgE e

efetuado por macrófagos, acredita-se que esta classe de anticorpos pode estar envolvida na resistência adquirida pelo seu papel em reações anafiláticas (CAPRON & COLS., 1977). O anticorpo IgE atua através da liberação de produtos pré-formados (aminas vaso ativas) dos mastócitos sensibilizados mediando a geração de anafilatoxinas e conseqüentemente uma resposta inflamatória. MURRET & COLS. (1978) e CAPRON & COLS. (1980) observaram que no curso da infecção experimental com *S. mansoni* existe correlação entre a resposta por IgE e o desenvolvimento da imunidade à reinfeção. A infecção crônica com *S. mansoni* produz no camundongo maior resistência à migração de esquistossômulos na pele, fato verificado pelo número de esquistossômulos vivos recuperados deste tecido, quando comparados com camundongos normais (GERKEN & COLS., 1984).

Extratos de cercária de *S. mansoni* podem induzir uma resposta inflamatória na pele de camundongos infectados (COLLEY & COLS., 1972). CHÁVEZ-OLÓRTEGUI (1986) verificou que a secreção de cercárias é capaz de liberar histamina de mastócitos coletados da cavidade peritoneal de camundongos cronicamente infectados com *S. mansoni*. Em sua tese de mestrado, o mesmo autor demonstrou que pelo menos dois componentes da secreção cercariana são capazes de desencadear a liberação de até 50% do conteúdo de histamina de mastócitos da cavidade peritoneal de camundongos cronicamente infectados com *S. mansoni*.

Para isolar os componentes liberadores de histamina eventualmente responsáveis pela resistência adquirida, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI (1986) fracionou a secreção de cercária em coluna de Sephadex G-150 SF. O primeiro pico contendo a fração protéica de alto peso molecular foi o que apresentou capacidade liberadora de histamina. Este pico foi submetido a uma cromatografia de afinidade em coluna de imunoglobulinas G (IgG) de camundongos cronicamente infectados com *S. mansoni* acopladas a uma matriz de Sepharose. Duas frações capazes de liberar histamina

foram obtidas desta coluna: uma que não reagiu e outra que reagiu com as IgGs da coluna. A fração antigênica, denominada de IF2, que havia se ligado às IgGs da coluna, continha uma banda de 60 KDa que aparentava estar bastante purificada quando em géis de poliacrilamida corados com prata. Esta molécula era reconhecida por IgE. Entretanto, em géis de poliacrilamida contendo gelatina como substrato, esta fração apresentava outras bandas de proteólise. Quando testada em Westernblot, os soros de camundongos cronicamente infectados reconhecem na fração IF2 outras bandas além daquela de 60 KDa

Em resumo, está estabelecido que a infecção por *S. mansoni* ocorre pela penetração ativa da cercária na pele do hospedeiro humano. Durante este processo a larva secreta proteinases produzidas em suas glândulas acetabulares que degradam componentes da pele, participam da remoção do glicocálice e da transformação em esquistossômulo, além de terem um papel indutor no fenômeno de hipersensibilidade cutânea decorrente da infecção pela cercária.

Por serem os primeiros componentes potencialmente antigênicos do parasita a entrar em contato com o hospedeiro, bem como importantes mediadores da infecção, as proteinases acetabulares de cercária constituem alvos interessantes para estudos de imunoproteção e imunodiagnóstico em esquistossomose. A compreensão dos mecanismos e relevância da resposta inflamatória induzida pelas proteinases de cercária pode ajudar a entender o processo de penetração da larva e a descobrir meios de impedi-lo. Assim, é importante isolar e caracterizar antígenos imunologicamente relevantes existentes na secreção de cercária, trabalho que vem sendo desenvolvido há alguns anos em nosso laboratório.

A atividade enzimática da proteína de 60 kDa ainda não foi caracterizada. Para isso torna-se necessário o seu isolamento. Neste trabalho apresentamos um método

de purificação da proteinase de 60 kDa bem como a sua caracterização bioquímica e imunológica.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Purificar e caracterizar bioquímica e imunologicamente componentes antigênicos importantes da secreção de cercária de *Schistosoma mansoni*.

Objetivos específicos:

- 1 - Estabelecer um método de purificação capaz de isolar uma proteinase de 60 kDa da secreção de cercária;
- 2 - Caracterizar bioquímica e imunologicamente a proteinase de 60 kDa purificada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das cercárias

Cercárias da cepa L.E., Belo Horizonte, Brasil, foram obtidas de caramujos *Biomphalaria glabrata* de acordo com a técnica descrita por FREITAS & COLS. (1975), em moluscários do Setor de Malacologia do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) de Belo Horizonte e do Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose (GIDE) do ICB-UFMG.

Para obtenção das cercárias procedeu-se conforme a técnica de PELLEGRINO & MACEDO (1955). Caramujos em fase de eliminação de cercárias foram colocados em um Becker com água destilada e expostos à luz artificial por duas horas com a finalidade de estimular a saída das cercárias. Em seguida, transferia-se a suspensão diluída de cercárias para um filtro de placa porosa Jeena Schott-25, D3, de 500 ml, onde as larvas foram lavadas com água destilada e concentradas até um número entre 2.000 - 3.000 organismos por ml.

O número de cercárias foi estimado pela contagem média de seis amostras obtidas da suspensão no filtro de placa porosa. Cada amostra foi contada, com o auxílio de uma lupa, em placa de vidro de fundo escavado na qual as cercárias foram previamente fixadas e coradas com solução de lugol a 5%.

3.2. Obtenção da secreção de cercárias

A secreção de cercárias foi coletada de acordo com o método de OLIVEIRA (1973) e de BABA & COLS. (1977). A suspensão concentrada de cercárias foi dividida em alíquotas de 10 ml (20.000 a 30.000 larvas) em tubos plásticos cônicos de 15 ml. Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 20 minutos com a finalidade de imobilizar as cercárias. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 150 g por 1 minuto, descartando-se o sobrenadante. O *pellet* de cercárias foi ressuspenso em solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) $1,6 \times 10^{-4}$ M, pH 7,2-7,4 a 4 °C e lavado 4

vezes com 2 ml desta solução por centrifugações a 150 g durante 30 s cada vez com agitações breves em vortex entre uma lavagem e outra. Após a última lavagem o *pellet* de cercárias, em um volume residual de 0,2 ml, foi incubado em banho Maria a 30 °C por 40 minutos. Em seguida as cercárias foram lavadas mais 4 vezes da mesma forma com 0,5 ml de solução de NaCl 0,88% (p/v) a 4 °C, coletando-se o sobrenadante de cada lavagem. Os sobrenadantes assim coletados foram reunidos e estocados a -20 °C. O material de secreção de cercária obtido de 3 ou 4 extrações foi reunido e centrifugado a 4 °C por 60 minutos a 27.000 g, com o objetivo de eliminar qualquer contaminação por cercárias, esquistossômulos, caudas ou seus fragmentos. O sobrenadante foi concentrado e dialisado em tampão bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) 10 mM, pH 8,2 por ultrafiltração a 4 °C em um concentrador Amicon (Amicon, EUA), liofilizado e o pó, contendo a secreção de cercária, estocado a -20 °C para uso posterior.

3.3. Dosagem de proteínas pelo método de Lowry

As dosagens de proteínas foram feitas pelo método descrito por LOWRY & COLS. (1951), com adaptações sugeridas por BERGMEYER (1988) para micro escala e máximo de sensibilidade. Para cada dosagem fazia-se uma curva padrão com 5 diluições diferentes de uma solução estoque 1mg/ml (OD 660 a 280 nm) de albumina de soro bovino (BSA, Sigma).

3.4. Cromatografia de filtração molecular

A primeira etapa de purificação da protease de 60 kDa da secreção de cercária foi feita por cromatografia de gel filtração utilizando-se uma coluna pré-empacotada High Load Superdex 75 (Pharmacia, Suécia) de 1,6 x 62 cm (void de 42,0 ml), que

possui uma capacidade de separação de proteínas com peso molecular entre 3 kDa e 70 kDa. A coluna foi previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 150 mM, pH 8,2 contendo 20 mM de NaCl no sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography - Pharmacia, Suécia). A coluna foi previamente calibrada com uma mistura de proteínas padrões de peso molecular conhecido (Sigma, EUA) contendo albumina bovina (66.200), ovalbumina (45.000), anidrase carbônica (29.000) e citocromo C (12.000) para determinação de peso molecular. A secreção de cercária liofilizada foi ressuspensa no tampão de equilíbrio da coluna e aplicada num volume de 2 ml contendo 9 mg de proteína. O fluxo de tampão através da coluna foi mantido em 1ml/min e foram coletadas frações de 2 ml cujo conteúdo de proteínas foi constantemente monitorado a 280 nm. A atividade enzimática de cada fração foi determinada pela hidrólise do substrato sintético BApNA (N_{α} -Benzoil-DL-Arginina p-NitroAnilida) de acordo com o método de ERLANGER & COLS. (1961) descrito logo abaixo. O peso molecular das proteínas presentes em cada fração foi também monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As frações entre 43 e 46 ml do volume de eluição, que continham a proteína de 60 KDa foram reunidas, dialisadas em tampão bicarbonato de amônio 10 mM pH 8,2 a 4°C por 18 horas e liofilizadas.

3.5. Cromatografia de afinidade em Sepharose-IgG de camundongo cronicamente infectado com *S. mansoni*

A segunda etapa de purificação da protease de 60 kDa da secreção de cercárias foi feita por cromatografia de afinidade em Sepharose-IgG de camundongo cronicamente infectado com *S. mansoni*. Imunoglobulinas G de camundongos C57BL/10 portadores de infecção esquistossomótica crônica (120 dias) foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A-Sepharose

(Pharmacia, Suécia) de acordo com a técnica descrita por EY & COLS. (1978). As imunoglobulinas purificadas (40 mg) foram ligadas a 2g de resina Sepharose-4B (Pharmacia, Suécia) ativada com brometo de cianogênio conforme instruções do fabricante. A cromatografia de afinidade foi feita de acordo com CHÁVEZ-OLÓRTEGUI (1986) conforme descrito a seguir. O material liofilizado contendo a proteína de 60 kDa, obtido do primeiro pico eluído em Superdex 75, foi ressuspenso em 2 ml de tampão PBS (phosphate buffered saline) 0,05 M pH 7,2 e aplicado na coluna de Sepharose-IgG equilibrada com PBS. As proteínas foram deixadas em contato com a resina por 16 horas a 4 °C em um fluxo de 5 ml por hora mantido por bomba peristáltica Microperpex 2132 LC (Pharmacia LKB, Suécia). A coluna foi lavada por 2 horas com PBS, em um fluxo de 20 ml/h, coletando-se frações de 2 ml monitoradas a 280 nm até que não fossem mais detectadas proteínas que não tivessem reagido com as IgGs. Posteriormente, os antígenos que se ligaram às IgGs foram eluídos com 20 ml de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 11 e colhidos em frações de 2,0 ml em tubos contendo 0,6 ml de glicina-HCl 0,1 M pH 2,8 para neutralização imediata das frações. A coluna foi reequilibrada com PBS e guardada a 4 °C com merthiolate (0,01% p/v). As frações antigênicas assim eluídas foram reunidas e dialisadas em Tris-acetato 25 mM, pH 8,5 por 18 hs a 4 °C.

3.6. Cromatografia de troca iônica

A terceira e última etapa de purificação da protease de 60 kDa da secreção de cercárias foi feita por cromatografia de troca iônica. A fração antigênica contendo a proteína de 60 kDa, chamada de IF 2, eluída da coluna de Sepharose-IgG, foi aplicada sem concentrar, após ter sido dialisada, em uma coluna de troca aniônica Mono-Q HR 5/5, (Pharmacia, Suécia) equilibrada com tampão Tris-acetato 25 mM, pH 8,5. As proteínas retidas na coluna foram eluídas no sistema FPLC em um fluxo

constante de 0,5 ml/min por meio de um gradiente salino de 0 a 1 M de cloreto de sódio feito a partir de tampão Tris-acetato 25 mM pH 8,5 contendo 1 M de cloreto de sódio. O gradiente foi crescente no período de 0 a 15 minutos e interrompido em 0,05 M por 15 minutos para eluição da proteína de 60 kDa. Foram coletadas frações de 1 ml cujo conteúdo de proteína foi monitorado a 280 nm. O peso molecular das proteínas presentes em cada fração foi monitorado por SDS-PAGE.

3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As eletroforeses em géis de poliacrilamida contendo o detergente sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) foram feitas de acordo com LAEMMLI (1970). Géis de 5 x 8,5 cm x 1,5 mm foram preparados e corridos no sistema Mini Protean II (Bio-Rad, EUA). Os géis foram feitos a partir da diluição a 10% de uma solução estoque (p/v) de Acrilamida:Bis-Acrilamida (30%:0,8%) em Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1% (p/v) para preparação do gel de corrida e a 4% em Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1% (p/v) para o gel de aplicação. Os géis foram polimerizados adicionando-se persulfato de amônio 0,1% (p/v) e TEMED 0,1% (v/v) às soluções. As amostras de proteína aplicadas nos géis foram diluídas 1:1 em tampão de amostra (SDS 2% p/v, Glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0,005% p/v em Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8) e fervidas por 5 minutos. Quando necessário, β -Mercaptoetanol (Sigma, EUA) na concentração de 5% v/v foi adicionado no tampão de amostra como agente redutor de pontes de dissulfeto entre resíduos de amino ácidos de cisteína. A eletroforese foi feita a 150V utilizando a solução Tris 50 mM, glicina 384 mM, SDS 0,1% (p/v) como tampão de corrida. A mistura padrão SDS-6H (Sigma, EUA) contendo miosina (205.000), β -galactosidase (116.000), fosforilase *b* (97.400), albumina bovina (66.200), ovalbumina (45.000) e anidrase carbônica (29.000) foi corrida simultaneamente para determinação do peso molecular nos géis comuns e com gelatina.

3.8. Coloração de géis de poliacrilamida com nitrato de prata

Para detectar as bandas de proteínas, os géis de poliacrilamida foram corados com prata de acordo com o método descrito por OAKLEY & COLS. (1980) com algumas modificações propostas por TUNON & JOHANSSON (1984). Após a eletroforese os géis foram lavados 5 minutos em 100 ml de água destilada sob agitação branda e em seguida incubados por 20 min em 100 ml de solução fixadora de metanol:ácido acético:água (50:10:40). Os géis foram então lavados 10 min com água destilada e incubados 30 min em solução fixadora de glutaraldeído (10%) e lavados 5 vezes por 10 min em água destilada. Após as lavagens os géis foram incubados por 20 min em solução de prata amoniacal preparada adicionando-se lentamente 10 ml de solução A (nitrato de prata- AgNO_3 5% p/v) na solução B (27 ml de NaOH 0,1 M + 1,75 ml de hidróxido de amônio- NH_4OH) sob agitação forte, completando-se o volume da solução com mais 50 ml de água destilada. A solução de prata amoniacal foi então removida e os géis lavados 2 vezes por 5 min com água destilada. Os géis foram por fim incubados em solução reveladora contendo ácido cítrico 0,05% e formaldeído 0,02% até o aparecimento das bandas de proteína. A revelação foi interrompida banhando-se o gel em solução inativadora de ácido acético 1% (v/v).

3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida polimerizado com gelatina

Para detectar proteinases e determinar o peso molecular simultaneamente foram feitas eletroforeses em géis de poliacrilamida polimerizados com gelatina de acordo com HEUSSEN & DOWDLE (1980). Géis de poliacrilamida a 10% foram polimerizados juntamente com 0,1% (p/v) de gelatina. As amostras aplicadas ao gel não foram fervidas nem tratadas com agente redutor; os demais procedimentos foram

de acordo com LAEMMLI (1970), conforme descrito anteriormente. Após a eletroforese o gel foi lavado em 100 ml de Triton X-100 2,5% (v/v) por 1 hora à temperatura ambiente para remover o SDS e em seguida lavado duas vezes por 15 minutos em 100 ml de tampão glicina-NaOH 0,1M, pH 9,0 e incubado neste mesmo tampão por 20 horas a 37 °C. O gel foi corado com coomassie blue R250 (Sigma) em solução de metanol:ácido acético:água destilada preparada na proporção de 45:10:45 por 1 hora e descorado em metanol:ácido acético:água (45:10:45) até o aparecimento das bandas não coradas.

3.10. Determinação da atividade amidásica

Para determinar especificamente a atividade amidásica (hidrólise de amidas na presença de água) de proteases nas frações purificadas da secreção de cercária foi utilizado o substrato sintético N_α-Benzoil-DL-Arginina p-NitroAnilida (BApNA) pelo método de ERLANGER & COLS. (1961) adaptado para micro escala por MARESGUIA (1968). Uma solução estoque do substrato BApNA (Sigma, EUA) a 1x10⁻² M foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) e mantida a -20°C. A cada ensaio a solução estoque foi diluída para 1x10⁻⁴ M em Tris-HCl 50 mM pH 8.2 e incubava-se 480 µl desta solução com 20 µl de amostra da protease a 37°C. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µl de ácido acético a 60% (v/v) e a absorbância a 405 nm foi estimada espectrofotometricamente. Os controles foram preparados adicionando-se 20 µl de amostra da protease a 480 µl da solução substrato juntamente com 50 µl de ácido acético 60%. Foram feitos também controles de hidrólise espontânea do substrato, submetidos às mesmas condições experimentais. A atividade amidásica foi expressa em mM de p-nitroanilida hidrolisada x mg⁻¹ de enzima x min⁻¹.

3.11. Determinação do pH ótimo

O pH ótimo de hidrólise do substrato sintético BApNA pela enzima purificada foi determinado. As reações enzimáticas foram realizadas como descritas anteriormente. Os tampões utilizados foram: acetato de sódio pH (3; 4; 5 e 6), glicina-NaOH pH (7; 8; 9; 10 e 11) e Tris-HCl pH (6; 7; 8; 9; 10; 11 e 12). Todos os tampões foram utilizados na concentração de 100 mM.

3.12. Determinação da dependência de cálcio

Para determinação da influência do íon cálcio na atividade da enzima purificada, seguiu-se o procedimento descrito por DRESDEN & EDLIN (1975). O efeito do cloreto de cálcio CaCl_2 foi medido adicionando-se quantidades apropriadas deste sal diretamente nas misturas de reação para determinação de atividade enzimática sobre BApNA, preparadas como já descrito. Controles contendo quantidades apropriadas de cálcio, mas sem a enzima, foram feitos para cada concentração do sal. Os resultados estão representados como percentagem de atividade relativa àquela obtida na ausência de CaCl_2 .

3.13. Determinação da classe da enzima purificada

Para determinação da classe da enzima purificada foram feitos ensaios com inibidores de diferentes especificidades (Sigma, EUA) de acordo com BEYNON & BOND (1989). Cada inibidor, a uma concentração apropriada, foi pré-incubado com a enzima por 60 min. à temperatura ambiente. O substrato BApNA foi adicionado e a atividade enzimática determinada como descrito anteriormente. O inibidor Fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) foi preparado numa solução estoque de 0,1 M em isopropanol; os inibidores peptídicos Tosilfenilalanilclorometilcetona (TPCK) e Tosililclorometilcetona (TLCK) foram preparados em soluções estoque de 0,1 M em

metanol. Os outros inibidores foram preparados em tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, pH 8.2) e as concentrações finais de incubação foram: PMSF, TLCK, TPCK, Iodoacetamida 1×10^{-4} M; cisteína, Etilenodiaminotetraacetato (EDTA) e Ditioneitol (DTT) 1×10^{-3} M e Trasylol $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. A inibição foi calculada relativa aos controles da enzima incubada com o solvente apropriado de cada um dos inibidores.

3.14. Reação imunoenzimática pelo método de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

O procedimento adotado foi o descrito por ENGVALL & PERLMANN (1972). Placas de polietileno (Hemobag, Brasil) para ELISA foram sensibilizadas com os antígenos diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,6. As placas foram incubadas a 4°C por 18 hs, com $100 \mu\text{l}$ das preparações antigênicas em cada poço, nas concentrações de $10 \mu\text{g/ml}$ de secreção de cercária, $5 \mu\text{g/ml}$ de frações purificadas e $1 \mu\text{g/ml}$ da enzima pura. As placas foram lavadas 2 vezes com tampão de lavagem (PBS 0,15 M pH 7,2 contendo Tween 20 a 0,05%) e 6 vezes após cada uma das etapas descritas a seguir. Os poços foram bloqueados com $100 \mu\text{l}$ de caseína a 2% em tampão de lavagem durante 1 h a 37°C . Alíquotas de $100 \mu\text{l}$ de soros de camundongos portadores de infecção crônica por *S. mansoni*, diluídos a 1:100 em tampão de incubação (tampão de lavagem + caseína a 0,25%), foram adicionadas em duplicata a cada poço e incubadas por 1 h a 37°C . O segundo anticorpo, imunoglobulina de cabra anti-IgG de camundongo conjugada com a enzima peroxidase (Sigma), diluído a 1:1000 em tampão de lavagem, foi adicionado à placa e incubado por 1 h a 37°C . A atividade enzimática foi revelada utilizando-se ortofenilendiamino OPD (Sigma) como substrato para peroxidase na presença de água oxigenada 30%. Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente no

escuro a reação foi interrompida pela adição de 30 µl de ácido sulfúrico 4,0 N e as leituras feitas a 492 nm em um leitor de ELISA (EIA Reader 2550 - Bio-Rad).

3.15. Reconhecimento imunológico de epitopos de carboidrato por reação imunoenzimática (ELISA) após oxidação com periodato

A oxidação de carboidratos conjugada com o método de ELISA (WOODWARD & COLS., 1985) foi feita como descrito a seguir. Após a sensibilização com os antígenos, conforme descrito acima, as placas de ELISA foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem PBS-Tween 20 0,05% e mais 2 vezes com tampão acetato de sódio (CH₃COONa) 50 mM pH 4,5. Os antígenos fixados às placas foram tratados com ácido periódico (H₅IO₆) 20 mM em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, à temperatura ambiente, por 1 h no escuro. Seguiam-se 5 lavagens com acetato de sódio 50 mM pH 4,5 e mais duas com PBS, quando então as placas foram incubadas com borohidreto de sódio (NaBH₄) 50 mM em PBS por 30 min a 23°C. As placas foram novamente lavadas 5 vezes com tampão de lavagem e continuava-se com o protocolo de ELISA conforme descrito acima, partindo-se da etapa de bloqueio com caseína.

4. RESULTADOS

4.1. FRACIONAMENTO DA SECREÇÃO DE CERCÁRIA

Como primeira etapa de purificação da protease de 60 kDa, a secreção de cercárias, obtida como descrito na seção anterior, foi fracionada por filtração molecular em coluna de Superdex 75 (**Fig. 3**). Desta etapa de purificação obtivemos um primeiro pico que continha a maior parte das proteínas. Seguiram-se a este pico outras frações com menores quantidades de proteína. Estas frações apresentavam proteínas de baixo peso molecular do que as do primeiro pico. A atividade enzimática, medida pela hidrólise de BApNA, foi detectada principalmente no primeiro pico mas também em várias partes do cromatograma, como mostrado na **Fig. 3**. Através da eletroforese em gel de poliacrilamida, verificou-se que as proteínas de 60 kDa presentes na secreção de cercária concentravam-se entre 43 a 46 ml do volume de eluição da coluna de Superdex 75 (**Fig. 3**).

As frações correspondentes ao final do primeiro pico eluído de Superdex 75 foram reunidas e submetidas a uma cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose ligada com IgG de camundongo infectado cronicamente com *S. mansoni* (**Fig. 4**). A fração antigênica denominada de IF 2, eluída com Tris pH 11 da coluna, continha a proteína de 60 kDa, como verificado por SDS-PAGE. Outros tampões tais como glicina-HCl pH 2,8 e glicina-NaOH pH 9,2 foram utilizados para remover os antígenos ligados às IgGs, porém sem sucesso (dados não mostrados).

O pico IF 2 foi fracionado em uma coluna de troca iônica Mono Q que foi introduzida como etapa final do processo de purificação. O primeiro pico, eluído com 0,05 M de NaCl, continha a proteína de 60 kDa purificada, coletada com um volume de eluição de 6 ml (**Fig. 5**).

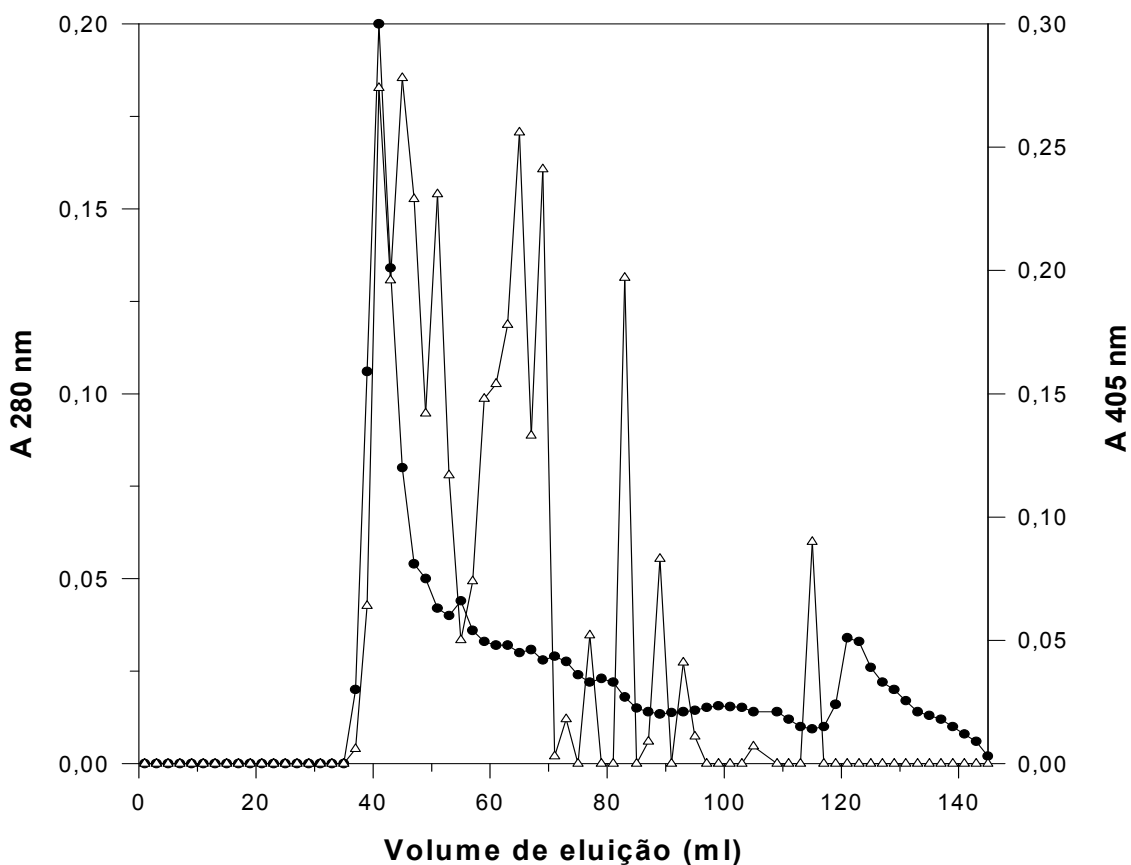


Figura 3. Cromatografia da secreção de cercárias em Superdex 75. Secreção de cercárias em um volume de 2 ml contendo 9,0 mg de proteína foi aplicada em uma coluna (1,6 x 60 cm) de Superdex 75. O material foi eluído com tampão bicarbonato de amônio 0,15 M, pH 8,2 contendo 20 mM de NaCl com um fluxo de 1 ml/min. Foram coletadas frações de 2,0 ml. A atividade amidásica de todas as frações foi medida através da hidrólise de BApNA. Proteína, 280 nm (●); hidrólise de BApNA, 405 nm (Δ).

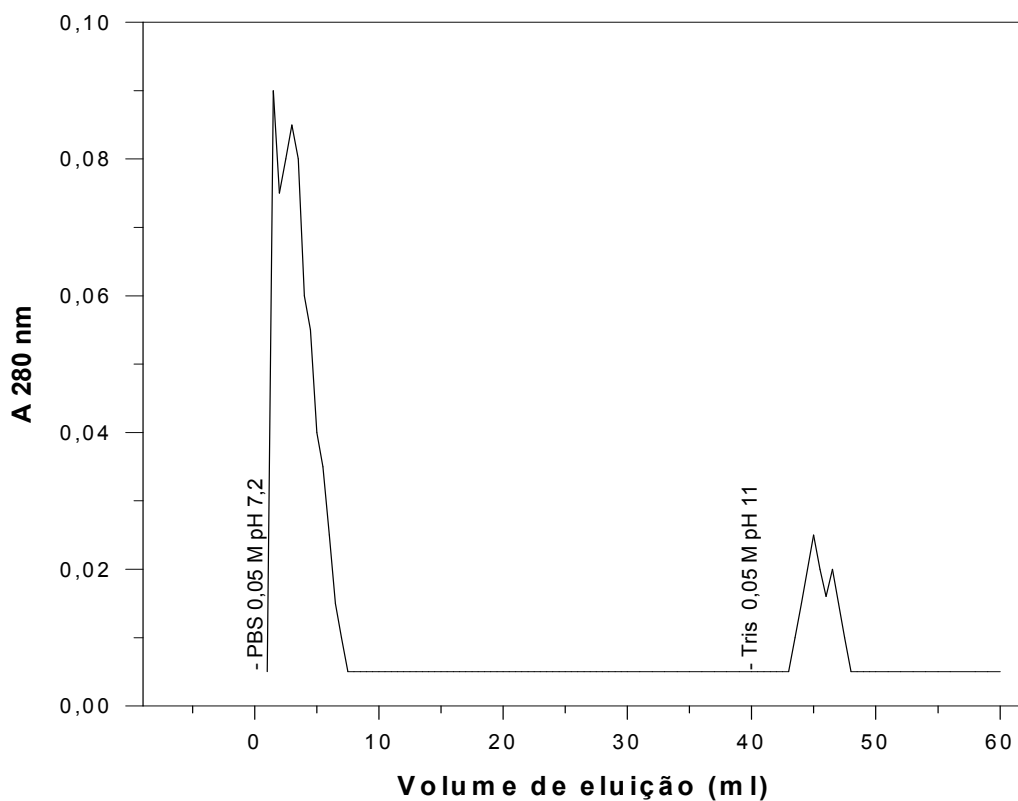


Figura 4. Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-IgG. A fração eluída em Superdex 75 que continha a proteína de 60 KDa foi reunida e aplicada em uma coluna de Sepharose-IgG equilibrada com PBS 0,05 M pH 7,2. O material foi deixado em contato com a coluna por 16 hs a 4 °C. A coluna foi lavada com PBS por 2 hs com um fluxo de 20 ml/h. A fração IF 2, constituída dos antígenos que reagiram com as IgGs da coluna, foi eluída com Tris 50 mM pH 11. Foram coletadas 10 frações de 2 ml imediatamente neutralizadas com glicina-HCl 0,1 M pH 2,8.

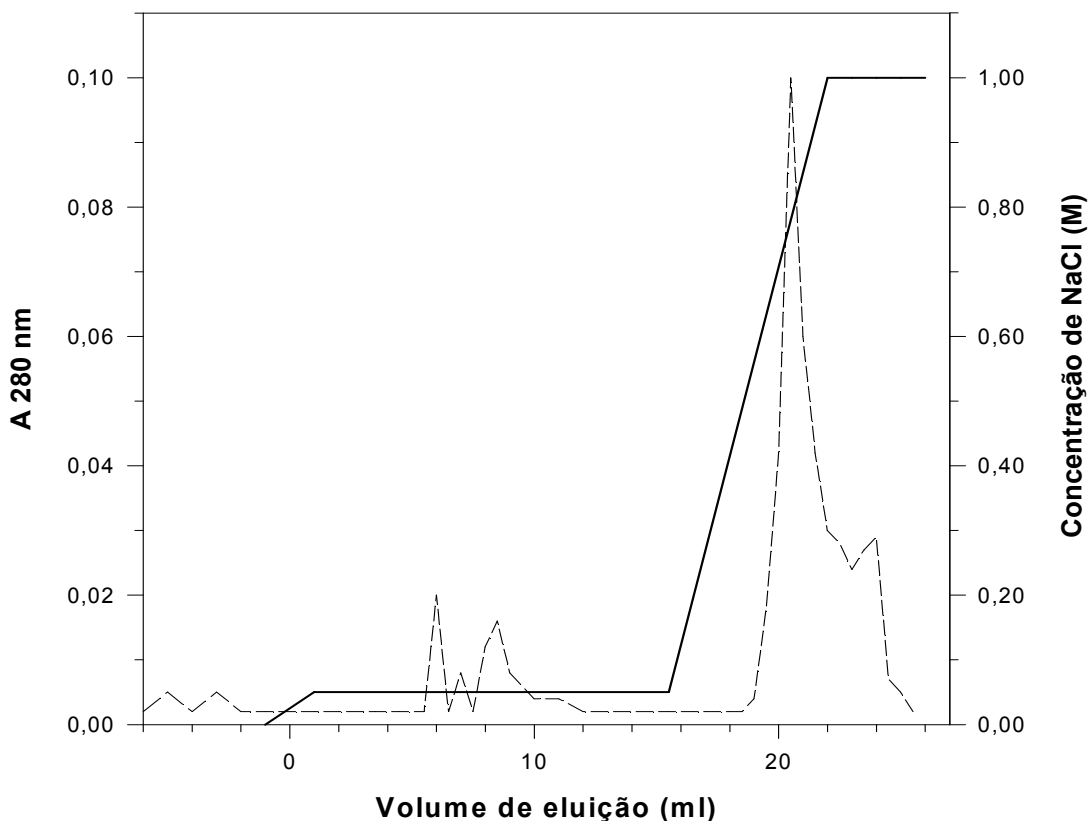


Figura 5. Cromatografia de troca iônica em coluna de Mono Q. A fração IF2, que reagiu com as IgGs da coluna de afinidade, foi reunida e dialisada em Tris-acetato 25 mM pH 8,5. Em seguida foi aplicada em uma coluna de troca iônica Mono Q equilibrada com Tris-acetato 25 mM pH 8,5. As proteínas retidas na coluna foram eluídas com um gradiente de 0 a 1 M de NaCl feito em 15 minutos com um fluxo de 0,5 ml/minuto. O gradiente foi interrompido em 0,05 M para eluição da protease de 60 KDa. Foram coletadas frações de 1 ml. Proteína, 280 nm (---); gradiente de NaCl (—).

A sequência de diferentes métodos cromatográficos, envolvendo gel filtração, imunoafinidade e troca aniônica, mostrou ser uma estratégia eficiente para isolar uma enzima de 60 kDa imunogênica a partir de uma mistura complexa de proteínas que é a secreção de cercárias de *S. mansoni*. Tendo como base o aumento progressivo na atividade específica (**Tab. I**), a enzima de 60 kDa apresentou um fator de purificação de 70 vezes em relação à secreção de cercárias.

A **Figura 6** mostra o perfil eletroforético das diferentes etapas de purificação da enzima. Seu peso molecular aparente quando não tratada com agente redutor foi estimado por SDS-PAGE ser em torno de 60 KDa. Quando reduzida com mercaptoetanol a proteína manteve-se como uma única banda (algumas vezes aparecendo como um duplete) embora com um peso molecular de 66 KDa, um pouco maior do que aquele observado em condições não redutoras.

4.2. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E IMUNOLÓGICA DA PROTEASE DE 60 KDA

A atividade enzimática da protease de 60 KDa purificada foi determinada e comparada com a atividade enzimática da secreção total. Para isso se utilizou o substrato sintético BApNA e determinou-se a atividade amidásica (**Fig. 7**). A enzima pura apresentou uma atividade estável ao longo do tempo assim como a secreção total de cercárias. A proteína purificada apresentou atividade proteolítica conforme demonstrado em gel de poliacrilamida contendo gelatina como substrato (**Fig. 8**).

Com a finalidade de verificar a presença de carboidratos na enzima de 60 kDa foi utilizado o método de WOODWARD & COLS. (1985). A oxidação de carboidratos pelo periodato aboliu a ligação de anticorpos do soro de camundongo cronicamente infectado com *S. mansoni* (**Fig. 9**). Este resultado indica que a protease de 60 KDa é

Tabela I - Purificação da protease de 60 KDa da secreção de cercárias

Etapas de purificação	Proteína total (mg)	Recuperação (%)	Atividade específica*	Fator de purificação
Secreção de cercárias	18,0	100	$1,71 \times 10^{-3}$	-
Superdex 75	4,5	25	$2,1 \times 10^{-2}$	12,3
Sepharose-IgG	0,4	2,2	$5,09 \times 10^{-2}$	30
Mono Q	0,02	0,11	$1,2 \times 10^{-1}$	70

*Atividade amidásica específica = mM do substrato BApNA x mg de enzima⁻¹ x min⁻¹. BApNA foi utilizado numa concentração de 1×10^{-4} M. A incubação foi feita por 8 h a 37°C.

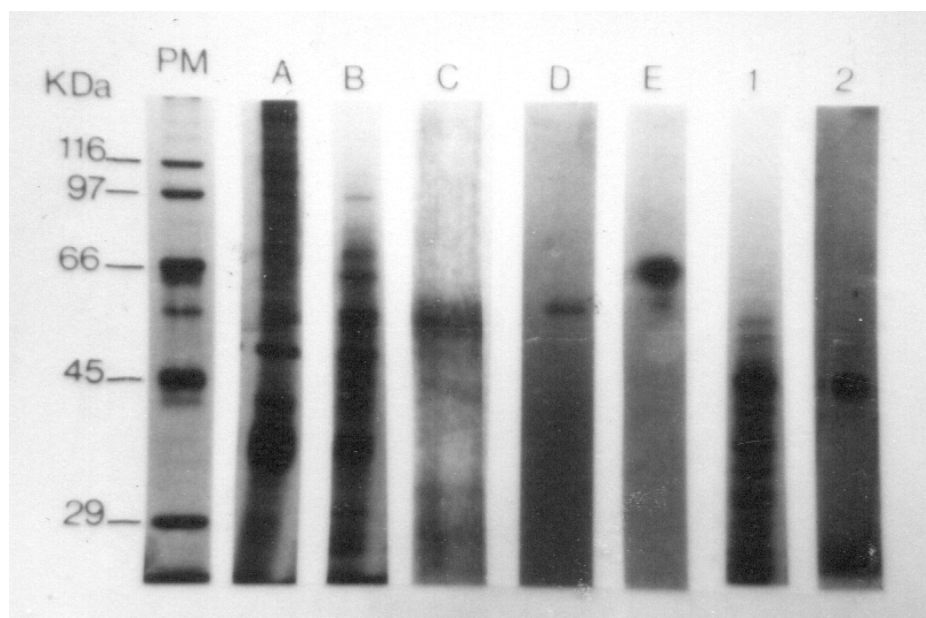


Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida das etapas de purificação da protease de 60 KDa da secreção de cercária de *S. mansoni*. Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) corada com nitrato de prata das etapas de purificação da proteína de 60 KDa. **A)** secreção de cercárias, 12 μ g; **B)** Fração 43 a 46 ml (10 μ g) de Superdex 75; **C)** fração antigênica IF2 (5 μ g) da coluna de Sepharose-IgG; **D)** fração purificada (1 μ g) eluída da coluna Mono Q e **E)** fração purificada (1 μ g) eluída da coluna Mono Q, reduzida com mercaptoetanol. **1)** fração 47 a 50 ml da coluna Superdex 75, 5 μ g; **2)** Protease de 47 KDa (1 μ g) eluída da coluna Mono Q com 0,1 M de NaCl.

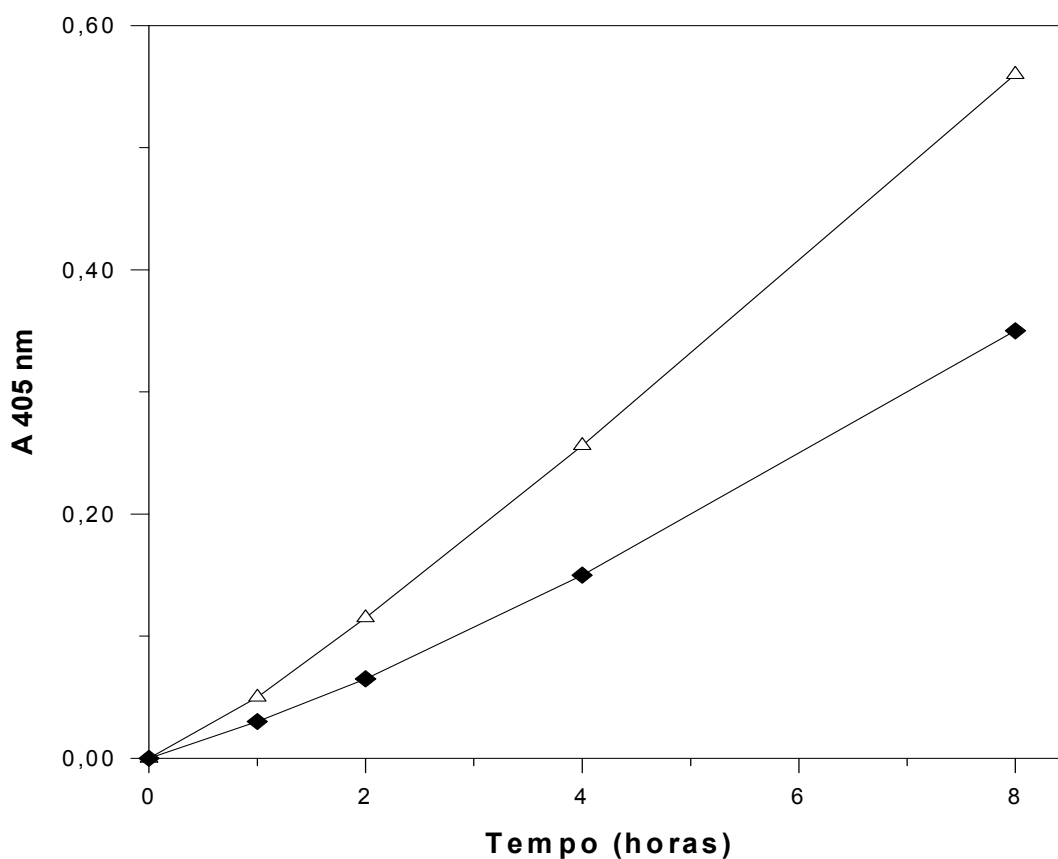


Figura 7. Atividade amidásica da secreção de cercária de *S. mansoni* e da protease de 60 kDa. Secreção de cercária, 150 µg (♦) e protease purificada, 1 µg (Δ) foram incubadas a 37 °C em tempos diferentes com o substrato N α -Benzoil-DL-Arginina p-nitroanilida (BApNA). Em seguida mediu-se a hidrólise do substrato a 405 nm.

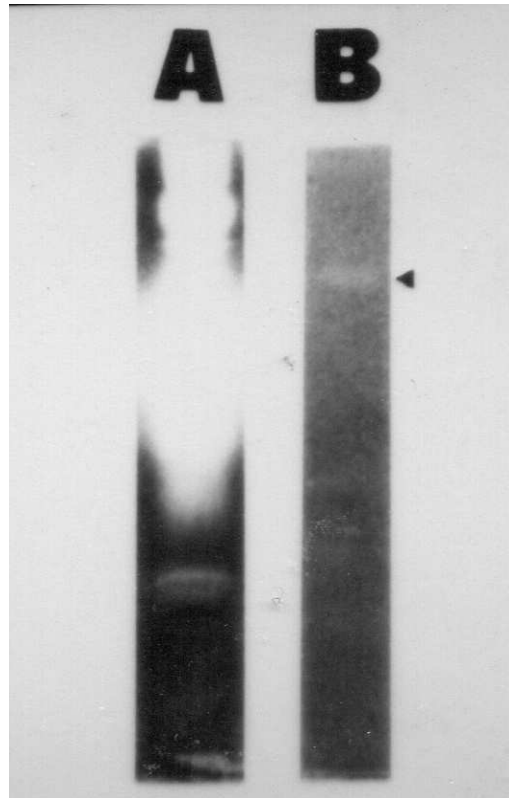


Figura 8. Atividade proteolítica da enzima de 60 kDa após eletroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo gelatina como substrato. As amostras não foram fervidas nem tratadas com agentes redutores. Após a eletroforese o SDS foi retirado lavando-se o gel com Triton X-100. Após 20 horas de incubação em glicina 0,1 M pH 9,0 a 37 °C, o gel foi corado com coomassie blue. As bandas de proteólise são claras contra o fundo escuro (gelatina não degradada corada com coomassie). **A)** secreção de cercárias, 15 µg; **B)** protease de 60 kDa purificada, 2 µg.

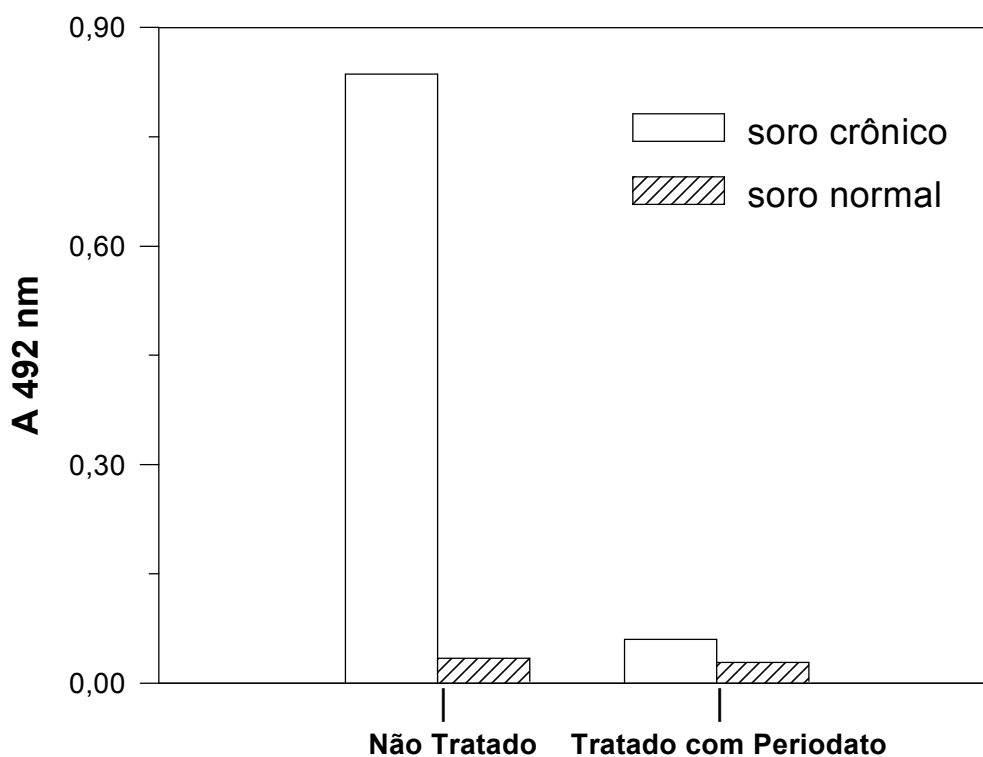


Figura 9. Demonstração da natureza glicoprotéica da protease de 60 kDa por oxidação dos epitopos de carboidrato. A protease de 60 kDa foi adsorvida na placa de ELISA na concentração de 0,1 µg/well e tratada com ácido periódico e boroidreto de sódio para oxidação dos epitopos de carboidrato da molécula. Soro de camundongos cronicamente infectados com *S. mansoni* foi utilizado numa diluição de 1/200. Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase foi utilizado como segundo anticorpo na diluição de 1/1000.

uma glicoproteína cuja porção de carboidrato é antigênica. A lectina Concanavalina A não se ligou à enzima imobilizada em membrana de nitrocelulose (não mostrado).

A enzima purificada, assim como as demais enzimas da secreção de cercária, tem atividade ótima em pH alcalino. O pH ótimo para a protease de 60 kDa foi de 8,0 utilizando BAPNA como substrato. Para efeito de comparação, a medida do pH ótimo foi feita juntamente com outros tampões (**Fig. 10**).

A temperatura ótima de atuação da enzima purificada foi de 40 °C (**Fig. 11**). A enzima mostrou não ser dependente de cálcio conforme é possível observar-se na **Figura 12**. Mesmo em concentrações reduzidas de CaCl₂ (menores ou iguais a 5 mM) o que se observou foi uma redução da atividade da enzima em relação ao controle feito sem a presença de cálcio.

Inibidores específicos foram utilizados para determinar a classe de enzima proteolítica da qual faz parte a enzima de 60 kDa (**Tab. II**). Os inibidores foram pré-incubados com a enzima de 60 kDa antes que fosse dado prosseguimento à reação enzimática. O EDTA, agente quelante de metais, não teve efeito significativo sobre a atividade da protease. Inibidores de tiol proteases, cisteína e iodoacetamida também apresentaram algum efeito inibitório sobre a enzima. Entretanto PMSF, Trasylol, TPCK e TLCK, que são inibidores de enzimas proteolíticas do tipo serino proteases, inibiram a atividade enzimática em diferentes graus. O TLCK foi o que apresentou maior efeito inibitório sobre a enzima. O DTT, que é um agente redutor e ativa tiol proteases em pequenas concentrações, não teve efeito estimulador sobre a atividade da enzima. Os resultados mostram que a enzima de 60 kDa pode ser classificada como uma serino proteinase, conforme o perfil de inibição obtido após a sua incubação na presença de inibidores específicos para diferentes classes de proteases (**Tab. II**).

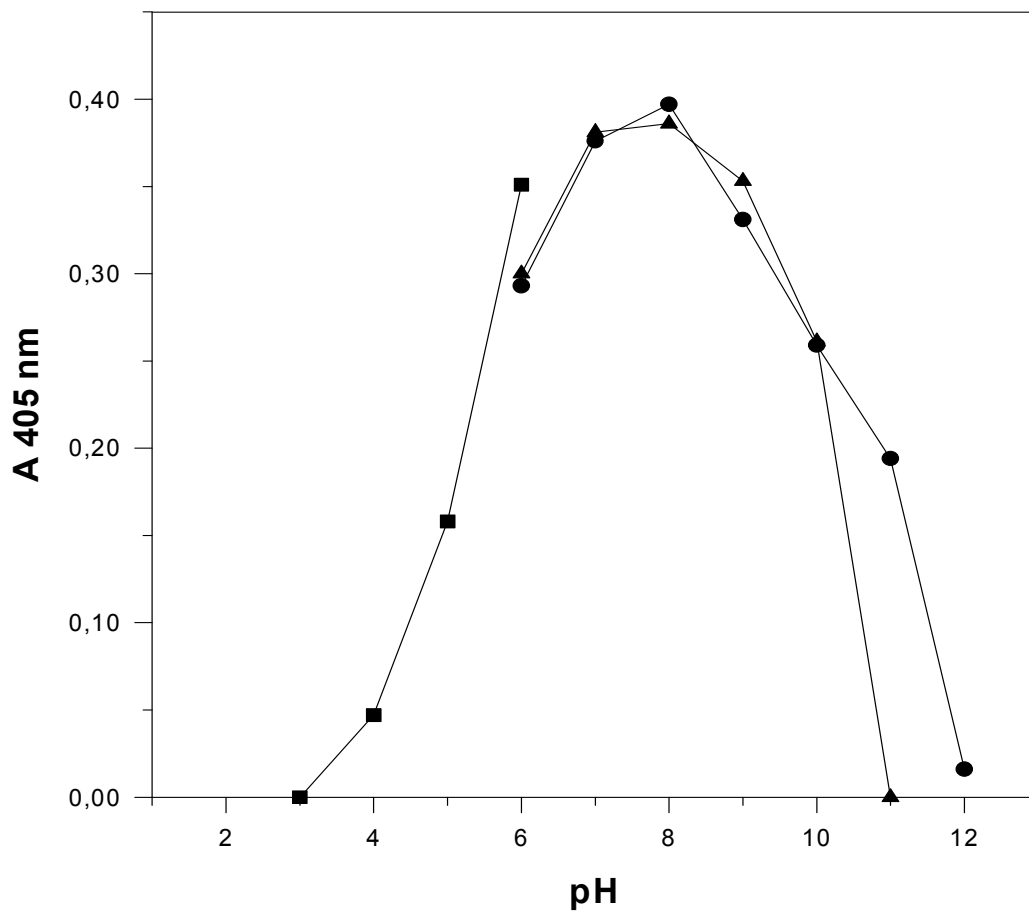


Figura 10. Determinação do pH ótimo de atividade da enzima de 60 kDa da secreção de cercárias. Protease purificada (1 μ g) foi incubada em diferentes tampões de vários pHs contendo 1×10^{-4} M de BA ρ NA a 37°C por 20 horas e em seguida mediu-se a hidrólise do substrato. Tampão acetato 0,1 M (■); tampão Tris-HCl 0,1 M (●); tampão glicina-NaOH 0,1 M (Δ).

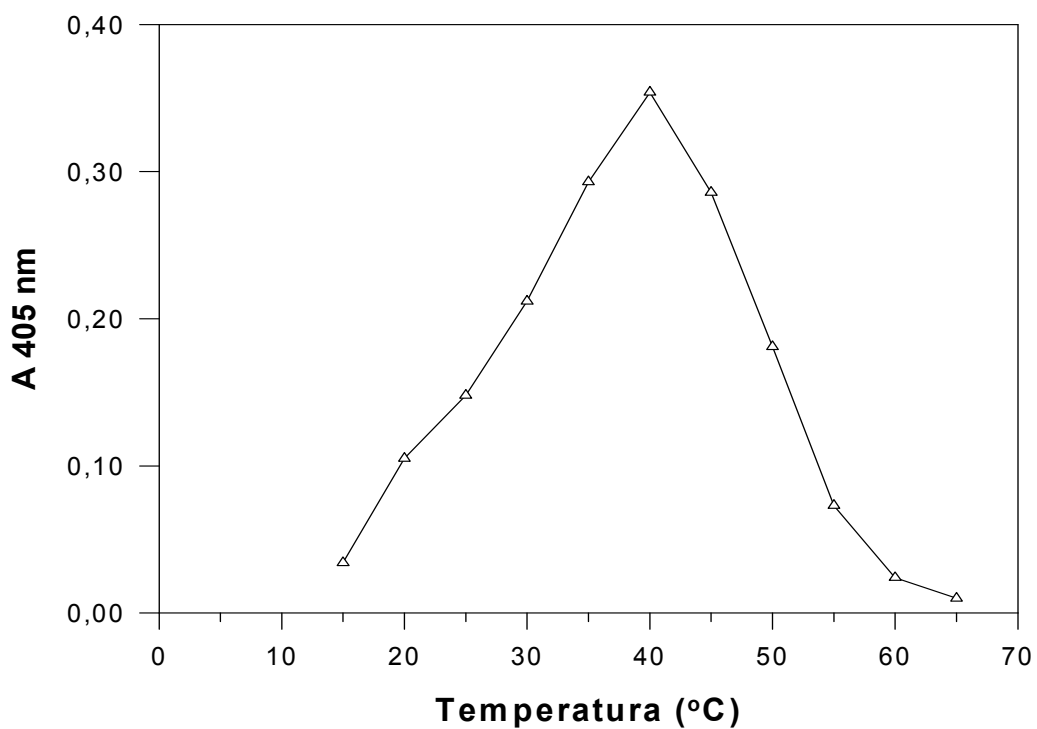


Figura 11. Temperatura ótima de atividade da enzima de 60 kDa. A protease de 60 kDa foi incubada em tampão glicina 0,1 M pH 8,0 com o substrato sintético BApNA na concentração de 1×10^{-4} M em várias temperaturas por 8 horas. Em seguida mediu-se a hidrólise do substrato espectrofotometricamente.

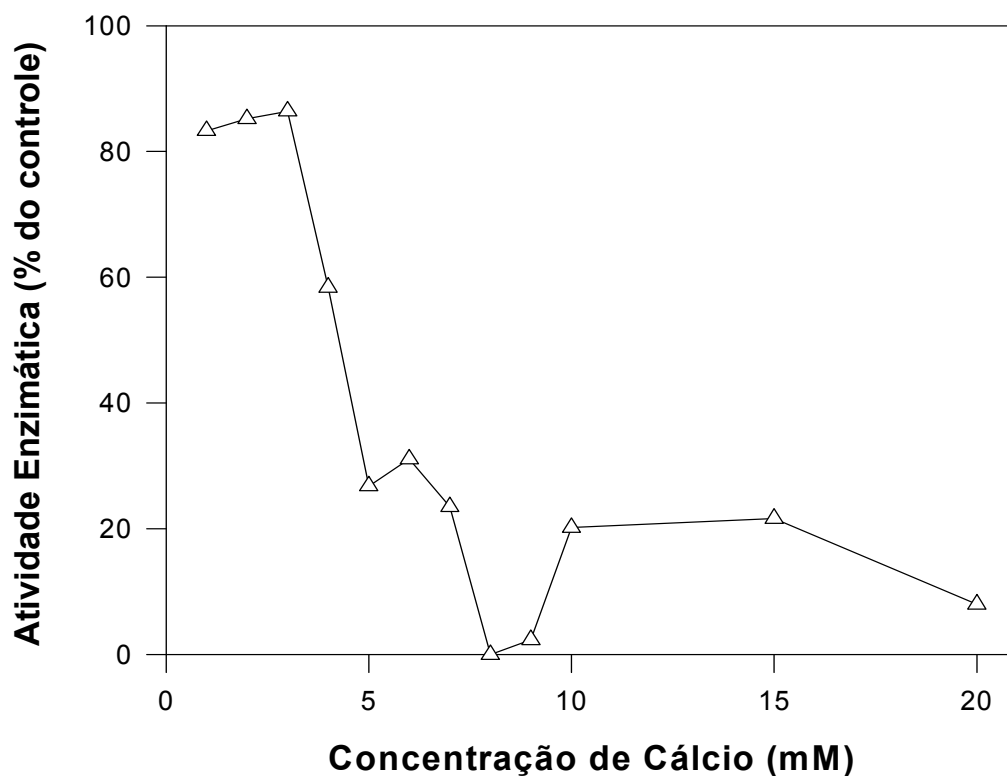


Figura 12. Influência do íon cálcio na atividade da protease de 60 kDa. O efeito do íon cálcio sobre a atividade da protease de 60 kDa de cercária foi avaliado incubando a enzima em presença de quantidades molares crescentes de cloreto de cálcio. A incubação foi feita com BApNA (1×10^{-4} M) em glicina 0,1 M, pH 8. Para cada concentração de cálcio nos ensaios com a enzima foram feitos controles paralelos contendo as mesmas quantidades de CaCl_2 mas sem a enzima. O percentual de atividade é relativo à atividade da enzima na ausência de CaCl_2 .

Tabela II - Efeito de inibidores específicos sobre a atividade da protease de 60 kDa

Inibidor	Concentração	Inibição (%)
TLCK	0,1 mM	80,35
TPCK	0,1 mM	76,25
PMSF	0,1 mM	57,45
DTT	1,0 mM	54,0
Iodoacetamida	0,1 mM	51,2
Trasylool	10 $\mu\text{g ml}^{-1}$	44,00
Cisteína	1,0 mM	25,4
EDTA	1,0 mM	15,23

A enzima de 60 KDa foi pré-incubada com os inibidores por 1 hora à temperatura ambiente. O substrato adicionado foi BApNA em Tris 50 mM pH 8,2 e a incubação foi feita por 20 horas a 37 °C. Em seguida mediu-se a hidrólise do substrato a 405 nm.

5. DISCUSSÃO

Para fazermos a caracterização da enzima de 60 kDa presente na fração imunogênica IF2, obtida por CHÁVEZ-OLÓRTEGUI (1986) a partir da secreção de cercárias de *Schistosoma mansoni*, foi preciso que desenvolvêssemos um novo método de purificação. Neste novo método a etapa inicial de fracionamento da secreção de cercárias por filtração molecular foi feita em uma coluna de Superdex 75 (**Fig. 3**), que possui uma capacidade de resolução maior e permite utilizar um fluxo 10 vezes mais rápido em comparação com a cromatografia de filtração molecular em Sephadex G-150 SF feita por CHÁVEZ-OLÓRTEGUI (1986). As frações da primeira etapa de purificação que continham a protease de 60 KDa foram reunidas e submetidas a uma cromatografia de afinidade em Sepharose-IgG (**Fig. 4**) de onde obtivemos a fração antigênica IF2, conforme descrito por CHÁVEZ-OLÓRTEGUI (1986). A partir daí introduzimos uma terceira etapa que consiste de uma cromatografia de troca aniônica em uma coluna de Mono Q (**Fig. 5**) para fracionar o material eluído da fração imunogênica IF2. Ao final desta etapa foi possível isolar a protease de 60 KDa que se apresentou como uma única banda em gel de policacrilamida corado com prata (**Fig. 6**). Ao final das três etapas de cromatografia para sua purificação, a enzima de 60 kDa foi obtida com grau de pureza superior àquele obtido anteriormente (CHAVEZ-OLORTEGUI, 1986).

Utilizando colunas de Superdex 75 e Mono Q foi possível isolar também a protease de 47 kDa (**Fig. 6** canaletas 1 e 2). Isto é importante em razão da dificuldade de se obter a secreção de cercárias pois a técnica demanda uma grande quantidade de larvas, o que exige grande esforço dos moluscários disponíveis na UFMG.

Embora a proteína apresentasse em SDS-PAGE um peso molecular aparente de 60 KDa, quando reduzida com mercaptoetanol seu peso molecular passava a ser de 66 KDa (**Fig. 6**), conforme verificado também por CHAVEZ-OLORTEGUI (1986). Esta alteração no peso molecular ocorre possivelmente devido a uma redução das

pontes de dissulfeto internas da proteína, fazendo com que a mesma adquira uma conformação ainda mais desenovelada, retardando sua migração através da malha do gel. Em alguns géis, uma redução incompleta pelo mercaptoetanol determina o aparecimento de duas bandas: uma de 60 KDa e outra de 66 KDa (dados não mostrados).

A atividade enzimática da proteína de 60 KDa foi demonstrada por meio da sua atividade amidásica específica utilizando-se o substrato sintético BApNA. Observa-se pela **Figura 7** que a atividade enzimática aumenta em função do tempo de incubação da enzima purificada evidenciando a sua estabilidade nas condições testadas. A atividade proteolítica sobre gelatina pode ser constatada em géis de poliacrilamida contendo o substrato que é uma mistura derivada do colágeno da pele (**Fig. 8**). A enzima de 60 KDa foi purificada 70 vezes de acordo com o incremento da atividade específica, embora a percentagem de recuperação tenha sido de apenas 0,1% (**Tabela I**).

Estudos de ligação de lectinas revelaram que existem diferenças na composição de oligossacarídeos das glicoproteínas do glicocálice de cercária. Algumas destas glicoproteínas foram capazes de se ligar a lectinas específicas para manose e fucose, enquanto que outras se ligaram apenas a uma destas lectinas (DALTON & COLS., 1987). Algumas proteases da secreção de cercária são glicoproteínas que podem diferir entre si pelo padrão de glicosilação. MARIKOVSKY & COLS. (1988a) verificaram que uma protease de 28 KDa por eles purificada liga-se a Con A (específica para manose) e outra de 60 KDa liga-se a Con A e aglutinina de gérmen de trigo (específica para *N*-acetilglicosamina). A protease de 47 KDa possui natureza glicoprotéica, identificada pela sua capacidade de se ligar a Con A (CHAVEZ-OLORTEGUI & COLS., 1992).

Conforme demonstrado na **Figura 9**, a protease purificada parece ser também uma glicoproteína. BOBBITT (1956) demonstrou que a oxidação branda com periodato em pH ácido, quebra grupos hidroxil vicinais de carboidratos sem contudo alterar a estrutura das cadeias polipeptídicas de glicoproteínas. As estruturas de carboidrato terminais não reduzidas são geralmente susceptíveis a quebra por periodato, alterando estes determinantes o suficiente para impedir a ligação de anticorpos. A oxidação de epitopos de carboidrato com periodato de sódio em testes de ELISA, de acordo com o método descrito originalmente por WOODWARD & COLS. (1985), aboliu o reconhecimento da protease purificada pelos soros de camundongos cronicamente infectados (**Fig. 9**). Entretanto, em experimentos feitos para identificar a natureza glicoprotéica por ligação de lectinas em Westernbot, não verificamos a ligação de Con A com a enzima (dado não apresentado) sugerindo que a protease não contém resíduos de manose. É possível, portanto, que a protease de 60 KDa apresente um padrão de glicosilação diferente das outras proteases cercarianas estudadas, mas que porém é imunogenicamente importante desde que o tratamento com periodato praticamente aboliu a ligação com IgGs do soro de camundongos cronicamente infectados com *S. mansoni*.

A atividade proteolítica de extratos de cercária e enzimas secretadas é sensível ao tampão utilizado bem como seu pH e força iônica. Glicina e Tris são os tampões nos quais esta atividade proteolítica tem se mostrado marcadamente maior (DRESDEN & ASCH, 1972; CAMPBELL & COLS., 1976). O pH ótimo determinado por vários autores, embora varie sob diferentes condições experimentais, sempre tem sido alcalino utilizando extratos de cercária, secreção ou mesmo proteases purificadas da secreção de cercária. Estas observações estão de acordo com LEWERT & COLS. (1966) e CAMPBELL & COLS. (1976) que verificaram *in situ* que o conteúdo das glândulas pré-acetabulares é alcalino.

Para extratos de cercária foi determinado um pH ótimo de 7,5 com o substrato Azocol em tampão fosfato (LEWERT & LEE, 1956); 8,8 com glicina (DRESDEN & ASCH, 1972); 8,1 a 8,3 com elastina em borato (GAZZINELLI & PELLEGRINO, 1964) e 8,3 com hemoglobina em tampão fosfato (STIREWALT & FREGÉAU, 1966). Para enzimas existentes na secreção o pH ótimo com Azocol em tampão fosfato foi 8,0 e em glicina, 8,5 a 8,8 (CAMPBELL & COLS., 1976). O pH ótimo encontrado para a enzima de 30 KDa foi de 9 em glicina e 10 em Tris com Azocol (McKERROW & COLS., 1985a); 10,0 em Tris com APaPNA para a protease de 47 KDa (CHAVEZ-OLORTEGUI & COLS., 1992) e pH 9,0 em Tris ou glicina com caseína para a protease de 28 KDa purificada de sobrenadantes utilizados na transformação de esquistossômulos (MARIKOVSKY & COLS., 1988a).

Conforme descrito nos resultados, o pH ótimo encontrado para a enzima de 60 KDa utilizando o substrato sintético BApNa foi 8,0 em Tris e em tampão glicina (**Fig. 10**). Este resultado está em concordância com o que tem sido verificado por outros autores para enzimas de cercária.

As temperaturas de incubação das soluções contendo enzimas de cercária-substrato têm sempre variado de 35 a 38 °C (LEWERT & LEE, 1954, 1956; GAZZINELLI & PELLEGRINO, 1964; STIREWALT & FREGÉAU, 1966; GAZZINELLI & COLS., 1966, 1972; AUSTIN, STIREWALT & DANZIGER, 1972) com uma exceção. STIREWALT (1973) observou lise de gelatina a 21 °C pelos conteúdos das glândulas pré-acetabulares, mas a reação foi consideravelmente mais lenta que a 37 °C. Em contrapartida CAMPBELL & COLS. (1976) verificaram uma temperatura ótima de 50 °C para enzimas da secreção. A protease de 60 KDa apresentou uma temperatura ótima de 40 °C utilizando BApNA como substrato, embora ainda conservasse metade desta atividade quando incubada a 50 °C (**Fig. 11**).

Os resultados dos experimentos com inibidores de diferentes classes de proteases indicaram que a enzima é uma serino protease (**Tabela II**) pois foi significativamente inibida por TLCK e TPCK. Embora iodoacetamida também tenha apresentado um efeito inibitório, este inibidor não é específico para resíduos de cisteína do sítio ativo das cisteino proteases e pode inibir muitas outras enzimas (BEYNON & BOND, 1989). O DTT, que é um ativador de cisteino proteases, quando utilizado em baixas concentrações, não ativou a enzima. Proteinases de extratos de cercária (GAZZINELLI & COLS., 1966; LANSPERGER & COLS. 1982) ou purificadas de secreção de cercárias (McKERROW & COLS., 1985a; CHAVEZ-OLORTEGUI & COLS., 1992) também são serino proteases. A atividade da protease de 60 KDa parece ser independente de íons metálicos (zinco, p. ex.) pois EDTA, conhecido agente quelante de íons metálicos, quando utilizado em uma concentração de 1 mM não inibiu significativamente sua atividade (**Tabela II**).

As glândulas pré-acetabulares acumulam uma grande quantidade de cálcio no seu interior (STIREWALT & KRUIDENIER, 1961; LEWERT & COLS., 1966 e DRESDEN & EDLIN, 1975). Os autores LEWERT & LEE (1956) e DRESDEN & EDLIN (1974, 1975) verificaram que as enzimas proteolíticas da secreção são estimuladas em baixas concentrações e inibidas em altas concentrações deste cátion. Postula-se que o cálcio existente nas glândulas tenha a função de controlar a atividade destas proteases agindo como inibidor da atividade proteolítica *in situ* (DRESDEN & EDLIN, 1975). McKERROW & COLS. (1985a) verificaram que a protease de 30 KDa é dependente de cálcio numa concentração ótima determinada em 2 mM. Entretanto, a protease de 28 KDa não é dependente de cálcio conforme mostrado por MARIKOVSKY & COLS. (1988a). A enzima de 60 kDa purificada neste trabalho foi parcialmente inibida em concentrações de Ca^{2+} menores ou iguais a 4 mM

e sua atividade foi significativamente reduzida quando incubada em concentrações iguais ou maiores que 5 mM de Ca^{2+} (**Fig.12**).

Nossos resultados, sobre a influência do cálcio na atividade da enzima de 60 kDa, corroboram com a tese proposta na literatura de que o cálcio encontrado em grandes quantidades nas glândulas pré-acetabulares da cercária pode ter a função de manter as proteinases pré-acetabulares em um estado inativo até serem liberadas junto com a secreção (DRESDEN & EDLIN, 1975).

Novas abordagens serão utilizadas na tentativa de se obter maiores quantidades da protease de 60 kDa. Isto é importante para que seja possível a realização de experimentos de proteção, imunodiagnóstico, bem como de determinação da sua capacidade liberadora de histamina e, conseqüentemente, do seu papel no processo de infecção pela cercária de *Schistosoma mansoni*.

6. CONCLUSÕES

- 1) O fracionamento da secreção de cercárias de *Schistosoma mansoni* por técnicas cromatográficas de gel filtração, imunoafinidade e troca aniônica permitiu a purificação de uma proteinase de 60 kDa, que é visualizada como uma banda única em géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata;
- 2) A proteinase de 60 kDa apresenta atividade proteolítica sobre componentes de colágeno da pele. O seu pH ótimo de atividade é 8,0 e a sua temperatura ótima é de 40 °C;
- 3) A atividade da proteinase de 60 kDa é inibida na presença de Ca^{2+} ;
- 4) Os resultados dos experimentos feitos com inibidores específicos para vários tipos de enzimas proteolíticas indicam que a enzima de 60 kDa purificada é uma serino proteinase inibida principalmente por TLCK e TPCK;
- 5) A protease de 60 kDa é de natureza glicoprotéica. Sua porção de carboidratos não contém resíduos de manose;
- 6) A porção de carboidratos da proteinase de 60 kDa é o seu componente imunogênico principal apresentando em ELISA forte reação com soros de camundongos cronicamente infectados com *S. mansoni*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSTIN, F.G., STIREWALT, M.A. & DANZIGER, R.E. *Schistosoma mansoni*: stimulatory effect of rat skin lipid fractions on cercarial penetration behavior. **Exp. Parasit.** v. 31, p. 217-224, 1972.
- BABA, E.H., HOMEWOOD, C.A., GAZZINELLI, G., ATKINSON, E.M. Comparison of proteolytic enzymes from cercarial extract and secretion. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 57B, p. 55-57, 1977.
- BERGMEYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. 3 ed., VCH, Weinheim, 1988. v.2, p.88-92, 539 p.
- BEYNON, R.J. & BOND, J.S. **Proteolytic Enzymes: a practical approach**. Oxford. IRL Press, 1989. 259 p.
- BOBBITT, J.M. Periodate oxidation of carbohydrate. **Adv. in Carbohydrate Chem.** v. 11, p. 1-41, 1956.
- CAMPBELL, D.L., FRAPPAOLO, P.J.F., STIREWALT, M.A., DRESDEN, M.H. *Schistosoma mansoni*: partial characterization of enzyme(s) secreted from the preacetabular glands of cercariae. **Exp. Parasit.** v. 40, p. 33-40, 1976.
- CAPRON, A., DESSAINT, J. P., JOSEPH, M., ROUSSEAU, R., CAPRON, M., & BAZIN, H. Interaction between IgE complexes and macrophages in the rat: a new mechanism of macrophage activation. **European journal of immunology**. v.7, p. 315-322. 1977.
- CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M., JOSEPH, M., & PESTEL, J. Role of anaphylactic antibodies in immunity to schistosomes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. v. 29, p. 849-857. 1980.
- CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. **Isolamento e caracterização de um antígeno da cercária de *Schistosoma mansoni***. Belo Horizonte: UFMG, 1986. 92p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1986.

- CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C., RESENDE, M., TAVARES, C.A. Purification and characterization of a 47 kDa protease from *Schistosoma mansoni* cercarial secretion. **Parasitology**. v.105, p. 211-218, 1992.
- CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. **Isolamento e caracterização de componentes da secreção de cercária de *Schistosoma mansoni***. 97p. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.
- CHENG, T.C. & BIER, J.W. Studies on molluscan schistosomiasis: an analysis of the development of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 64, n. 01, p. 129-141, 1972.
- COLLEY, D.G., MAGALHÃES-FILHO, A. & COELHO, R.B. Immunopatolgy of dermal reactions induced by *Schistosoma mansoni* cercariae and cercarial extract. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.21, p. 558, 1972.
- COHEN, F.E., GREGORET, L.M., AMIRI, P., ALDAPE, K., RAILEY, J. & MCKERROW, J.H. Arresting tissue invasion of a parasite by protease inhibitors chosen with the aid of computer modeling. **Biochem.** v. 30, p. 11221-11229, 1991.
- CORT, W.W. The cercaria of the japanese blood fluke *Schistosoma japonicum* Katsurada. **University of California Publications in Zoology**. v. 18, p. 485-507, 1919.
- DALTON, J. P., STRAND, M., MANGOLD, B.L. & DEAN, D.A. Identification of *Schistosoma mansoni* glycoproteins recognized by protective antibodies from mice immunized with irradiated cercariae. **J. Immunol.** v. 136, p. 4689-4694, 1987.
- DORSEY, C.H., STIREWALT, M.A. *Schistosoma mansoni*: fine structures of cercarial acetabular glands. **Exp. Parasit.** v. 30, p. 199-214, 1971.
- DORSEY, C.H. *Schistosoma mansoni*: development of acetabular gland of cercaria at ultrastructural level. **Exp. Parasit.** v. 37, p. 37-50, 1975.

- DRESDEN, M.H., & ASCH, H. L. Proteolytic enzymes in extracts of *Schistosoma mansoni* cercariae. **Biochem. Biophys. Acta.** v. 289, p. 378-374. 1972.
- DRESDEN, M.H. & EDLIN, E.M. *Schistosoma mansoni*: effect of some cations on the proteolytic enzymes of cercariae. **Exp. Parasit.** v. 35, p. 299-303, 1974.
- DRESDEN, M.H. & EDLIN, E.M. *Schistosoma mansoni*: calcium content of cercariae and its effects on protease activity. **J. Parasit.** v. 61, n. 3, p. 398-402, 1975
- DRESDEN, M.H. & ASCH, H. L. Calcium carbonate content of the preacetabular glands of *Schistosoma mansoni* cercariae. **J. Parasit.** v. 63, n. 1, p. 163-165, 1977.
- ENGVALL, E., PERLMANN, P. Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA. **J. Immunol.** v. 109, p. 129-135, 1972.
- ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N., COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 95, p. 271-278, 1961.
- EY, P.L.; PROWSE, S.J., JENKING, C.R. Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. **Immunochemistry.** v.15, p. 429-36, 1978.
- FAUST, E.C. Criteria for the differentiation of *Schistosoma* larvae. **J. Parasit.** v. 6, n. 4, p.192-194, 1920.
- FISCHELSON, Z. Complement and parasitic trematodes. **Parasitology Today.** v.5, p. 19, 1989.
- FISCHELSON, Z., AMIRI, P., FRIEND, D.S., MARIKOVSKY, M., PETITT, M., NEWPORT, G., MCKERROW, J. H. *Schistosoma mansoni*: cell-specific expression and secretion of a serine protease during development of cercariae. **Exp Parasit.** v. 75, n. 1, p. 87-98, 1992.

- FREITAS, J. R.; RESENDE, E.S.; JUNQUEIRA, D.U.; COSTA A.M.; PELLEGRINO, J.
Criação em massa e ritmo de crescimento da *Biomphalaria glabrata*. **Ciênc. Cult.**
São Paulo, v. 27, p. 968-74, 1975.
- GAZZINELLI, G., PELLEGRINO, J. Elastolitic activity of *Schistosoma mansoni*
cercarial extracts. **J. Parasit.** v.50, p. 591-602. 1964.
- GAZZINELLI, G., RAMALHO-PINTO, F.J., PELLEGRINO, J. Purification and
characterization of the proteolytic enzyme complex of cercarial extract. **Comp.**
Biochem. Physiol. v. 18, p. 689-700. 1966.
- GAZZINELLI, G. **Enzimas proteolíticas da cercária do *Schistosoma mansoni*:
purificação, caracterização e função**. Belo Horizonte: UFMG, 1972. Tese
(Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
Federal de Minas Gerais, 1972.
- GORDON, R.M., DAVEY, T.H., PEASTON, H. The transmission of human bilharzias
in Sierra Leone with an account of the life-cycle of the schistosomes concerned *S.*
mansoni and *S. haematobium*. **Ann. Trop. Med. Parasit.** v. 28, n. 3, p. 323-418,
1934.
- GORDON, R.M., GRIFFITHS, R.B. Observations on the means by which the cercariae
of *Schistosoma mansoni* penetrate mammalian skin, together with an account of
certain morphological changes observed in the newly penetrated larvae. **Ann.**
Trop. Med. Parasitol. v. 45, p. 227-243, 1951.
- HEUSSEN, C., DOWDLE, E.B., Eletrophoretic analysis of plasminogen activators in
polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized
substrates. **Anal. Biochem.** v. 102, p.196-202. 1980.
- ITURBE, J. The anatomy of the cercariae of the *Schistosoma mansoni*. **New Orleans**
Med. Surg. J. v. 70, p. 433-4, 1917.

- KEMP, W.M. & POWELL, E.C. Ultrastructure of the cercarial penetration gland cells of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasit.** v. 56. n. 4, p. 184. 1970
- KING, C.L. & HIGASHI, G.I. *Schistosoma mansoni*: silver ions (Ag⁺) stimulates and reversibly inhibits lipids-induced cercarial penetration. **Exp. Parasit.** v. 75, p. 31-39, 1992.
- KRUIDENIER, F.J. & STIREWALT, M.A. Mucoïd secretion by schistosome cercariae. **J. Parasit.** v.40, n. 5, p. 33, 1954.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v. 227, p. 680-685, 1970.
- LANDSPERGER, W.J., STIREWALT, M.A. & DRESDEN, M.H. Purification and properties of a proteolytic enzyme from the cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni* . **Biochem. J.** v. 201, p. 137-144, 1982.
- LEWERT, R.M. & LEE, C.L. Studies on the passage of helminth larvae through host tissues. I- Histochemical studies on the extracellular changes caused by penetrating larvae. II- Enzymatic activity of larvae in vitro and in vivo. **J. Infect. Diseases.** v. 95, p. 13-51, 1954.
- LEWERT, R.M. & LEE, C.L. Quantitative studies of the collagenase-like enzymes of cercariae of *Schistosoma mansoni* and the larvae of *Stongyloides ratti*. **J. Infect. Dis.** v. 99, p. 1-14, 1956.
- LEWERT, R. M., HOPKINS, D. R., & MANDLOWITZ, S. The role of calcium and magnesium ions in invasiveness of schistosome cercariae. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 15, p. 314-323. 1966.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, J.R. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.

- LUNDE, M.N., OTTESEN, E.A. & CHEEVER, A.W. Serological differences between acute and chronic schistosomiasis mansoni detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 28, n. 1, p. 87-91, 1979.
- MARES-GUIA, M. Hydrophobic interactions in the trypsin active center. The sensitivity of the hydrophobic binding site to side chain modification in competitive inhibitors of the amidinium type. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 127, p. 317-322, 1968.
- MARIKOVSKY, M.; FISHELSON, Z., ARNON, R. Purification and characterization of proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 30, p. 45-54, 1988a.
- MARIKOVSKY, M., ARNON, R., FISHELSON, Z. Proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement. **J. Immunol.** v. 141, p. 273-278, 1988b.
- MARIKOVSKY, M., ARNON, R., FISHELSON, Z. *Schistosoma mansoni*: localization of the 28 KDa secreted protease in cercaria. **Parasite Immunol.** v. 12, p. 389-401, 1990.
- MacINNIS, A. J. Identification of chemicals triggering cercarial penetration responses of *Schistosoma mansoni*. **Nature.** v. 224, p. 1221-1222, 1969.
- McKERRROW, J. H., PINO-HEISS, S.; LINDQUIST, R., WERB, Z. Purification and characterization of an elastinolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. **J. Biol. Chem.** v. 260, n. 6, p. 3703-3707, 1985a.
- McKERRROW, J. H., JONES, P. SAGE, H., PINO-HEISS. Proteinases from invasive larvae of the trematode parasite *Schistosoma mansoni* degrade connective-tissue and basement-membrane macromolecules. **Biochem. J.** v. 231, p. 47-51. 1985b.
- McKERRROW, J. H., DOENHOFF, M.J. Schistosome proteases. **Parasitology Today.** v. 4, n. 12, p. 334-340, 1988.

- MATSUMURA, K., MITSUI, Y., SATO, K., SAKAMOTO, M. & AOKI, Y. *Schistosoma mansoni*: possible involvement of protein kinase C in linoleic acid-induced proteolytic enzyme release from cercariae. **Exp. Parasit.** v. 72, p. 311-320, 1991.
- MILLEMANN, N.E.R., THONARD, J.C. Protease activity in *Schistosoma* cercariae. **Exp. Parasitol.** v. 8, p. 129-136, 1959.
- MINARD, P., DEAN, D.A., JACOBSON, R.H., VANNIER, W.E., MURRELL, K.D. Immunization of mice with cobalt-60 irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 27, p. 76-86, 1978.
- NEVES, D.P. Parasitologia Humana. 9 ed. 524 p. Belo Horizonte: Atheneu. 1995.
- NEWPORT, G.R., MCKERROW, J.H., HEDSTROM, R., PETITT, M., MCGARRIGLE, L., BARR, P.J. & AGABIAN, N. Cloning of the proteinase that facilitates infection by schistosome parasites. **J. Biol. Chem.** v.263, n. 13, p. 179-183, 1988.
- OAKLEY, B.R., KIRSCH, D.R., & MORRIS, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.** v.105, p. 361-363. 1980.
- OLIVEIRA, C.C. **Indicadores bioquímicos na transformação da cercária de *Schistosoma mansoni* em esquistossômulo.** Belo Horizonte: UFMG, 1973. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1973.
- PEARCE, E.J. & McLAREN, D.J. *Schistosoma mansoni*: the cutaneous response to cercarial challenge in naive guinea pigs and guinea pigs vaccinated with highly irradiated cercariae. **Int. J. Parasit.** v. 16, p. 91, 1986.
- PELLEGRINO, C., MACEDO, D.G. A simplified method for the concentration of cercariae. **J. Parasitol.** v. 41, p. 329-30, 1955.
- PESSÔA, S.B., MARTINS, A.V. **Parasitologia Médica**, 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 872p.

- PINO-HEISS, S., PETITT, M., BECKSTEAD, J.H., MCKERROW, J.H. Preparation of mouse monoclonal antibodies and evidence for a host immune response to the preacetabular gland proteinase of *Schistosoma mansoni* cercariae. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 35, p. 536-543, 1986.
- PINTO, C., ALMEIDA, F.A. Penetração das cercárias de *Schistosoma mansoni* na pele de *Canis familiaris* e do homem. **Rev. Brasil. Biol.** v. 5, p. 219-229, 1945.
- SALAFSKY, B., WANG, S., KEVIN, M.B., HILL, H., FUSCO, A.C. The role of prostaglandins in cercarial (*Schistosoma mansoni*) response to free fat acids. **J. Parasitol.**, v. 70, p. 584-591, 1984.
- SAMUELSON, J.C. & CAULFIELD, J.P. The cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. **J. Cell Biol.** v. 100, p. 1423-1434, 1985.
- SCHIFF, C.J., CMELIK, S.H.W., LEY, H.E. & KRIEL, F.L. The influence of human skin lipids on the cercarial penetration responses of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni*. **J. Parasit.** v. 58, p. 476-480, 1972.
- STIREWALT, M.A., & HACKEY, J.R. Penetration of host skin by cercariae of *Schistosoma mansoni*. I. Observed entry into skin of mouse, hamster, rat, monkey and man. **J. Parasit.** v. 42, p. 565-580, 1956.
- STIREWALT, M.A. & EVANS, A.S. Chromatographic analysis of secretions from acetabular glands of *Schistosoma mansoni*. **Exp. Parasitol.** v. 10, p. 75-80, 1960.
- STIREWALT, M.A., KRUIDENIER, F.J. Activity of the acetabular secretory apparatus of cercariae of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions. **Exp. Parasitol.**, v. 11, p. 191-211, 1961.
- STIREWALT, M.A. Chemical biology of secretions of larval helminths. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 113, p. 36-53. 1963

- STIREWALT, M.A. & FREGEAU, W.A. An invasive enzyme system present in cercariae but absent in schistosomules of *Schistosoma mansoni*. **Exp. Parasitol.** v. 19, n. 2, p.206-215, 1966.
- STIREWALT, M.A. Penetration stimuli for Schistosome cercariae. In: CHENG, W.W. **Aspects of the Biology of Symbiosis**. Baltimore, Maryland: University Park Press. p. 1-23. 1971
- STIREWALT, M.A. *Schistosoma mansoni*: Histological localization of gelatinase in the preacetabular glands of cercariae. **Exp. Parasitol.** v. 34, p. 382-392, 1973.
- STIREWALT, M.A. & AUSTIN, B.E. Collection of a secreted protease from the preacetabular glands of cercariae of *Schistosoma mansoni* . **J. Parasit.** v. 59, n. 4, p. 741-743, 1973.
- STIREWALT, M.A., WALTERS, M. Histochemical analysis of the postacetabular gland secretion of cercariae of *Schistosoma mansoni*. **Exp. Parasitol.** v. 33, p. 56-72, 1973.
- STIREWALT, M.A. *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. v. , p. 115-182, 1974.
- TEIXEIRA, M.M., DOENHOFF, M.J., McNEICE, C., WILLIAMS, T.J., HELLEWELL, P.G. Mechanisms of the inflammatory response induced by extracts of *Schistosoma mansoni* larvae in guinea pig skin. **J. Immunol.** v. 151, n.10, p. 5525-34, 1993.
- TUNON, P., JOHANSSON, K.E. Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in PAGE. **J. Biochem. Biophys. Methods.** v. 9, p. 171-9, 1984.
- TZENG, S.; McKERROW, J.; FUKUYAMA, K.; JEONG, K., EPSTEIN, W. L. Degradation of purified skin keratin by a proteinase secreted from *Schistosoma mansoni* cercariae. **J. Parasitol.** v. 69, n. 5, p. 992-994, 1983.

WOODWARD, M.P., YOUNG Jr., W.W. & BLOODGOOD, R.A. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation.

J. Immunol. Meth. v. 78, p. 143-153, 1985.

WHO (1993) The control of schistosomiasis: Second Report of the WHO Expert Committee. Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series, No. 830)