

MARIA JÚLIA MANSO ALVES

ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS DE
Trypanosoma cruzi (epimastigota)

Tese de Doutorado apresentada ao De-
partamento de Bioquímica do Instituto de
Química da Universidade de São Paulo.

— 1974 —

a meus pais

Agradecimentos

Ao Dr. W. Colli pelo apoio, incentivo e confiança. Pelas facilidades proporcionadas para o amadurecimento dessa tese. Pela camaradagem estabelecida.

Ao Dr. Erney P. Camargo pela sugestão inicial do tema e pela boa vontade constantemente demonstrada.

À Dra. Lélia Mennucci e ao Dr. J.C.C. Maia pela iniciação científica.

Ao Dr. J.F. Fernandes e à equipe de seu laboratório pela introdução ao estudo dos tripanossomos.

À Muna C. Andery pela excelente assistência técnica. À D. Carmem M. Pinto pelo auxílio constante.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica que em diferentes oportunidades ofereceram sugestões valiosas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq-FINEP) pelo apoio financeiro.

INDICE

	PÁG.
RESUMO	1
INTRODUÇÃO	3
Superfície celular de tripanossomos	7
Concanavalina A (con A)	10
Glicoproteínas	14
MATERIAL E MÉTODOS	19
A. Células	19
Obtenção de formas epimastigotas	19
Obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas	20
Obtenção de formas tripomastigotas sanguícolas	20
Determinação do número de células	21
Meios de cultura	21
(a) Meio LIT	21
(b) Meio HIL	22
B. Experimentos com concanavalina A (con A)	23
Aglutinação de células por con A	23
Inibição da aglutinação	24
Incubação das células com tripsina	25
C. Isolamento e caracterização parcial do complexo glicoproteico	25
Cromatografia em papel dos açúcares	25
Determinação quantitativa dos açúcares por densitometria	27
Análise de aminoácidos	29
Extração do complexo glicoproteico	30
Cromatografia em coluna de DEAE-celulose	31
Filtração em gel	32
Eletroforese em gel de poliacrilamida	32
(a) Eletroforese na ausência de SDS	33
(b) Eletroforese na presença de SDS	34
(c) Densitometria do gel de poliacrilamida	34
Determinação de peso molecular	35
Dosagens	35

	PÁG.
D. Reagentes	36
RESULTADOS	39
A. Efeito de con A sobre <u>T. cruzi</u>	39
Efeito de con A sobre formas epimastigotas	39
Efeito de con A sobre formas tripomastigotas metacíclicas	41
Efeito de con A sobre formas tripomastigotas sanguícolas	42
B. Isolamento e caracterização parcial de um complexo glicoproteico extraído de formas epimastigotas de <u>T. cruzi</u>	43
Isolamento e purificação parcial	43
(a) Isolamento	43
(b) Purificação parcial por cromatografia	43
Experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida	46
(a) Eletroforese na ausência de SDS	47
(b) Eletroforese na presença de SDS	47
(c) Tratamento da fração aquosa com pronase	50
Cromatografia da fração aquosa em coluna de Bio-Gel P-150 em presença de SDS	51
Determinação do peso molecular	52
Composição do complexo glicoproteico	55
(a) Caracterização dos monossacarídeos	55
(b) Caracterização dos aminoácidos	58
Efeito do complexo glicoproteico na aglutinação das células por con A	58
DISCUSSÃO	136
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146

RESUMO

Formas epimastigotas de T. cruzi são aglutinadas especificamente por baixas concentrações de concanavali-na A. A aglutinação é linear com o tempo até aproximada - mente 10 minutos, para um número de células maior que 1×10^8 células/ml. Nessas condições a aglutinação é dependente da concentração de con A. As formas tripomastigotas sanguíco - las e metacíclicas não são aglutináveis por con A.

O complexo glicoproteico isolado de formas epi - mastigotas de T. cruzi por tratamento fenólico do extrato ce - lular, apresenta na sua composição ácido siálico, glicosami - na, galactose, glicose e manose, além de xilose em algu - mas frações. Os aminoácidos constituintes são principal - mente lisina, ácido aspártico (e/ou asparagina), alanina, tre - onina, ácido glutâmico (e/ou glutamina), serina, prolina e glicina. Esse complexo pode ser separado em três componen - tes em colunas de DEAE-celulose. Dois desses componentes, se - lecionados para estudo, inibem a reação de aglutinação por con A das formas epimastigotas, assim como a fração não cro - matografada. Essas frações isoladas fornecem quatro compo - nentes glicoproteicos por eletroforese em gel de poliacrila - mida na presença de SDS.

INTRODUÇÃO

Trypanosoma cruzi (CHAGAS, 1909), um flagelado parasita digenético, apresenta durante o seu ciclo evolutivo diferentes formas, cujo aparecimento obedece a uma determinada sequência, correspondente a um ambiente específico no hospedeiro.

No hospedeiro vertebrado, a multiplicação dos tripanossomos se dá por divisão binária das formas amastigotas (intracelulares). Ainda intracelularmente, há a formação de tripomastigotas sanguícolas, que alcançando a corrente circulatória, invadem outras células, com o aparecimento de novas formas amastigotas. As formas sanguícolas, passando para o trato digestivo de um invertebrado (triatomídeo) originam as formas epimastigotas, que também se multiplicam por divisão binária. Na região posterior do trato digestivo, há o aparecimento de formas tripomastigotas metacíclicas, incapazes de divisão, que através das fezes do triatomídeo, deixadas sobre o vertebrado, infestam esse hospedeiro, transformando-se dentro da célula novamente em amastigotas, reiniciando o ciclo. No entanto, esse ciclo ainda não está totalmente esclarecido, não sendo tão simples quanto o exposto. Por exemplo, entre a diferenciação das formas amastigotas para tripomastigotas sanguícolas, talvez ocorram formas epimastigotas intermediárias (in HOARE, 1972). Deve-se ressaltar ainda a variação morfológica existente nas formas tripomastigotas sanguícolas, provavelmente associa-

das com diferenças fisiológicas (BRENER, 1973). Também no hospedeiro invertebrado, segundo BRACK (1968), as formas tripomastigotas sanguíneas dariam origem a esferomastigotas, que se dividiriam, dando origem a tripomastigotas metacíclicas e epimastigotas. Uma outra sugestão, igualmente possível é que as formas tripomastigotas sejam provenientes diretamente das epimastigotas, com a migração gradual do cinetoplasto, como sugerido por CAMARGO (1964). Uma discussão detalhada da biologia e do ciclo evolutivo do T. cruzi pode ser encontrada nos artigos de BRENER (1973), HOARE (1972), COSGROVE (1971), DEANE (1969) e DEANE (1968) e SILVA & CAMARGO (1968).

A possibilidade de reproduzir o ciclo do T. cruzi no laboratório, torna-o, juntamente com outras espécies de tripanossomos um sistema interessante para utilização em estudos de diferenciação celular. Foram relatados alguns sistemas que permitem a interconversão de diferentes formas celulares desse protozoário (in NEWTON, CROSS & BAKER, 1973). Entretanto, de todas as transformações descritas a diferenciação em cultura de formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas é ainda o sistema mais fácil de ser controlado. Algumas vantagens desse sistema seriam a fácil distinção morfológica entre as duas formas acima referidas, a possibilidade de separá-las fisicamente e o fato de que essa transformação ocorre em meio líquido e isento de outras células. No entanto, há uma série de dificuldades amplamente conhecidas e discutidas, mas de difícil solução. As mais evidentes podem ser resumidas em:

a) complexidade dos meios de cultura utilizados, dificultando o estudo de fatores externos envolvidos na morfogênese das células. O meio simplificado de YOSHIDA (1974) parece oferecer resultados promissores nesse aspecto;

b) restrições na obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas, que atingem, na maioria das vezes, uma porcentagem máxima de 30%, dificilmente obtendo-se porcentagens mais elevadas dessas formas na cultura. Para agravar ainda mais esse problema, a separação dos tripomastigotas das formas epimastigotas existentes na cultura, apresenta um rendimento bastante baixo, em torno de 30% (GOLDBERG, 1974) para a separação em colunas de troca iônica (AL-ABBASSY, SEED & KREIER, 1972);

c) ausência de sinais conhecidos para a diferenciação. Como foi ressaltado, esse item se relaciona intimamente com o primeiro. Embora sejam conhecidos alguns sinais externos para algumas etapas de transformação morfogenética em alguns tripanossomos, como temperatura para T. conorhini (DEANE & KIRCHNER, 1963) e T. theileri (RISTIC & TRAGER, 1958), composição de aminoácidos do meio de cultura em L. donovani (SIMPSON, 1968) e de uréia para T. mega (STEINERT, 1958), muito pouco ainda se conhece a esse respeito. No caso de T. mega, cuja cepa foi isolada em 1956, parece não haver mais resposta adequada do protozoário ao tratamento com uréia (in NEWTON, CROSS & BAKER, 1973). Essa variabilidade de resposta obtida com culturas estabelecidas sugere que, além das respostas específicas do protozoário aos fatores externos, há a influência de outros, internos, que somados, podem induzir

a obtenção de resultados conflitantes. No caso de T. cruzi também foi descrita a influência da temperatura em formas de cultura de tecido (NEVA, MALONE & MYERS, 1961; TREJOS et al, 1963); a influência do pH na diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (CASTELLANI, RIBEIRO & FERNANDES, 1967) e de restrição de fatores nutricionais (CAMARGO, 1964).

O trabalho contido nessa tese faz parte de um projeto mais amplo, que se caracteriza pelo estudo da superfície celular de diferentes formas de T. cruzi e seu possível relacionamento com a diferenciação celular, uma vez que a superfície celular, estando em contato direto com o ambiente, pode ter papel importante na diferenciação, bem como nas relações hospedeiro-parasita. Nessa primeira etapa procurou-se caracterizar diferenças no conteúdo de carboidratos na superfície celular de algumas formas de T. cruzi (epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas e tripomastigotas sanguícolas) pela ação de concanavalina A (que interage com determinados monossacarídeos), além de se isolar e caracterizar parcialmente um complexo glicoproteico extraído de formas epimastigotas. Essas formas podem ser obtidas facilmente e na ausência de qualquer outra forma do protozoário. A correlação entre a interação das células com concanavalina A e o complexo glicoproteico foi sugerida por evidências circunstanciais.

Com o intuito de localizar os temas abordados nesse trabalho num contexto mais geral, essa introdução será

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

