UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO DE DOIS GENES CONTÍGUOS DE
TRYPANOSOMA CRUZI QUE CODIFICAM ANTÍGENOS COM
REPETIÇÕES DE EPITOPOS IMUNODOMINANTES**

ARTHUR GRUBER

Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica do
Instituto de Química da Universidade de
São Paulo.

Orientadora: Prof^a. Dra. Bianca Zingales

SÃO PAULO
1994

"CARACATERIZAÇÃO DE DOIS GENES CONTÍGUOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* QUE CODIFICAM ANTÍGENOS COM REPETIÇÕES DE EPÍTOPOS IMUNODOMINANTES"

ARTHUR GRUBER

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Profa.Dra. Bianca Silvana Zingales Oller do Nascimento
IQ-USP
(Orientadora e Presidenta)

Prof. Dr. Hamza Fahmi Ali El Dorry
IQ-USP

Profa.Dra. Aline Maria da Silva
IQ - USP

Prof. Dr. Wim Degrave
FIOCRUZ

Profa. Dra. Lucile Maria Floeter Winter
ICB II-USP

SÃO PAULO
22 DE DEZEMBRO DE 1994

Aos meus amados pais que, na sua incansável luta, tornaram possível esta realização. A eles tudo devo, pois deles tudo recebi.

Ao meu irmão pelo exemplo e pelo apoio que sempre me ofereceu.

À Fernanda,
minha companheira adorável, causa maior
da felicidade e alegria que sinto neste
momento.

AGRADECIMENTOS

A Bianca Zingales, pelo esforço e entusiasmo que sempre dedicou na orientação deste trabalho. Esta orientação foi essencial no meu processo de formação científica e, aliada à liberdade e ao incentivo que sempre me ofereceu, permitiu que eu pudesse me aprimorar dentro e fora do laboratório.

A Walter Colli, pelo exemplo que me ofereceu de conduta científica e de respeito à liberdade de opiniões. A sua capacidade de enxergar muito além do presente é uma das qualidades que certamente influíram muito em minha formação.

A Maria Júlia Manso Alves e Robert Ivan Schumacher, que sempre estiveram dispostos a me ajudar e com quem sempre tive um ótimo relacionamento.

A Marinei Ferreira Gonçalves que, muito além de um simples relacionamento profissional, foi uma pessoa humana e amiga com quem sempre pude contar nos bons e maus momentos. Sua ajuda foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos técnicos Cecília França Lopes, Lucinda Cândida da Silveira e Roberto Zangrandi. A maior abnegação não é trabalhar arduamente para obter um título universitário, mas trabalhar incansavelmente para que outros o obtenham. Me faltam palavras para expressar toda a gratidão pela dedicação, disposição e boa vontade que sempre tiveram comigo.

A Clara Carniol pela amizade e alegria que sempre transmitiu. Os maiores gestos de amizade são aqueles que permanecem anônimos, porque no anonimato se esconde a verdadeira intenção desvinculada.

A Monika Vieira de Arruda, uma pessoa que com suas poucas palavras, foi capaz de contribuir de uma maneira indescritível neste trabalho. Seu exemplo de conduta se fez muito presente na minha formação, apesar do pouco tempo de convívio que tivemos.

A Cyntia Pereira, estagiária de iniciação científica. Cyntia participou ativamente de vários dos experimentos apresentados neste trabalho. Com sua alta capacidade de trabalho, maturidade e seriedade, soube ser muito mais do que uma colaboradora. E, como poucos, soube unir a esta grande competência uma amizade sincera.

A Ricardo Peres do Souto (Rich), que muito me auxiliou em incontáveis ocasiões. Muito mais do que um colega, um amigo que atrás de sua timidez esconde grandes qualidades.

Aos estagiários de iniciação científica Camila B. Ramalho, Paulo G. Marmorato, Beatriz Stolf e Denisinha, os quais muito contribuíram na execução deste trabalho.

A Hernando del Portillo (Depto. de Parasitologia - ICB) por várias sugestões técnicas e protocolos que me ofereceu, além da alegria e amizade que sempre soube transmitir.

A Eufrosina S. Umezawa (Instituto de Medicina Tropical) pela produtiva e agradável colaboração que mantivemos em várias ocasiões. Agradeço também pelo soro anti-tct e os soros humanos de pacientes chagásicos e com outras parasitoses.

A Pedro Soares de Araújo pela amizade e ensinamentos que sempre me transmitiu, especialmente na informática.

A Hernan Chaimovich pelas poucas mas valiosas palavras que me ajudaram a tomar decisões acertadas.

A Wim Degrave (FIOCRUZ - RJ), pela utilização do computador VAX e pelas orientações no uso do pacote GCG, as quais foram fundamentais para a análise dos dados de seqüenciamento.

A Brazilian Molecular Biology and Biotechnology Network - BMBBnet, EMBRAPA/CENARGEN - Brasília pelo uso do computador IRIS - Silicon Graphics na análise das seqüências nucleotídicas e protéicas.

A Fernando de Castro Reinach, por várias sugestões científicas que contribuíram para a evolução do trabalho.

A Artur Scherf (Institute Pasteur) pelo vetor pMSgt11.

A Marco Krieger pelo protocolo de ressolubilização de corpúsculos de inclusão.

A Maria Isabel Cano (Escola Paulista de Medicina), pela eletroforese e transferência de cromossomos de *T. cruzi*.

A Jorge Yanovsky (Polychaco[®] S.A.I.C - Argentina), pelos dados dos experimentos de ELISA feitos com soros do Instituto Fatała Chaben.

A Egler Chiari (UFMG) e João Carlos Pinto Dias (FIOCRUZ - MG) pelos soros humanos da região de Bambuí.

Aos professores Hamza F. A. El Dorry, Suely L. Gomes e Antonio G. Bianchi por permitirem a utilização de reagentes e equipamentos em seus laboratórios e pelas inúmeras sugestões que sempre me deram.

Aos colegas do nosso laboratório: Jesus, Ronaldo, Kumiê, Juan, Ricardo, Carla, Grace, Eloíse, Daniella, Flávio, Luís, Cláudia, Sílvia, Ana Paula, Fátima, Fernando, Laila, Denise, Martha, Ingrid, Lídia e Liliana. Cada qual contribuiu à sua maneira com meu trabalho e todos, em seu conjunto, para o meu engrandecimento.

Aos colegas do laboratório do Prof. Hernan Chaimovich: Teresa Cristina (T.C.), Cláudia, Fábio, Fábio(inho), Ana Paula, Márcia, Maurício, Hyoka, Palmira, Boris e Walter, os quais sempre ajudaram a tornar o nosso ambiente mais alegre.

Aos colegas do Instituto: Flávio Henrique, Jorge, Wilton, Euclides, Carlos Rossini, Pepe, Sheila, Lígia, Horácio, Enny, Margareth, Paulo, Rosane, Júlio, Adriana, Marcelo e Ivan Campos. Obrigado pela amizade e ajuda que vocês sempre me deram.

A Rogério Lacaz Ruiz, a quem devo minha entrada no meio científico. Grande amigo, exemplo de conduta humana, companheiro de alegrias e frustrações.

A Luíza A. Guerino pelo apoio e estímulo incessantes que me ofereceu ao longo do trabalho. Sem esse apoio, possivelmente este trabalho não teria tido êxito.

A minha amiga, companheira dos tempos de iniciação científica, Alda Maria Backx N. Madeira, pelo apoio, estímulo, paciência e amizade que sempre me dispensou.

Esta pesquisa foi financiada com recursos do UNDP/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, FINEP, FAPESP e CNPq. Agradeço ao CNPq a bolsa de estudos que me permitiu a realização deste trabalho.

ÍNDICE

ABREVIACÕES.....	i
UNIDADES.....	iv
1.INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Aspectos gerais da doença de Chagas.....	01
1.1.1. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	01
1.1.2. Epidemiologia.....	02
1.1.3. Fases e formas clínicas da doença.....	04
1.1.4. Caracterização das cepas de <i>T. cruzi</i>	05
1.2. Diagnóstico da doença de Chagas.....	07
1.2.1. Detecção parasitológica.....	08
1.2.2. Diagnóstico sorológico.....	08
1.2.2.1. Antígenos complexos.....	10
1.2.2.2. Antígenos purificados e recombinantes.....	14
1.3. Formas de controle da doença de Chagas.....	18
1.3.1. Eliminação do vetor.....	18
1.3.2. Quimioterapia.....	19
1.3.3. Vacinação.....	20
1.4. Aspectos da biologia molecular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.4.1. Conteúdo de DNA, ploidia e cariótipo.....	21
1.4.2. DNA de cinetoplasto (kDNA).....	22
1.4.3. "Trans-splicing".....	23
1.4.4. Editoração de RNA.....	25
1.5. Objetivos do presente trabalho.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1. Reagentes.....	28
2.2. Soluções.....	29
2.3. Meios de cultura.....	30
2.4. Bactérias.....	30
2.5. Vetores.....	31
2.6. Parasitas.....	31
2.7. Soros.....	32
2.7.1. Soro de coelho anti-tripomastigotas de cultura de tecido (tct).....	32
2.7.2. Obtenção de soros de coelhos anti-proteínas de fusão.....	32
2.7.2.1. Emulsificação do antígeno.....	32
2.7.2.2. Imunização por inoculações subcutâneas.....	32
2.7.2.3. Imunização por múltiplas inoculações intradérmicas.....	33

2.7.3. Soros humanos.....	33
2.8. Purificação de ácidos nucleicos de <i>T. cruzi</i>	33
2.8.1. Preparação simultânea de DNA e RNA.....	33
2.8.1.1. Ultracentrifugação em gradiente de césio.....	33
2.8.1.2. Obtenção do DNA.....	34
2.8.1.3. Obtenção do RNA total.....	34
2.8.2. Purificação da fração de RNA mensageiro poli A ⁺	35
2.8.3. Preparação do RNA pelo método do fenol quente.....	35
2.9. Construção de biblioteca genômica de <i>T. cruzi</i> no vetor de expressão λ gt11.....	36
2.9.1. Preparação dos insertos	36
2.9.2. Marcação radioativa dos adaptadores de <i>EcoRI</i>	36
2.9.3. Controle da eficiência de fosforilação dos adaptadores.....	37
2.9.4. Ligação de insertos com os adaptadores e digestão com <i>EcoRI</i>	37
2.9.5. Separação do excesso de adaptadores não ligados ao DNA dos insertos.....	38
2.9.6. Reação de ligação entre o DNA de <i>T. cruzi</i> e o DNA de λ gt11.....	38
2.9.7. Encapsidação <i>in vitro</i> do DNA	38
2.9.7.1. Preparação do extrato de empacotamento sonificado (SE).....	38
2.9.7.2. Preparação do extrato de empacotamento congelado-degelado (FTL).....	39
2.9.7.3. Reação de encapsidação.....	39
2.9.8. Determinação do título e taxa de recombinação da biblioteca.....	40
2.10. Varredura da biblioteca genômica de <i>T. cruzi</i> em λ gt11 com anticorpos.....	40
2.10.1. Absorção do soro anti-tct.....	40
2.10.2. Seleção dos clones recombinantes.....	41
2.11. Varredura de biblioteca genômica de <i>T. cruzi</i> em λ EMBL3 com sondas radioativas.....	41
2.12. Preparação de sondas de DNA radioativas.....	42
2.12.1. "Nick-translation".....	42
2.12.2. "Primer extension".....	43
2.12.3. Remoção dos nucleotídios não incorporados.....	43
2.12.4. Determinação da incorporação dos nucleotídios radioativos.....	43
2.13. Preparação de DNA de fago λ	44
2.13.1. Minipreparação de DNA de fago λ	44
2.13.2. Preparação de DNA de fago λ em larga escala.....	44
2.13.2.1. Cultivo de fagos em larga escala.....	44
2.13.2.2. Purificação de DNA de fago λ	45
2.14. Purificação de DNA de plasmídeo.....	45
2.14.1. Minipreparações de DNA de plasmídeo.....	45

2.14.2. Minipreparações rápidas de DNA ("speed preps").....	46
2.14.3. Midipreparação de DNA de plasmídio.....	46
2.14.4. Preparação de DNA de plasmídio em gradiente de cloreto de cézio.....	47
2.15. Subclonagem de fragmentos de DNA.....	48
2.15.1. Digestão do DNA com enzimas de restrição.....	48
2.15.2. Eletroforese em minigel de agarose.....	49
2.15.3. Purificação de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose de baixo ponto de fusão (agarose LMP).....	49
2.15.4. Reação de ligação.....	50
2.15.5. Preparação de células bacterianas competentes e transformação.....	50
2.15.6. Identificação dos clones recombinantes.....	51
2.16. Expressão dos antígenos clonados.....	51
2.16.1. Expressão das proteínas de fusão em bactérias lisogênicas de λ gt11.....	51
2.16.1.1. Obtenção de bactérias lisogênicas.....	51
2.16.1.2. Expressão das proteínas de fusão por indução das bactérias lisogênicas.....	52
2.16.2. Subclonagem de B12 e B13 em pMSgt11 e expressão (fusão com β -galactosidase).....	52
2.16.2.1. Purificação dos insertos e ligação com o vetor.....	52
2.16.2.2. Imunoensaio de colónias bacterianas.....	52
2.16.2.3. Produção das proteínas de fusão.....	53
2.16.2.4. Obtenção do lisado bacteriano.....	53
2.16.2.5. Determinação da solubilidade das proteínas de fusão.....	54
2.16.2.6. Cromatografia de afinidade em colunas de pAPTG-agarose.....	54
2.16.2.7. Detecção da atividade de β -galactosidase.....	55
2.16.3. Subclonagem e expressão do fragmento S3S4 em pGEX3X (fusão com GST).....	55
2.16.3.1. Construção do clone pGEX3X-S3S4.....	55
2.16.3.2. Cinética de expressão da proteína de fusão GST-S3S4.....	56
2.16.3.3. Produção de proteína de fusão.....	56
2.16.3.3.1. Cultivo das células e indução.....	56
2.16.3.3.2. Obtenção do lisado das células bacterianas.....	56
2.16.3.4. Purificação da proteína GST-S3S4.....	57
2.16.3.4.1. Cromatografia de afinidade.....	57
2.16.3.4.1.1. Cromatografia de afinidade em resina de GSH-agarose.....	57
2.16.3.4.1.2. Detecção da atividade	

enzimática de GST.....	57
2.16.3.4.2. Precipitação seletiva.....	57
2.16.3.4.2.1. Precipitação da proteína de fusão GST-S3S4.....	57
2.16.3.4.2.2. Ressolubilização da proteína de fusão GST-S3S4.....	58
2.17. Utilização das proteínas de fusão no diagnóstico sorológico da doença de Chagas.....	58
2.17.1. Radioimunoensaio em microplacas.....	58
2.17.2. ELISA.....	59
2.17.3. Análise estatística	59
2.18. Ensaio de imuno-seleção.....	59
2.18.1. Acoplamento de proteínas à resina de agarose ativada.....	59
2.18.2. Purificação de IgG a partir de soros de pacientes chagásicos.....	60
2.18.3. Cromatografia de afinidade para obtenção de anticorpos monoespecíficos.....	60
2.19. Eletroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....	61
2.20. Ensaio de Western blot.....	62
2.20.1. Transferência das proteínas para filtro de nitrocelulose.....	62
2.20.2. Coloração do filtro de nitrocelulose.....	62
2.20.3. Reação com anticorpos e revelação.....	63
2.20.3.1. Revelação imunoenzimática.....	63
2.20.3.2. Revelação com proteína A radioativa.....	63
2.21. Ensaio de imunoprecipitação.....	63
2.21.1. Marcação radioativa da superfície de parasitas.....	63
2.21.2. Precipitação dos antígenos.....	64
2.22. Dosagem de proteína.....	64
2.23. Ensaio de Southern blot.....	65
2.23.1. Transferência do DNA para membrana de nylon.....	65
2.23.2. Hibridização das sondas com a membrana.....	66
2.24. Ensaio de Northern blot.....	66
2.24.1. Eletroforese de RNA em géis de agarose/formaldeído.....	66
2.24.2. Transferência do RNA.....	67
2.24.3. Hibridização das sondas com os filtros de nitrocelulose.....	67
2.25. Sequenciamento de DNA.....	68
2.25.1. Digestão unidirecional do DNA com Exonuclease III.....	68
2.25.2. Sequenciamento de DNA de fita simples.....	69

2.25.2.1. Preparação dos moldes de DNA de fitas simples.....	69
2.25.2.2. Reação de seqüenciamento.....	69
2.25.3. Seqüenciamento de DNA de fita dupla.....	70
2.25.3.1. Preparação dos moldes de DNA por desnaturação alcalina.....	70
2.25.3.2. Reação de seqüenciamento com T7 DNA Polimerase.....	71
2.25.3.3. Reação alternativa de extensão com Terminal desoxinucleotidil Transferase (TdT).....	72
2.25.4. Gel de seqüenciamento.....	73
2.25.4.1. Gel de seqüenciamento com gradiente de força iônica.....	73
2.25.4.2. Gel de seqüenciamento com gradiente de espessura.....	74
2.26. Análise computacional dos dados das seqüências nucleotídicas.....	74
2.26.1. Programa DNASIS.....	74
2.26.2. Busca de homologia em bancos de dados.....	74
2.26.2.1. WinBlast.....	74
2.26.2.2. BLAST.....	75
2.26.3. Recuperação de seqüências.....	75
2.26.3.1. Network Entrez.....	75
2.26.3.2. Serviço de recuperação de seqüências por correio eletrônico.....	75
2.26.4. Programas de alinhamento de seqüências para computadores IBM-PC.....	76
2.26.4.1. MACAW.....	76
2.26.4.2. Clustal V.....	76
2.26.5. Pacote de análise de seqüências GCG.....	76
2.27. Eletroforese de campo pulsado.....	77
3. RESULTADOS.....	78
3.1. Construção da biblioteca genômica de <i>T. cruzi</i> em λ gt11.....	78
3.2. Absorção do soro policlonal anti-tct.....	79
3.3. Isolamento dos clones recombinantes B12 e B13.....	79
3.4. Subclonagem dos insertos B12 e B13 para os vetores M13mp18 e pUC18.....	79
3.5. Seqüenciamento dos clones B12 e B13.....	80
3.6. Análise do arranjo genômico dos clones B12 e B13.....	80
3.7. Identificação dos transcritos correspondentes a B12 e B13.....	83
3.8. Expressão dos clones B12 e B13.....	83
3.8.1. Expressão das proteínas de fusão	

em bactérias lisogênicas Y1089.....	83
3.8.2. Expressão e purificação das proteínas	
de fusão em DH5 α /pMSgt11.....	86
3.8.2.1. Subclonagem de B12 e B13 no vetor pMSgt11.....	86
3.8.2.2. Expressão das proteínas de fusão B12 e B13.....	87
3.8.2.3. Determinação da solubilidade das proteínas de fusão.....	87
3.8.2.4. Purificação das proteínas de fusão.....	88
3.9. Caracterização dos antígenos de <i>T. cruzi</i> clonados.....	90
3.9.1. Uso de soros policlonais obtidos por imunização de	
coelhos com as proteínas de fusão.....	90
3.9.2. Uso de anticorpos humanos imuno-selecionados.....	91
3.10. Determinação da localização celular em <i>T. cruzi</i> dos antígenos clonados.....	91
3.11. Avaliação dos antígenos B12 e B13 no diagnóstico	
sorológico da doença de Chagas.....	93
3.11.1. Padronização do radioimunoensaio.....	93
3.11.2. Análise de reatividade de soros humanos por RIA.....	95
3.11.3. Análise de reatividade de soros humanos por ELISA.....	97
3.12. Isolamento de clones a partir de uma	
biblioteca genômica em λ EMBL3.....	97
3.13. Determinação do mapa de restrição	
de uma região de 32 kb.....	98
3.14. Expressão e purificação da proteína GST-S3S4.....	100
3.14.1. Construção do clone pGEX3X-S3S4.....	100
3.14.2. Expressão da proteína de fusão GST-S3S4.....	102
3.14.3. Purificação da proteína GST-S3S4.....	102
3.14.3.1. Cromatografia de afinidade em resina GSH-agarose.....	102
3.14.3.2. Purificação da proteína GST-S3S4 por precipitação seletiva.....	103
3.15. Avaliação do antígeno GST-S3S4 no diagnóstico	
sorológico da doença de Chagas.....	104
3.16. Utilização do soro anti-GST-S3S4 em Western blot de lisados de <i>T. cruzi</i>	106
3.17. Sequenciamento dos genes B12 e B13.....	106
3.17.1 Subclonagem de fragmentos dos clones genômicos.....	107
3.17.2. Determinação do número e posição das repetições seriadas.....	107
3.17.3. Sequenciamento do gene B12.....	108
3.17.4. Análise computacional da sequência de B12.....	116
3.17.5. Sequenciamento da região intergênica e 5' terminal	
do gene B13 (fragmento B4H5).....	120
3.17.6. Análise computacional da sequência do fragmento B4H5.....	120

3.18. Determinação do mapa de transcrição da região de 32 kb.....	124
3.18.1. Caracterização dos transcritos reconhecidos pelos clones genômicos.....	124
3.18.2. Identificação de um terceiro gene denominado B11.....	124
3.19. Caracterização do gene B11.....	126
3.19.1. Estudo do arranjo genômico do clone SE1.....	126
3.19.2. Seqüenciamento do fragmento SE1.....	126
3.20. Estudo do arranjo cromossomal dos genes B11, B12 e B13.....	131
4. DISCUSSÃO.....	134
4.1. Um novo método de absorção de soros.....	134
4.2. Diagnóstico sorológico da doença de Chagas.....	135
4.3. Identificação e caracterização dos antígenos clonados.....	143
4.4. Caracterização dos transcritos dos genes B12 e B13.....	147
4.5. Artefatos de recombinação.....	147
4.6. Caracterização dos genes B12 e B13.....	149
4.7. Análise das seqüências nucleotídicas e protéicas de B12 e B13.....	154
4.7.1. Seqüências relacionadas com o gene B12.....	154
4.7.2. Seqüências relacionadas com o gene B13.....	164
4.8. Caracterização do gene B11 e sua relação com retrotransposons.....	165
4.9. Perspectivas futuras.....	170
5. RESUMO.....	172
6. SUMMARY.....	174
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	176

ABREVIACÕES

*p*APTG - *p*-aminofenil- β -D-tiogalactopiranosídeo
 ATP - adenosina trifosfato
 BSA - soroalbumina bovina
 cDNA - DNA complementar
 CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
 DEAE - dietilaminoetil
 DEP - dietilpirocarbonato de sódio
 DME - meio de Eagle modificado por Dulbecco
 DMSO - dimetilsulfóxido
 DNA - ácido desoxiribonucleico
 DNase - desoxiribonuclease
 D.O. - densidade óptica
 DOS - "disk operating system" (sistema operacional em disco)
 dATP - desoxiadenosina trifosfato
 dCTP - desoxicitidina trifosfato
 ddNTP - abreviação coletiva para didesoxinucleosídeos trifosfato (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP)
 dGTP - desoxiguanosina trifosfato
 dNTP - abreviação coletiva para desoxinucleosídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
 dTTP - desoxitimidina trifosfato
 DTT - ditioneitol
 EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
 ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio imunoenzimático)
 FTP - "file transfer protocol" (protocolo de transferência de arquivos)
 β -gal - β -galactosidase
 gRNA - RNA guia
 GSH - glutationa reduzida
 GST - glutationa *S*-transferase
 IPTG - isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
 IRMA - immunoradiometric assay (ensaio imunoradiométrico)
 kDNA - DNA de cinetoplasto
 LIT - infusão de fígado e triptose
 LMP agarose - agarose de baixo ponto de fusão
 MES - ácido 2-(*N*-morfolino) etanosulfônico
 8-MOP - 8-metoxipsoralen

MOPS - (ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico)
mRNA - RNA mensageiro
NaPPi - pirofosfato de sódio
NCBI - "National Center for Biotechnology Information" (Centro Nacional de
Informações em Biotecnologia - EUA)
NP-40 - Nonidet P-40
OMS - Organização Mundial da Saúde
ONPG - *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
ORF - "open reading frame" (passo de leitura aberto)
PBS - solução salina tamponada com fosfato
PCR - "polymerase chain reaction" (reação em cadeia da polimerase)
PEG - polietilenoglicol
PFGE - "pulse field gel electrophoresis" (eletroforese de campo pulsado)
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila
POPOP - 1,4,bis 2 (4-metil 5-feniloxazolil) benzeno
PPO - 2, 5-difeniloxazol
p/v - peso por volume
Pu - purina
PVP - polivinilpirrolidona
Py - pirimidina
qsp - quantidade suficiente para
RACE - "rapid amplification of cDNA ends" (amplificação rápida de extremidades de
cDNA)
RFLP - "restriction fragments length polymorphism" (polimorfismo no tamanho de
fragmentos de restrição)
RIA - radioimunoensaio
RNA - ácido ribonucléico
RNase - ribonuclease
rRNA - RNA ribossomal
SDS - lauril sulfato de sódio
SDS-PAGE - gel de poliacrilamida contendo SDS
SFB - soro fetal bovino
SSC - solução salina com citrato de sódio
ssDNA - DNA de fita simples
SSPE - solução salina com tampão fosfato e EDTA
TBE - solução tampão Tris-borato-EDTA
TBS - solução salina tamponada com Tris
TCA - ácido tricloroacético

TCP/IP - "Transmission Control Protocol/Internet Protocol" (Protocolo de Controle de Transmissão/Protocolo Internet)

tct - tripomastigotas de cultura de tecido

TdT - terminal desoxinucleotidil transferase

TE - Tris-EDTA

TEMED - N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamina

TLCK - $N\alpha$ -*p*-Tosil-L-lisina clorometil cetona

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

TSM - solução salina com magnésio tamponada com Tris

Tween 20 - monolaurato de polioxietilenosorbitana

UV - ultravioleta

VSG - "variant surface glycoproteins" (glicoprotéinas variantes de superfície)

v/v - volume por volume

X-Gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

UNIDADES

Ci - Curie (1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ desintegrações por segundo = $3,7 \times 10^{10}$ Bq)

cm - centímetro

cmHg - centímetros de mercúrio

cpm - contagens por minuto

dpm - desintegrações por minuto

fg - fentograma

g - aceleração da gravidade

g - grama

kb - quilobase

kDa - quilodalton - 1.000 unidades de massa atômica

(1 dalton = 1 u.m.a. = $1,660 \times 10^{-24}$ g)

L - litro

mA - miliamperes

Mb - megabases

mg - miligrama

mL - mililitro

mm - milímetro

μCi - microcurie (1 μCi = $3,7 \times 10^4$ Bq)

μg - micrograma

μL - microlitro

ng - nanograma

nm - nanômetros

pb - pares de bases

rpm - rotações por minuto

U - unidades

UFP - unidades formadoras de placas de lise

V - volt

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da doença de Chagas

A doença de Chagas, também chamada tripanossomíase americana, afeta cerca de 24 milhões de pessoas na América Latina (Schofield, 1985). No Brasil existem cerca de 5 milhões de infectados e um total de 25 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas, as quais correspondem a 3 milhões de quilômetros quadrados (cf. Dias, 1987). O agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado digenético pertencente à família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida. Esses parasitas se caracterizam pela presença de um flagelo e uma única mitocôndria, na qual se situa o cinetoplasto, uma organela especializada contendo DNA (cf. Brener, 1973). Na ordem Kinetoplastida encontram-se duas seções: a Salivaria e a Stercoraria. Na primeira situam-se os tripanossomas africanos, cuja diferenciação é completada no aparelho bucal do inseto vetor (gênero *Glossina*) e a transmissão ocorre pela saliva do vetor. O *T. cruzi* por sua vez, pertencente à seção Stercoraria, completa seu desenvolvimento na porção terminal do intestino do inseto redutível, é eliminado pelas fezes e transmitido ao hospedeiro vertebrado pela ferida da picada, abrasões da pele ou através de membranas mucosas (Clayton, 1988). Entre as espécies da seção Stercoraria, o *T. cruzi* é a única espécie digenética a produzir uma patogenia clara e bem estabelecida no homem, na qual as formas sanguíneas têm de penetrar em células do hospedeiro para se multiplicarem (Colli *et al.*, 1981).

1.1.1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* apresenta três formas morfogênicas ou evolutivas ao longo de seu ciclo de vida. Para a nomenclatura dessas formas (Hoare & Wallace 1966), adotou-se a raiz mastigota (do grego *μαστιξ* = chicote) e prefixos que designam a disposição do flagelo na célula, determinada pelo seu ponto de inserção (indicado pela posição do cinetoplasto), seu curso e ponto de emergência. Dessa forma, o antigo estágio "leishmanial", que apresenta formas redondas sem flagelo externo, foi denominado amastigota. O epimastigota refere-se às formas "critidiais", apresentando um flagelo que se inicia próximo a um cinetoplasto justanuclear e emerge na porção lateral da célula. A forma tripomastigota, representando as antigas "formas verdadeiras de tripanossomas", apresenta um cinetoplasto posterior ao núcleo. O flagelo surge próximo e corre ao longo da célula formando uma membrana ondulante.

A transmissão da doença se dá pela picada do barbeiro seguida da deposição de fezes e urina que contém tripomastigotas metacíclicos infectantes (Brener, 1973; Tanowitz

et al., 1992). Os tripomastigotas metacíclicos podem infectar o hospedeiro vertebrado pela porta de entrada da picada, ou ativamente por membranas mucosas. As formas tripomastigotas no sangue podem ser fagocitadas ou ainda penetrar ativamente em células (*cf.* Tanowitz *et al.*, 1992). Tripomastigotas são refratários à lise mediada por complemento, ao passo que formas epimastigotas ativam a via alternativa do complemento. O tripomastigota penetra em uma variedade de células, mas as preferidas são as da glia e de músculo, especialmente cardíaco (Brener, 1973; Vickerman, 1985). Os tripomastigotas, quando fagocitados, conseguem escapar do vacúolo fagocítico e vão se diferenciar no citoplasma da célula. Essa característica não é observada em epimastigotas, os quais acabam sendo destruídos no fagolisossoma (Colli *et al.*, 1981). Cerca de 3 horas após a penetração, o tripomastigota se diferencia em amastigotas. Após um período de quiescência de 35 horas, os amastigotas passam a sofrer uma divisão binária a cada 12 horas. No final de 4 a 5 dias pode haver de 50 a 300 parasitas por célula (Brener 1973; Vickerman, 1985), os quais promovem sua lise e atingem a circulação sangüínea. Esses tripomastigotas, denominados sangüíneos, podem então invadir outras células do hospedeiro vertebrado.

O hospedeiro invertebrado se infecta pela ingestão de sangue contaminado com tripomastigotas sangüíneos. Após ingestão, os tripomastigotas atingem o estômago e se diferenciam em epimastigotas. No intestino médio do vetor as formas epimastigotas se multiplicam e, após cerca de 3 a 4 semanas, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que podem então ser encontrados na porção final do intestino (*cf.* Brener 1973; Tanowitz *et al.*, 1992; Zingales e Colli, 1985). Os epimastigotas podem ser cultivados em meios axênicos não definidos, entre os quais o mais amplamente utilizado tem sido o LIT (Castellani *et al.*, 1967). Em condições especiais de cultivo os epimastigotas podem se diferenciar em tripomastigotas metacíclicos (Contreras *et al.*, 1985).

As formas tripomastigotas podem ser obtidas a partir da diferenciação de epimastigotas em meios de cultura axênico (tripomastigotas derivados de meio axênico), de células em cultura (tripomastigotas de cultura de tecido) ou do sangue de animais infectados (tripomastigotas sangüíneos). Embora esses parasitas, obtidos de diferentes meios, sejam morfollogicamente similares, é possível que apresentem variações fisiológicas e de patogenicidade (Zingales e Colli, 1985). Desta forma, conclusões experimentais obtidas com um tipo de tripomastigota não deveriam ser generalizadas para os outros tipos sem prévia demonstração experimental.

1.1.2. Epidemiologia

A via de transmissão pelo vetor é epidemiologicamente a mais importante sendo responsável por cerca de 80% dos casos (Dias, 1987). O *T. cruzi* é transmitido por insetos hemípteros da família Reduviidae, subfamília Triatominae, conhecidos genérica e

popularmente com os nomes de "barbeiro", "chupão" e "chupança" (cf. Wendel & Brener, 1992). As principais espécies do vetor implicadas na transmissão da doença de Chagas são o *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* (cf. Zingales e Colli, 1985). O barbeiro está presente em uma faixa extensa das Américas, compreendida entre as latitudes 40°N a 46°S (Schofield, 1985). Os reservatórios domésticos e silvestres do parasita são representados por camundongos, ratos, coelhos, hamsters, cobaias, marsupiais e cães. Por outro lado, aves e anfíbios são refratários à infecção (Brener, 1973). Além disto, mamíferos grandes como vacas, cavalos e antas não são suscetíveis, enquanto que suínos, ovinos e caprinos apresentam baixos índices de parasitemia (Dias, 1992). Esses reservatórios estabelecem dois tipos de ciclos: o doméstico e o silvestre. No ciclo silvestre há um equilíbrio ecológico no qual os reservatórios não são muito afetados pela doença. A ocupação desordenada do ambiente pelo homem e animais domésticos pode levar a um desequilíbrio, estabelecendo uma domiciliação dos vetores e uma proximidade física entre os reservatórios doméstico e silvestre. Nesse caso podem-se estabelecer relações entre os dois ciclos. No ciclo doméstico propriamente dito participam como reservatórios os humanos e animais como cães, gatos e roedores domésticos.

A transfusão sangüínea é uma outra via importante de transmissão da doença de Chagas. Nos Estados Unidos, onde não há relatos de transmissão por barbeiros, a transfusão tornou-se um problema preocupante a partir das correntes migratórias originárias do México, da América Central e do Sul (cf. Tanowitz *et al.*, 1992). Um problema análogo têm ocorrido nas grandes cidades brasileiras, que têm recebido o influxo de populações vindas de áreas rurais endêmicas. Esses migrantes têm aumentado a transmissão por transfusão sangüínea, que atinge cerca de 10.000 a 20.000 novos casos a cada ano (Dias, 1987).

A forma de contágio congênita, embora minoritária do ponto de vista epidemiológico, apresenta uma importância social nas regiões endêmicas. No Brasil admite-se um risco de cerca de 1% das crianças de mães chagásicas adquirirem a doença por essa via (Dias, 1987), o que resulta em 8.000 novos casos nas áreas endêmicas (Dias, 1992). Outras formas de contágio menos freqüentes envolvem o aleitamento, transplante de órgãos e acidentes de laboratório. As formas tripomastigotas têm a capacidade de penetrar membranas mucosas, tornando a via oral teoricamente possível. De fato, há vários relatos de possíveis contaminações orais. Um dos casos envolveu um grupo de 28 pessoas em Catolé do Rocha, Paraíba, que teriam se infectado simultaneamente, em uma festa, pela ingestão de caldo de cana supostamente contaminado com barbeiros esmagados ou com secreções de gambás (Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991).

1.1.3. Fases e formas clínicas da doença de Chagas

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas distinguíveis: a aguda e a crônica. Após a penetração do parasita ocorre uma reação inflamatória aguda na porta de entrada, denominada chagoma. A seguir estabelece-se uma linfadenopatia focal e ciclos de multiplicação do parasita. Sintomas mais graves podem surgir de 7 a 14 dias pós-infecção. Um edema periorbital unilateral e indolor (sinal de Romana), febre, hepatoesplenomegalia, náuseas, vômitos, diarreias, irritação das meninges também podem ocorrer. Desenvolve-se também uma miocardite de grau variável, podendo apresentar necrose miocitolítica, parasitismos de fibras, alterações eletrocardiográficas. Nessa fase podem ser encontrados tripomastigotas no sangue periférico e líquido cerebrospinal. Nos pacientes que morrem, encontram-se amastigotas em biópsias de tecidos cardíaco e de músculos liso e esquelético (Tanowitz *et al.*, 1992). A parasitemia é alta e pode durar de 1 a 2 meses. Em cerca de 2 a 8% dos indivíduos verifica-se uma fase aguda inaparente (Brener, 1987).

Devido a respostas imunológicas e um equilíbrio na relação parasita-hospedeiro, a parasitemia na fase crônica é muito baixa (Brener, 1973). Estabelece-se uma resposta protetora com anticorpos líticos desenvolvidos contra tripomastigotas vivos e anticorpos não protetores detectados com antígenos ou com parasitas fixados. Esse anticorpos protetores mediarão a lise por complemento, citotoxicidade e fagocitose. Os parasitas são dificilmente encontrados na circulação, sendo necessário proceder-se a um xenodiagnóstico ou hemocultura para sua detecção (Brener, 1987). O prognóstico para os pacientes que atingem a fase crônica é imprevisível. Cerca de 50 a 60% dos pacientes não apresentam quadro clínico por longos períodos de tempo ou mesmo por toda a vida, caracterizando o que se denomina de "forma indeterminada" da doença de Chagas.

Cerca de 20 a 30% dos pacientes desenvolvem entre 10 a 20 anos pós-infecção uma forma "cardíaca" caracterizada por uma miocardiopatia de severidade variável. Nesse caso verificam-se alterações eletrocardiográficas, especialmente relacionadas à formação e condução do impulso nervoso. Há um processo longo e progressivo de fibrose e destruição de gânglios parassimpáticos (*cf.* Brener, 1987; Andrade, 1991). A falha cardíaca pode levar a uma morte súbita e, freqüentemente, se observa um aneurisma apical em um ou nos dois ventrículos (Rassi *et al.*, 1992). Estima-se que cerca de 3% dos pacientes ao ano se convertam da forma indeterminada para a forma cardíaca (Brener, 1987).

Entre 8 a 10% dos indivíduos apresentam uma forma clínica "digestiva", caracterizada por dilatações patológicas de esôfago e/ou cólon (Brener, 1987). Na forma digestiva há uma perda gradativa de neurônios nos plexos intestinais. Nos casos de megacólon observa-se uma perda de até 50% dos neurônios, uma dilatação sigmoideal ou geral do órgão, levando a sintomas de constipação, úlceras e desenvolvimento de fecalomas. Cerca de 5% da massa do tecido esofágico é composta pelo plexo mioentérico. A

degeneração neuronal do sistema nervoso intrínseco compromete a coordenação motora do trato digestivo. Observa-se uma dilatação do órgão com contrações peristálticas retardadas e disfunção do cárdia, o que acarreta uma disfagia, regurgitação, eructação, tosse e até mesmo uma pneumonia de aspiração (Brener, 1987; Tanowitz *et al.*, 1992). Também podem ser encontradas lesões no estômago, vesícula biliar e intestino delgado. Alguns pacientes apresentam ainda formas mistas.

Interessantemente parece haver uma variabilidade geográfica quanto à prevalência das formas clínicas. Enquanto no Brasil cerca de 10% dos pacientes apresentam esofagopatia, essa forma clínica não é praticamente observada na Venezuela (Brener, 1987). Uma vez que as lesões da fase crônica só aparecem muitos anos após a infecção e os parasitas estão presentes em quantidades muito reduzidas, acredita-se que a patogênese observada não seja provocada por uma agressão direta do parasita, mas devida à geração de uma resposta autoimune (Brener, 1982; Andrade, 1991). Há duas grandes correntes de pensamento quanto à origem da autoimunidade. A primeira preconiza que a autoimunidade seja originária da presença de epitopos de reatividade cruzada (mimetismo antigênico). A outra linha afirma que a ativação policlonal que ocorre durante a fase aguda poderia liberar clones "anti-self" que persistiriam por longos períodos de tempo, quebrando a tolerância (*cf.* Andrade, 1991).

1.1.4. Caracterização das cepas de *T. cruzi*

Com relação às características biológicas das cepas, é interessante mencionar aquelas referentes às cepas de *T. cruzi* consideradas "polares": Y e CL. A cepa Y foi isolada de um paciente em fase aguda da doença de Chagas (Silva & Nussenzweig, 1953) enquanto a CL foi obtida a partir do vetor *Triatoma infestans* coletado em uma casa e infectado naturalmente (Brener & Chiari, 1963). As duas cepas apresentam diferentes comportamentos biológicos frente a uma série de parâmetros (*cf.* Brener, 1980). Em ensaios de aglutinação, parasitas da cepa Y aglutinam na presença de anticorpos anti-CL e anti-Y, enquanto que a cepa CL não é aglutinada por nenhum desses soros. Camundongos imunizados passivamente com anticorpos contra as cepas Y e CL demonstram menores índices de parasitemia e mortalidade quando desafiados com parasitas da cepa Y, enquanto que com a CL não se observam diferenças em relação ao grupo controle. Com relação à lise mediada por complemento humano, a cepa Y é sensível e a CL resistente. Melo & Brener (1978) realizaram infecções comparativas entre as cepas Y, CL, Berenice e ABC em camundongos. As cepas Y e Berenice apresentaram o mesmo padrão de parasitemia, com um pequeno pico no 5º dia, um aumento repentino no 7º dia e uma posterior queda. A cepa ABC apresentou um declínio mais lento e um longo período de infecção, enquanto a cepa CL apresentou uma parasitemia gradual e crescente. Com relação ao tropismo, foi verificado

um acúmulo muito grande de parasitas da cepa Y no baço, com pico no 7º e 8º dias, enquanto a cepa CL praticamente não invadiu esse órgão. O mesmo resultado foi observado para as células de Kuppfer do fígado. Por outro lado, a presença de pseudocistos no coração e músculos esqueléticos foi muito baixo nas cepas Y e Berenice e gradualmente crescente com as cepas CL e ABC. O tropismo pela musculatura lisa foi relativamente baixo nas cepas Y e CL e alto com ABC e Berenice. Em virtude do tropismo da cepa Y por células fagocitárias de baço, fígado e medula óssea, ou seja, células do sistema monocítico fagocitário, ela é denominada "macrofagotrópica". Por outro lado, a cepa CL, que prefere penetrar células da musculatura cardíaca e esquelética, é considerada "miotrópica" (Melo & Brener, 1978; Brener, 1980).

O *T. cruzi* apresenta uma heterogeneidade muito grande entre os diferentes isolados obtidos de pacientes, bem como de vetores e reservatórios. Cada isolado de *T. cruzi* é considerado como uma cepa. As diferentes formas clínicas da doença levaram pesquisadores a tentar encontrar uma correlação entre características bioquímicas das cepas e as formas clínicas. A classificação de cepas em grupos denominados zimodemas foi baseada na caracterização dos organismos em função da mobilidade eletroforética de suas isoenzimas. Entretanto, em diferentes zimodemas isolados de casos agudos não se observaram diferenças clínicas posteriores, e nem diferentes resistências a quimioterápicos (Miles & Cibulskis, 1986). Também se verificou que as cepas isoladas podem conter uma mistura heterogênea de zimodemas (infecção mista), a qual pode se modificar após crescimentos seriados *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, as características dos zimodemas são mantidas estavelmente em populações clonais.

Tibayrenc *et al.* (1986) realizaram um estudo abrangente de padrões isoenzímicos envolvendo 14 enzimas diferentes e 121 estoques de *T. cruzi*. A classificação previamente estabelecida de 3 zimodemas (Miles & Cibulskis, 1986) passou a ter 43 grupos de isoenzimas. A maior parte das cepas demonstrou variações genéticas, indicando uma substancial divergência. O estudo dessas cepas isoenzímicas revelou um padrão de heterozigose, levando à conclusão que o parasita é diplóide. Essa heterozigose se mostrou fixa em vários *loci* examinados e estável ao longo de gerações, o que é incompatível com o padrão de segregação Mendeliana. Esse dado, aliado ao fato de muitos genótipos teóricos não estarem presentes na população de parasitas e da existência de um forte desequilíbrio de "linkage" para alguns *loci*, levaram à conclusão de que a recombinação sexual, se não totalmente ausente, é ao menos severamente restrita em *T. cruzi* (Tibayrenc & Ayala, 1987). A população de *T. cruzi* seria portanto complexa e teria um padrão multiclinal. A alta heterogeneidade bioquímica das diferentes cepas isoladas é compatível com uma evolução clonal remota seguida de uma evolução independente dos múltiplos clones (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc & Ayala, 1987). A partir do estudo de diferentes organismos, Tibayrenc *et al.* (1990) propuseram generalizar a teoria de reprodução clonal para os demais

protozoários parasitas, baseados no fato que a segregação e recombinação, características de reprodução sexuada, são aparentemente raros nesses protozoários.

Em outra forma de classificação, os grupos, denominados esquizodemas, foram caracterizados em função dos perfis eletroforéticos obtidos por digestões de kDNA (DNA de cinetoplasto) com enzimas de restrição (cf. Morel *et al.*, 1986). Novamente não foram encontradas evidências de que determinados esquizodemas estivessem associados a alguma forma clínica da doença. Entretanto, resultados interessantes demonstraram que cepas isoladas podem conter mais de uma subpopulação de parasitas. Além disso foi verificado que cepas cultivadas em diferentes laboratórios, por muito tempo, podem apresentar diferentes perfis de esquizodemas, indicando contaminações e/ou seleção de uma subpopulação particular de *T. cruzi*. De fato, os autores demonstraram, por infecções com populações mistas, que essa seleção também pode ocorrer *in vivo*.

O conjunto dos dados obtidos pelo estudo de zimodemas e esquizodemas parece indicar que a associação direta de uma cepa com uma dada forma clínica da doença não seja adequada. Uma subpopulação minoritária de um isolado poderia ser a responsável pelos sintomas clínicos observados e ser negativamente selecionada após o cultivo dos parasitas. Embora os zimodemas e esquizodemas obtidos a partir de subpopulações clonadas de diferentes cepas apresentem uma grande heterogeneidade, não se observam grandes variações nos perfis de suas proteínas de superfície (cf. Zingales e Colli, 1985). Entretanto, esse dado não exclui a possibilidade de haver pequenas variações não detectadas, porém de alta importância em termos de consequências clínicas. Um outro aspecto que tem de ser considerado é o fato de que as características clínicas de uma cepa podem ter pouco ou nenhuma correlação com as características bioquímicas analisadas até o momento (Tibayrenc *et al.*, 1988). As propriedades clínicas de uma cepa poderiam ter uma determinação genética independente daquela responsável pelas características bioquímicas. Outra hipótese é de que as propriedades clínicas e biológicas podem ser o resultado de diferentes pressões seletivas em diferentes ambientes e assim, poderiam não ter correlação com as propriedades bioquímicas. De acordo com os autores, como as hipóteses acima não são mutuamente exclusivas, poderiam existir algumas propriedades clínicas correlacionadas com a classificação bioquímica e outras não.

1.2. Diagnóstico da doença de Chagas

O diagnóstico da doença de Chagas oferece diferentes dificuldades dependendo da fase da doença na qual se encontra o paciente. Na fase aguda a parasitemia é alta,

permitindo a detecção de parasitas em exames diretos de sangue fresco. O xenodiagnóstico e a hemocultura também são frequentemente empregados. Por outro lado, na fase crônica a parasitemia torna-se muito baixa e o diagnóstico tem de ser feito principalmente por sorologia.

1.2.1. Detecção parasitológica

O diagnóstico parasitológico na fase aguda, devido à alta parasitemia, pode ser realizado por observação microscópica a partir de amostras de sangue fresco ou de parasitas fixados e corados com Giemsa. A amostra de sangue também pode ser centrifugada (microhematócrito) para aumentar a concentração de parasitas e, conseqüentemente, a chance de detecção (cf. Chiari, 1992).

Para o xenodiagnóstico criam-se barbeiros em laboratório, alimentados com sangue de aves, que são refratárias à infecção por *T. cruzi*. Cerca de 40 barbeiros (fase de ninfa), separados em grupos de 10 e colocados em caixas, são utilizados para o exame. As caixas são colocadas sobre a pele do paciente que sofre múltiplas picadas. Os barbeiros, após cerca de 30 a 60 dias, têm o seu conteúdo intestinal e fecal examinado ou utilizado para cultivo em meios de cultura. Esse teste, além de ser desagradável para o paciente, apresenta uma baixa sensibilidade, da ordem de 50%. Por essa razão, e especialmente na fase crônica, deve ser repetido várias vezes para a obtenção de resultados mais confiáveis. Outro problema é que alguns pacientes apresentam reações cutâneas às picadas dos barbeiros. Nesses casos pode-se coletar o sangue com seringa e anticoagulante e alimentar os vetores em laboratório.

Outro método de diagnóstico parasitológico é a hemocultura. Nesse caso o sangue do paciente é coletado e utilizado para inocular meios de cultura. Há algumas variações nas quais consegue-se enriquecer a amostra com parasitas através de etapas de centrifugação. A sensibilidade do método é semelhante àquela do xenodiagnóstico e dados mais confiáveis são obtidos mediante repetições do teste e/ou sua realização concomitante com o xenodiagnóstico. A baixa parasitemia da fase crônica torna ambas as técnicas pouco sensíveis. Chiari e Brener (1966) compararam os resultados de xenodiagnóstico e hemocultura com o teste de fixação de complemento. Dos 35 soros de pacientes chagásicos em fase crônica, positivos na reação de fixação de complemento, 31,4% foram detectados pelo xenodiagnóstico, 25,7% pela hemocultura e 42,8% pelo uso conjunto de ambas as técnicas.

Uma alternativa promissora para a detecção parasitológica surgiu na segunda metade da década de 80 com o desenvolvimento da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). A existência de DNA repetitivo e abundante tanto no núcleo (González *et al.*, 1984) como no cinetoplasto (Simpson, 1987) do *T. cruzi* permite o desenvolvimento de

métodos de detecção e caracterização do parasita por sondas de DNA. O kDNA de *T. cruzi* apresenta 5.000-10.000 minicírculos de 1,42 kb, os quais contêm quatro repetições de 120 pb, conservadas entre as diferenças cepas (Degraeve *et al.*, 1988). Utilizando iniciadores da região conservada das repetições, Sturm *et al.* (1989) desenvolveram um teste de PCR que permitiu a detecção de 0,015 fg de DNA molde (equivalente a 0,1% do conteúdo de minicírculos de um parasita) ou ainda de 10 tripomastigotas em 100 µL de sangue. Foi verificado que esse iniciadores não amplificavam nenhum produto a partir de DNA de *T. rangeli* ou de *Leishmania*. Uma das dificuldades de aplicação do PCR no diagnóstico da doença de Chagas seria a degradação do DNA nas amostras de sangue. Neste sentido, Avila *et al.* (1991) desenvolveram um sistema de conservação das amostras utilizando guanidina e EDTA, que manteve a estabilidade do DNA a 37°C por pelo menos um mês. Além disso, esses autores procederam a uma clivagem química da malha de kDNA com 1,10 fenantrolina-Cu⁺², linearizando os minicírculos e permitindo uma melhor distribuição dessas moléculas nos lisados. Utilizando os mesmo iniciadores descritos por Sturm *et al.* (1991), o limiar de detecção do teste passou a ser de um parasita em 20 mL de sangue. Esse teste foi aplicado em um painel de 114 soros de pacientes chagásicos e não chagásicos, comparando-se os resultados com testes sorológicos e de xenodiagnóstico. Todas as amostras positivas nos testes sorológicos e de xenodiagnóstico também foram positivas no PCR (Avila *et al.*, 1993). Três amostras negativas na sorologia foram positivas no PCR. Recentemente, Wincker *et al.* (1994) propuseram um procedimento simples de linearização dos minicírculos, utilizando fervura, seguido de PCR. Os autores testaram o método em um total de 100 soros de pacientes e verificaram uma sensibilidade de 96,5% em comparação com testes sorológicos. Além disso, 21 pacientes com xenodiagnóstico negativo e 4 com sorologia duvidosa foram positivos no PCR, indicando que este método pode ser um bom teste complementar à sorologia, além de ser a técnica mais sensível de detecção de parasitas na fase crônica da doença de Chagas.

A utilização de PCR para a detecção de DNA nuclear foi descrita por Moser *et al.* (1991) utilizando um elemento repetitivo de 188 pb de DNA de minisatélite e que apresenta um número de cópias 1,8 vezes maior do que o dos minicírculos. A reação apresentou uma sensibilidade de 8 parasitas em 100 µL de sangue, sem amplificação de DNA humano ou de *Leishmania* e tripanossomas africanos. Esse teste também pode ser realizado a partir de soros, o que diminui a manipulação e facilita o transporte das amostras (Russomando *et al.* (1992). Diaz *et al.* (1992) também utilizaram sondas de minisatélite e obtiveram uma sensibilidade de 1 parasita em 10 mL de sangue. Para reduzir o efeito inibitório do sangue na reação de PCR, esses autores lisaram as células com NP-40 e extraíram o DNA a partir dos núcleos. Outra sequência nuclear, proposta para o diagnóstico da doença de Chagas é o elemento E13 (Requena *et al.*, 1992), que apresenta 10.000 a 20.000 cópias por genoma e um tamanho de 1025 pb. Segundo os autores, utilizando a técnica de PCR com dois

iniciadores conservados, foi possível detectar 1/30 de uma célula do parasita. Como o elemento El3 não está presente em *Leishmania* e *T. rangeli*, poderia ser utilizado para o diagnóstico específico de *T. cruzi*.

Finalmente, foi proposto um teste de PCR utilizando como sonda uma sequência de cerca de 100 pb da subunidade 24S α de rRNA (Arruda *et al.*, 1990), específica de *T. cruzi* (Souto & Zingales, 1993). Essa sequência está presente em cerca de 114 genes nucleares e cerca de 60.000 cópias de rRNA por célula. A técnica proposta para a amplificação desta sequência consiste em uma transcrição reversa acoplada ao PCR, obtendo-se um limiar de detecção de 0,1% do ácido nucléico total de uma célula do parasita. Não foi verificada uma reatividade cruzada com diferentes espécies de *Leishmania* e com *T. rangeli*. Entretanto, um problema complicador que se observa para a aplicação desta abordagem para o diagnóstico parasitológico da doença de Chagas é a extrema labilidade dos RNAs-alvo no sangue de indivíduos infectados (Souto & Zingales - comunicação pessoal). Um dado interessante observado pelos autores é o dimorfismo da sequência alvo entre as diferentes cepas de *T. cruzi*. Tal resultado parece indicar que essa sequência ribossomal, além de poder ser utilizada na detecção do parasita, pode também ser útil na tipagem de cepas e estudos de variações intraespecíficas no *T. cruzi*.

Os resultados apresentados acima parecem indicar que a técnica de PCR pode se tornar, com alguns aprimoramentos, uma alternativa viável e sensível para a detecção de *T. cruzi*, especialmente na fase crônica, onde há uma baixa parasitemia. Os volumes de 10-20 mL necessários para o teste são semelhantes àqueles utilizados em xenodiagnóstico (*cf.* Avila *et al.*, 1991). É provável que avanços técnicos na manipulação das amostras e extração do DNA/RNA aumentem ainda mais a sensibilidade do método.

1.2.2. Diagnóstico sorológico

1.2.2.1. Antígenos complexos

O diagnóstico sorológico é realizado principalmente na fase crônica, na qual a parasitemia é muito baixa e os sintomas clínicos nem sempre perceptíveis. Desde a descoberta da doença de Chagas várias técnicas de diagnóstico sorológico foram desenvolvidas.

A fixação do complemento, também conhecida como reação de Guerreiro e Machado, foi proposta em 1913 como alternativa ao xenodiagnóstico na fase crônica da doença (*cf.* Ferreira, 1992). Esse teste empregava como antígeno um extrato aquoso de baço de cães pesadamente infectados com *T. cruzi*. Devido à sua composição complexa, esse "antígeno" apresentava problemas relativos à estabilidade, especificidade e poder fixador (*cf.* Muniz & Freitas, 1944). Embora a fixação do complemento tenha sido aprimorada ao longo dos anos,

permanece sendo uma técnica bastante complexa, uma vez que envolve uma grande quantidade de reagentes além do soro teste: antígeno, complemento, hemáceas e hemolisina. Cada um desses reagentes pode apresentar variabilidades em diferentes lotes e laboratórios, exigindo uma série de controles que tornam esta técnica tediosa e de difícil padronização.

Uma alternativa à fixação de complemento foi proposta por Muniz e Freitas (1944), que utilizaram parasitas inteiros e fixados em um ensaio de aglutinação direta. Uma dificuldade desse ensaio é que na dependência do tipo de cultivo, pode ocorrer aglutinação espontânea dos parasitas. Muniz e Freitas (1944) compararam a aglutinação direta com a fixação do complemento e verificaram uma alta concordância entre os dois métodos. Entretanto, foi verificado que soros chagásicos agudos eram capazes de promover aglutinação de *Leishmania*, sugerindo que podem ocorrer reações cruzadas entre esses dois parasitas.

Outro teste muito empregado em rotinas de laboratórios clínicos é a hemaglutinação passiva. Nesse teste as hemáceas são tratadas com um agente acoplante como o ácido tânico e revestidas com extratos de *T. cruzi*. A presença de anticorpos no soro da amostra é evidenciada pela aglutinação das hemáceas. Neal & Miles (1970) utilizando hemáceas de carneiro sensibilizadas com extratos de epimastigotas da cepa Y, adaptaram o método com o uso de amostras de sangue obtidas por punção digital e secas em papel de filtro. Foi demonstrado que os filtros mantêm os anticorpos estáveis e que altos títulos são detectados mesmo após meses de armazenamento. Entretanto, foram observadas reações cruzadas com *Leishmania*. Camargo *et al.* (1973) propuseram um método no qual as hemáceas são sensibilizadas, preservadas com aldeído e estocadas na forma liofilizada. Os autores analisaram 1.430 soros e verificaram uma concordância de 99,1% com a fixação de complemento e 99,6% com a imunofluorescência. Também observaram que as hemáceas se mantêm estáveis por pelo menos um ano a 4°C.

O teste de floculação emprega fragmentos de parasitas liofilizados e apresenta alta sensibilidade, inclusive em casos agudos, porém resultados falsos-positivos foram observados com soros de pacientes com outras doenças como leishmaniose, paracoccidiose e toxoplasmose aguda (*cf.* Ferreira, 1992). Além disso seu alto custo é alto.

A imunofluorescência indireta é um dos testes de referência na sorologia da fase crônica da doença de Chagas, sendo também capaz de detectar anticorpos IgM na fase aguda (*cf.* Ferreira, 1992). Nesse caso, são utilizadas formas epimastigotas fixadas em lâminas, incubadas com o soro teste, lavadas e tratadas com um anticorpo anti-IgG ou anti-IgM, conjugado à fluoresceína. As amostras de sangue também podem ser coletadas e secas em papel de filtro para, posteriormente se eluir e testar a reatividade dos anticorpos (Souza & Camargo, 1966). Nesse sistema, os filtros podem ser mantidos por até um mês à temperatura ambiente sem alteração da reatividade. A imunofluorescência apresenta uma

alta concordância com a reação de fixação do complemento, entretanto verifica-se uma reatividade cruzada com soros de pacientes com leishmaniose, tuberculose e lepra (Camargo, 1966). Buscando diminuir a reatividade cruzada entre *T. cruzi* e *Leishmania*, Camargo & Rebonato (1969) verificaram que a absorção de soros de pacientes com doença de Chagas e leishmaniose com antígenos de *Leishmania* e *T. cruzi*, respectivamente, reduzia a reatividade heteróloga, sem afetar a sensibilidade de detecção. A partir desse resultado, propuseram um método de inibição da imunofluorescência inespecífica, pela adição de extratos heterólogos aos soros. Entretanto, esta abordagem é bastante trabalhosa não sendo adotada como rotina em laboratórios clínicos e bancos de sangue.

Visando a padronização de um teste de referência para o diagnóstico da doença de Chagas, Camargo *et al.* (1977) compararam os testes de fixação de complemento, imunofluorescência indireta, hemaglutinação e floculação, utilizando um total de 3.624 soros das regiões de Mambai - GO e São Paulo. Os autores verificaram que 97% dos soros apresentaram concordância total entre os quatro testes; 0,8% dos soros, considerados positivos, reagiram em 3 testes e 1,8% dos soros, considerados negativos, somente foram positivos em um dos testes. Um total de 0,4% dos soros tiveram reatividade com apenas dois testes, sendo considerados duvidosos. Esse resultado demonstra que, utilizando condições padronizadas, é possível obter uma alta concordância entre os diferentes testes de diagnóstico.

Outro teste utilizado em laboratórios clínicos é o ELISA, preparado a partir de antígenos de formas epimastigotas adsorvidos nos poços de microplacas. Sua grande vantagem é permitir a realização de múltiplos exames e uma leitura automática. Ferreira *et al.* (1991) padronizaram um ensaio de ELISA utilizando microplacas de 96 poços sensibilizadas com um extrato total de *T. cruzi* (bioELISA-cruzi - Biolab Diagnóstica S/A). O teste foi avaliado com 219 soros com diagnóstico clínico de doença de Chagas e 104 de outras doenças. Além disso, comparou-se o teste de ELISA com os testes de hemaglutinação e imunofluorescência, utilizando 1.325 soros. A sensibilidade observada foi superior a 99,5%. No entanto, em um total de 39 casos de leishmaniose, 15 soros reagiram positivamente. Um outro teste de ELISA comercial, desenvolvido pelos laboratórios Abbott (Pan *et al.*, 1992), foi avaliado com 1.392 amostras de soros do Brasil e Argentina. Os autores afirmam que o teste apresentou 100% de sensibilidade e especificidade, no entanto a natureza do antígeno empregado não é revelada.

Com exceção do teste acima, todos os outros testes sorológicos citados apresentam uma sensibilidade inferior a 100%. Isso ocorre porque medem os anticorpos dirigidos contra o parasita, o que depende da resposta individual de cada paciente. Além disso, diferentes cepas poderiam induzir diferentes especificidades nas populações de anticorpos. Um dos maiores problemas enfrentados nesses testes é o diagnóstico correto para soros que apresentam uma reatividade muito próxima do valor de corte ("cut off") previamente

estabelecido. Para bancos de sangue, onde se requer uma sensibilidade máxima, soros com diagnóstico duvidoso seriam automaticamente descartados. No entanto, também nesse caso, a execução de dois a três testes sorológicos distintos é recomendada.

Quando se considera o diagnóstico laboratorial de um paciente, o maior número possível de parâmetros deve ser avaliado antes de lhe atribuir um resultado positivo. São relatados casos em que há resultados sorológicos duvidosos para um ou mais testes, enquanto os sinais clínicos apontam para a existência de uma infecção chagásica. Esse aspecto deve ser especialmente considerado devido às graves consequências individuais e sociais que tal diagnóstico pode acarretar para o paciente. A existência de reações falso-positivas pode complicar essa situação, notadamente em áreas geográficas endêmicas para *T. rangeli* e *Leishmania*, dois protozoários que compartilham epitopos com *T. cruzi* (Afchain *et al.*, 1979). Conforme foi exposto acima, os diferentes testes que empregam extratos totais de *T. cruzi* apresentam reações cruzadas com soros de pacientes com leishmaniose (Muniz e Freitas, 1944; Neals & Miles, 1970; Camargo, 1966; Camargo & Rebonato, 1969; Ferreira *et al.* 1991). No caso de *T. rangeli* a situação é similar (Guhl *et al.*, 1985; Hudson *et al.*, 1988). Deve ser lembrado que *T. cruzi* e *T. rangeli* compartilham algumas áreas geográficas comuns na América Latina, apresentando a mesma gama de hospedeiros e, freqüentemente, os mesmos vetores.

Guhl *et al.* (1985) verificaram que soros de camundongo anti-*T. rangeli* apresentam uma reatividade cruzada significativa com *T. cruzi* em imunofluorescência, mas não em ELISA com lisado de epimastigotas. Em ensaios realizados com soros humanos de regiões endêmicas para os dois parasitas, foi verificado que a reatividade cruzada tende a ser unilateral, isto é, os soros anti-*T. cruzi* reconhecem *T. rangeli* com maior intensidade do que os soros anti-*T. rangeli* reconhecem *T. cruzi*. Utilizando os testes de ELISA e imunofluorescência em conjunto, os autores foram capazes de discernir os soros de pacientes com *T. cruzi*, *T. rangeli* ou com infecções mistas. Foi observado também que a GP90, uma glicoproteína de formas epimastigotas de *T. cruzi*, é específica para soros anti-*T. cruzi* em ensaios de ELISA. Hudson *et al.* (1988), utilizando ensaios de ELISA e imunofluorescência, observaram em soros de regiões endêmicas da Colômbia que 37% dos soros positivos para *T. cruzi* tinham anticorpos contra *T. rangeli*, o que pode significar uma reatividade cruzada ou uma infecção mista. Acredita-se que *T. rangeli* não seja patogênico para o homem, mas seu papel em infecções mistas ainda é desconhecido. De fato, camundongos imunizados com *T. rangeli* e infectados com *T. cruzi* apresentam uma parasitemia e taxa de mortalidade menores do que um grupo não imunizado (Basso *et al.*, 1991). Esse resultado sugere que infecções mistas poderiam levar a manifestações mais brandas da doença de Chagas (Guhl *et al.*, 1987). Essa hipótese, contudo, deve ser testada através de estudos longitudinais em populações de áreas endêmicas comuns aos dois parasitas e comparada com estudos em áreas afetadas só pelo *T. cruzi*.

Os testes de diagnóstico sorológico da doença de Chagas disponíveis atualmente no mercado, apesar de individualmente não atingirem 100% de sensibilidade podem, se usados conjuntamente, atingir marcas próximas desse valor e atender ao requerimento de bancos de sangue, onde a máxima sensibilidade é um fator primordial. Subsistem, entretanto, problemas referentes à especificidade, especialmente quanto a *T. rangeli* e *Leishmania*. Como esses parasitas compartilham uma grande porcentagem de seus epitopos com *T. cruzi*, o uso de extratos totais do parasita como antígeno em testes sorológicos é incompatível com a obtenção de especificidades altas. Em função disso, vários laboratórios procuraram estabelecer testes diagnósticos empregando antígenos definidos, seja diretamente purificados do *T. cruzi*, seja expressos em sistemas bacterianos, através de técnicas de DNA recombinante.

1.2.2.2. Antígenos purificados e recombinantes

Conforme discutido acima, a utilização de testes que empregam extratos totais do parasita podem ser satisfatórios em condições nas quais se exige a máxima sensibilidade, como em bancos de sangue. Nesse caso costuma-se reduzir os valores de limiar de reatividade ("cut off"), ainda que se obtenha uma menor especificidade, uma vez que é muito importante rejeitar a amostra de sangue suspeita. Estudos epidemiológicos requerem testes muito sensíveis e específicos e que também sejam baratos, práticos, de execução simples e que permitam o transporte da amostra do campo até o laboratório (Luquetti, 1990). Outra situação diz respeito à confirmação diagnóstica de um paciente clinicamente suspeito em que, ao lado de uma alta sensibilidade, requer-se também uma alta especificidade em virtude das implicações sociais que este diagnóstico pode acarretar para o paciente. Finalmente, o acompanhamento de pacientes tratados com quimioterápicos talvez seja a mais desafiadora situação de diagnóstico, uma vez que exige sensibilidade e especificidade muito altas, que atualmente só podem ser obtidas pelo uso conjunto de vários testes.

A utilização de testes compostos de antígenos definidos e puros visa atender o requerimento de alta especificidade. Embora alguns antígenos de *T. cruzi* testados para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas em laboratório tenham apresentado resultados promissores (Dragon *et al.*, 1985; Gazzinelli *et al.*, 1993), sua aplicação em larga escala apresenta dificuldades técnicas. Esses antígenos freqüentemente estão presentes em quantidades muito reduzidas no parasita, o que dificulta e encarece sua obtenção. A purificação de antígenos da forma tripomastigota exige o cultivo dessa forma infectante que, além do perigo da manipulação, requer uma cultura de células, o que torna esta abordagem inviável para grande parte dos laboratórios de regiões menos desenvolvidas.

O surgimento das técnicas de clonagem e expressão de antígenos em sistemas heterólogos abriu uma nova perspectiva para os testes sorológicos. A utilização de antígenos recombinantes puros poderia levar ao desenvolvimento de testes tão ou mais sensíveis que os convencionais, aliando uma maior especificidade. Além disso, sendo o antígeno produzido em bactérias em larga escala, não exige o cultivo do parasita. Vários grupos iniciaram a clonagem de antígenos *T. cruzi* a partir da segunda metade da década de 80 (Peterson *et al.*, 1986; Ibañez *et al.*, 1987; Beard *et al.*, 1988; Hoft *et al.*, 1989; Lafaille *et al.*, 1989; Takle *et al.*, 1989). Observou-se que uma fração significativa dos antígenos clonados apresentava como característica a presença de repetições seriadas de aminoácidos (Frasch *et al.*, 1991).

Várias proteínas clonadas revelaram alta homologia entre si, caracterizando famílias multigênicas, como foi observado com a neuraminidase/*trans*-sialidase (Pereira *et al.*, 1991; Kahn *et al.*, 1991; Tackle & Cross, 1991; Parodi *et al.*, 1992; Uemura *et al.*, 1992; Pollevick *et al.*, 1993; Ruef & Manning, 1993). A neuraminidase de *T. cruzi* apresenta um domínio enzimaticamente ativo e outro composto de repetições seriadas sem atividade enzimática, mas imunodominante (Cazzulo & Frasch, 1992; Campetella *et al.*, 1994). Situação semelhante ocorre com a cruzipaina, uma cisteína protease codificada por uma família de genes polimórficos (Eakin *et al.*, 1992; Campetella *et al.*, 1992; Cazzulo & Frasch, 1992) cuja proteína havia sido previamente caracterizada por Scharfstein *et al.* (1986) como GP57/51 e por Cazzulo *et al.* (1989).

Um total de 9 clones recombinantes foi isolado e caracterizado pelo grupo do Dr. Carlos Frasch (Ibañez *et al.*, 1987; Ibañez *et al.*, 1988). Todos os antígenos demonstraram a presença de repetições seriadas de diferentes tamanhos. O clone #7 corresponde a um antígeno polimórfico de 160 a 200 kDa, que é liberado para o meio de cultura pelo parasita. Quando os autores testaram a reatividade preferencial dos diferentes antígenos clonados com soros de pacientes em fase crônica e aguda, foi verificado que o antígeno #7 era majoritariamente reconhecido por soros agudos (Affranchino *et al.*, 1989). Devido a essas duas características, esse antígeno foi denominado SAPA ("shed acute-phase antigen"). O gene correspondente foi isolado e completamente seqüenciado (Pollevick *et al.*, 1991), apresentando alta homologia com a neuraminidase descrita por Pereira *et al.*, (1991).

O diagnóstico sorológico da fase aguda é dificultado pela baixa concentração de anticorpos da classe IgG. A detecção de IgM pode ser realizada alternativamente. No caso da transmissão congênita há a passagem *trans*-placentária de anticorpos das classes IgG, IgE e IgA, mas não de IgM. Desta forma, o diagnóstico sorológico em recém-nascidos pode ser efetuado investigando-se a especificidade de anticorpos da classe anti-IgM. Para a doença de Chagas a sensibilidade de detecção nestes casos é baixa. Reyes *et al.* (1990) testaram 10 soros de recém-nascidos infectados e observaram que 6 desses soros foram positivos no ensaio de ELISA e negativos na imunofluorescência indireta, utilizando conjugados anti-IgM.

Além disso, ao contrário do que se supunha, as mães que geraram crianças infectadas apresentaram reatividade com anticorpos da classe IgM, enquanto que aquelas que geraram crianças saudáveis não apresentaram reatividade de anticorpos IgM. Segundo os autores, esse resultado surpreendente poderia talvez ser atribuído a uma estimulação não específica do sistema imune materno em função da infecção fetal. Quando Reyes *et al.* (1990) testaram os soros dos recém-nascidos e das mães frente a diferentes antígenos recombinantes, foram evidenciadas diferenças específicas de reatividade entre os dois grupos. A análise de anticorpos IgG e IgM em 10 crianças infectadas demonstrou que 8 delas apresentavam reações específicas aos antígenos recombinantes de *T. cruzi*. O melhor antígeno de detecção foi o SAPA (Affranchino *et al.*, 1989), que reagiu com 7 dos soros de recém-nascidos (tanto por IgM como por IgG), mas não com os soros das respectivas mães. Esse resultado é particularmente interessante porque demonstra que poderia haver a produção de IgG específica pelo feto ainda na infecção uterina. Os autores propõem que a utilização de antígenos recombinantes poderia discernir especificamente as IgGs provenientes da mãe daquelas produzidas pela criança infectada.

Affranchino *et al.* (1989) testaram a reatividade preferencial dos diferentes antígenos clonados frente a soros da fase aguda e crônica. O antígeno #2 demonstrou ser amplamente reconhecido por soros de pacientes na fase crônica da doença. O gene correspondente foi totalmente seqüenciado (Buschiazzo *et al.*, 1992) e não revelou homologia com nenhuma proteína conhecida. O antígeno em questão apresenta no parasita um peso molecular de 160/140 kDa. Várias hipóteses foram levantadas para explicar a reatividade diferencial de antígenos clonados durante a fase aguda (SAPA) ou fase crônica (antígeno #2) da doença de Chagas (*cf.* Leguizamon *et al.*, 1991). Esta reatividade poderia ser decorrente da existência de sub-populações de parasitas, selecionadas pela resposta imune do hospedeiro; ou de alterações na expressão dos antígenos pelo parasita ao longo da infecção. Para testar essas hipóteses, Leguizamon *et al.* (1991) infectaram camundongos e analisaram os anticorpos induzidos na infecção, bem como os antígenos expressos pelos parasitas ao longo da infecção. Os autores verificaram que os parasitas induzem preferencialmente a produção de anticorpos dirigidos contra o antígeno SAPA na fase aguda, mas não contra os antígenos #1, #2, #13, #30 e #36. Por outro lado, foi verificado que os parasitas circulantes expressam todos esses antígenos. Conclui-se que as formas tripomastigotas expressam simultaneamente antígenos que são marcadores das fases aguda e crônica da doença de Chagas.

Levin *et al.* (1989) também isolaram vários clones recombinantes denominados JL-1, JL-5, JL-7, JL-8 e JL-9. Os clones JL-7, JL-8 e JL-9 são homólogos aos antígenos #1, #30 e #36, respectivamente, descritos por Ibañez *et al.* (1988). O antígeno JL-5 se mostrou promissor para o diagnóstico de pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas. De fato foi demonstrado que este antígeno apresenta homologia com a porção carboxi-terminal

da proteína P ribossomal humana. Essa sequência corresponde ao epitopo de reatividade cruzada determinado em casos de lúpus eritematoso sistêmico. Um peptídeo de 13 resíduos, denominado R-13, que contém esse epitopo, foi utilizado em ensaios de ELISA e reconhecido por 57% dos soros de chagásicos e 12% dos soros de pacientes com lúpus (Levin *et al.*, 1990). Esse epitopo pode, portanto, ser um marcador da presença de autoanticorpos, os quais podem ter um papel na patogênese da forma cardíaca da doença de Chagas. Outras proteínas P ribossomais também foram clonadas por esse grupo (Levin *et al.*, 1993) e por Skeiky *et al.* (1993), que também observaram a presença de reatividade cruzada entre anticorpos contra as proteínas P ribossomais de *T. cruzi* e proteínas P humanas.

O grupo do Dr. Samuel Goldenberg (FIOCRUZ - RJ) relatou o isolamento e caracterização de dois antígenos de *T. cruzi* (Lafaille *et al.*, 1989), denominados CRA ("cytoplasmic repetitive antigen") e FRA ("flagellar repetitive antigen"). CRA corresponde aos antígenos #30 descrito por Ibañez *et al.* (1988) e JL-8 de Levin *et al.* (1989), enquanto FRA é homólogo ao antígeno #1 de Ibañez *et al.* (1988) e JL-7 de Levin *et al.* (1989). Ambos os genes apresentam repetições seriadas, estão presentes em diferentes cepas do parasita e são polimórficos. Os dois antígenos foram subclonados no vetor pMSgt11 e expressos em fusão com β -galactosidase. Após clivagem com a protease Fator Xa, os polipeptídios foram testados em conjunto, no mesmo poço, em ensaios de ELISA (Almeida *et al.*, 1990; Krieger *et al.*, 1992). O teste foi realizado com 221 soros de chagásicos, 193 soros normais de áreas endêmicas, 49 soros negativos de bancos de sangue e 80 soros de pacientes com outras doenças. O uso combinado dos antígenos CRA e FRA resultou em uma sensibilidade e especificidade de 100%. Em comparação, um teste paralelo de ELISA, utilizando um extrato citossólico de parasitas, apresentou 12 resultados falso-positivos.

No laboratório do Dr. Franco da Silveira (Escola Paulista de Medicina) foram isolados dois antígenos com potencial de diagnóstico denominados A13 (Paranhos *et al.*, 1990) e H49 (Cotrim *et al.*, 1990). O antígeno H49 é homólogo aos antígenos FRA (Lafaille *et al.*, 1989), JL-7 (Levin *et al.*, 1989) e #1 (Ibañez *et al.*, 1988), descritos previamente por outros grupos. O antígeno correspondente a A13 tem 230 kDa e é encontrado em formas amastigotas e tripomastigotas, mas não em epimastigotas. Em ensaios de diagnóstico esse antígeno foi reconhecido por 91% dos soros de pacientes chagásicos agudos e crônicos (Franco da Silveira *et al.*, 1990). Não foram observadas reações inespecíficas com soros de pacientes com outras afecções. O antígeno H49 obteve uma sensibilidade ainda melhor, sendo reconhecido por 99% dos soros de pacientes crônicos. Esse antígeno foi posteriormente subclonado no vetor pGEX e expresso. A proteína de fusão foi clivada com Fator Xa e o polipeptídeo testado em ensaio de ELISA (Paranhos-Bacalla *et al.*, 1994) com 296 soros, incluindo pacientes chagásicos em diferentes fases da doença e pacientes com outras afecções. O desempenho do antígeno foi inferior ao obtido anteriormente,

apresentando sensibilidade de 84% com pacientes crônicos, 58% com agudos e 56% com soros de casos congênitos. Entretanto, a especificidade do antígeno foi de 100%, indicando que pode ser utilizado em conjunto com outros antígenos para o desenvolvimento de um teste sensível e altamente específico para a doença de Chagas.

Nosso grupo também clonou e expressou dois antígenos recombinantes denominados B12 e B13, conforme será relatado no presente trabalho. O antígeno B13, homólogo ao clone #2 de Ibañez *et al.* (1988), apresentou um bom desempenho, com 97% de sensibilidade e especificidade (Gruber & Zingales, 1993). O antígeno B12, que não apresenta homologia com nenhum dos outros antígenos clonados, mostrou uma sensibilidade de 83% e especificidade de 78% (Zingales *et al.*, 1990; Gruber & Zingales, 1993).

Em 1990 a Organização Mundial da Saúde decidiu testar a reatividade de várias proteínas recombinantes e antígenos purificados de *T. cruzi* (Moncayo & Luquetti, 1990). Para isso, escolheu um laboratório de referência em Goiás, o qual selecionou um painel de 50 soros, incluindo pacientes chagásicos, controles normais e pacientes com outras parasitoses (Luquetti, 1990). Esses soros foram codificados e distribuídos a um total de nove laboratórios da Argentina, Brasil, Colômbia e Estados Unidos. Cada laboratório teve a liberdade de padronizar um ensaio de sua escolha para testar seus antígenos. A análise estatística foi feita utilizando-se o índice (κ) kappa (Cohen, 1960). Os antígenos que apresentaram os melhores desempenhos foram o CRA ($\kappa=1,0$); B13 ($\kappa=0,96$), H49 ($\kappa=0,92$), JL-7 ($\kappa=0,88$) e A13 ($\kappa=0,88$). Esse resultado demonstrou a viabilidade de se empregar antígenos puros, especialmente recombinantes, para a composição de testes diagnósticos para a doença de Chagas.

Os resultados promissores revelados por esse estudo multicêntrico encorajaram alguns grupos a elaborar testes de ELISA empregando como antígenos, peptídios sintéticos derivados das seqüências dos antígenos recombinantes (Vergara *et al.*, 1991; Vergara *et al.*, 1992; Burns *et al.*, 1992; Peralta *et al.*, 1994). Os resultados obtidos por esses grupos serão melhor discutidos no item 4.2.

1.3. Formas de controle da doença de Chagas

1.3.1. Eliminação do vetor

A inexistência de uma vacina e os resultados ainda preliminares sobre a eficiência da quimioterapia torna a eliminação dos vetores transmissores um dos principais campos de atuação no controle da doença de Chagas. Preconiza-se que os programas de erradicação do vetor tenham três fases de atuação: preparatória, de ataque e de vigilância (Dias, 1987; Schofield, 1985). Na fase preparatória faz-se um mapeamento das regiões atingidas, uma

amostragem de barbeiros domiciliados e de habitats peri-domiciliares, avaliação dos custos e de recursos humanos e materiais a serem empregados. Na fase de ataque procede-se à borrifação de todas as casas, infestadas ou não, com uma nova borrifação das infestadas, após 3 a 6 meses. Essa fase é mantida com avaliações periódicas e borrifações das casas ainda infestadas, até reduzir a infestação da região a menos de 5% e não haver mais casas infestadas. Na fase de vigilância faz-se uma amostragem periódica das casas por pessoal especializado e por equipes voluntárias locais. Além disso, instalam-se postos voluntários de coordenação de coleta, denúncias e identificação de possíveis reinfestações (cf. Dias, 1987).

O programa brasileiro, realizado de 1984 a 1986 conseguiu reduzir o número de municípios afetados de 2.234 para 186 (74% de redução da área endêmica) e, em 1987, 23% dos municípios já haviam entrado na fase de vigilância (cf. Dias, 1987). No Brasil o BHC (hexacloreto de benzeno) foi utilizado em larga escala no programa de erradicação do vetor, sendo posteriormente substituído por malathion e piretróides. Os piretróides, por serem menos irritantes e inodoros e por apresentar maior efeito residual são atualmente mais recomendados. Embora essas substâncias sejam mais caras, as menores doses empregadas equiparam o custo final com o do BHC (cf. Dias, 1987).

1.3.2. Quimioterapia

Apesar da doença de Chagas ter sido descoberta há mais de oito décadas, ainda não existem quimioterápicos eficientes para o tratamento e cura de pacientes, especialmente daqueles na fase crônica. Em parte isso se deve à grande resistência do *T. cruzi* aos agentes quimioterápicos utilizados em outras doenças parasitárias (cf. Tanowitz *et al.*, 1992). O grande desafio da quimioterapia é a destruição dos parasitas intracelulares sem efeitos prejudiciais às próprias células do hospedeiro. Vários compostos químicos foram testados ao longo dos anos e entre eles, o nifurtimox (Lampit® - Bayer) e o benzonidazol (Rochagan® - Roche) são os que apresentaram os melhores efeitos. Infecções acidentais em laboratórios e alguns casos agudos foram tratados com sucesso. Essas drogas diminuem a severidade da fase aguda, entretanto na fase crônica seus efeitos são ainda objeto de especulação. Além disso, esses quimioterápicos têm de ser utilizados por longos períodos de tempo e apresentam efeitos colaterais intensos, o que inviabiliza seu uso em larga escala. Há também relatos de uma ação tumorigênica em experimentos realizados em coelhos (Teixeira *et al.*, 1990a; 1990b).

As pesquisas atuais na área de quimioterapia estão voltadas para a caracterização de enzimas de *T. cruzi*, especialmente quanto ao seu mecanismo de ação e conformação do sítio ativo. O objetivo é desenvolver novas drogas especialmente desenhadas para uma inibição específica das enzimas de *T. cruzi*, sem apresentar efeitos nas enzimas

correspondentes do hospedeiro. Uma grande dificuldade que existe no desenvolvimento de novas drogas é a ausência de critérios de avaliação da cura. Embora na fase aguda possa se acompanhar a parasitemia, não há como se determinar com precisão uma cura parasitológica. Esse aspecto é particularmente mais grave na fase crônica, onde naturalmente há uma baixa parasitemia.

Krettli & Brener (1982) relataram que camundongos infectados com parasitas vivos desenvolvem anticorpos denominados "líticos", capazes de induzir a lise mediada por complemento. Por outro lado, animais imunizados com parasitas fixados somente produzem anticorpos detectáveis por sorologia convencional, sem capacidade "protetora". Pelo fato de os anticorpos "protetores" ou "líticos" somente serem produzidos sob a indução de parasitas vivos, Krettli *et al.* (1982) sugeriram que o desaparecimento de anticorpos "líticos" poderia ser utilizado como critério de cura dos pacientes. Uma crítica que pode ser feita a essa conclusão é de que a cura não deveria ser atribuída por um método sorológico, mas por diagnóstico parasitológico. No entanto, os métodos de detecção do parasita utilizados (xenodiagnóstico e hemocultura) não são suficientemente sensíveis para fornecer uma evidência incontestável da ausência de parasitas no paciente. O aprimoramento dos critérios de cura parasitológica é condição essencial para uma avaliação segura da eficácia de novas drogas a serem implementadas na terapia da doença de Chagas.

1.3.3. Vacinação

Uma vacina considerada ideal para a doença de Chagas deve apresentar várias características desejáveis. Primeiramente essa vacina deveria promover uma proteção total, impedindo a instalação de uma parasitemia e a conseqüente fase aguda da doença. A simples redução da severidade da fase aguda não seria aceitável porque poderia permitir o estabelecimento de uma fase crônica com as respectivas manifestações clínicas (Brener & Camargo, 1982; Brener, 1986). Essa vacina deveria ser, por questões de segurança, estéril. Além disso, não poderia induzir respostas autoimunes ou imunossupressoras. Várias composições de vacinas já foram testadas, incluindo parasitas vivos atenuados e proliferantes, parasitas vivos não proliferantes, parasitas mortos, frações celulares ou homogenatos e antígenos puros (*cf.* Brener & Camargo, 1982). Embora várias dessas vacinas tivessem conferido diferentes graus de proteção a desafios com parasitas vivos, seus efeitos em termos de geração de respostas autoimunes e possíveis danos reciduais são desconhecidos. A utilização de vacinas compostas de antígenos definidos poderia gerar melhores resultados. Nesse sentido, antígenos de superfície, envolvidos nos processos de adesão e interiorização do parasita na célula do hospedeiro, poderiam ser mais promissores. Entretanto, alguns resultados têm demonstrado que somente parasitas vivos podem induzir a produção de anticorpos protetores que determinam a lise mediada por

complemento (Krettl & Brener, 1982). Os anticorpos induzidos por antígenos puros ou por parasitas mortos não estariam associados com a resistência do hospedeiro.

O desenvolvimento de uma vacina eficiente para a doença de Chagas é, possivelmente, um objetivo muito distante a ser alcançado. Nesse sentido, faz-se necessário conhecer o processo de interiorização do parasita na célula do hospedeiro, além da compreensão do conjunto dos mecanismos imunológicos envolvidos no reconhecimento e destruição das células do parasita, bem como na quebra de tolerância induzida por alguns dos antígenos parasitários.

Finalmente, qualquer vacina desenvolvida terá de ser testada e, além de macacos Rhesus, não há bons modelos animais disponíveis. Um teste em voluntários humanos é extremamente complicado, uma vez que a doença de Chagas pode demorar até 30 anos para ter manifestações clínicas definidas. Além disto há considerações éticas importantes na medida em que esses voluntários deveriam ser expostos em áreas de risco juntamente com grupos controle não protegidos (*cf.* Brener & Camargo, 1982), além do fato de que não existem quimioterápicos de eficiência comprovada.

1.4. Aspectos da biologia molecular do *Trypanosoma cruzi*

1.4.1. Conteúdo de DNA, ploidia e cariótipo

O conteúdo de DNA do *T. cruzi* foi medido por reassociação cinética de DNA:DNA por Castro *et al.* (1981), resultando em $1,53 \times 10^8$ pb, correspondente a uma massa de 173 fg. Lanar *et al.* (1981), utilizando cinética de reassociação de DNA:DNA e microespectrofluorometria, obtiveram um valor de 280 fg ou $2,5 \times 10^8$ pb. Comparando as complexidades química e cinética, os dois grupos encontraram valores compatíveis com uma diploidia. Kooy *et al.* (1989) também realizaram medições, utilizando microfluorometria direta com o corante pararosanilina, e compararam os conteúdos de DNA das cepas Y e Esmeraldo. Os valores encontrados foram 125 fg ($1,1 \times 10^8$ pb) para a cepa Y e 200 fg ($1,8 \times 10^8$ pb) para a cepa Esmeraldo. Esses resultados, além de serem semelhantes aos obtidos por Castro *et al.* (1981) e Lanar *et al.* (1981), demonstram haver uma heterogeneidade intraespecífica no conteúdo de DNA do *T. cruzi*.

Os dados de diploidia obtidos pelos trabalhos acima estão de acordo com os resultados obtidos por Gibson *et al.* (1985), que analisaram a distribuição cromossômica e RFLPs de "housekeeping genes" de tripanossomas africanos, bem como com as conclusões da análise de zimodemas de *T. cruzi* (Tibayrenc *et al.* 1986). Outro dado em favor da diploidia foi obtido por Henriksson *et al.* (1990), que verificaram que muitas sondas clonadas hibridizavam com um par de fragmentos de restrição em diferentes cepas, sugerindo que elas deveriam corresponder a dois alelos. Para uma das seqüências clonadas

foram apresentados os mapas de restrição de regiões homólogas e flaqueadoras nos dois alelos, os quais tinham uma pequena variação de tamanho. Além disso foi demonstrado, em uma eletroforese de campo pulsado em duas dimensões, que cada uma das bandas observadas em Southern blot era derivada de cromossomos distintos, que deveriam ser homólogos.

A análise do cariótipo de *T. cruzi* não pode ser feita por microscopia ótica uma vez que os cromossomos não se condensam em nenhum estágio do ciclo celular. O estudo do cariótipo de *T. cruzi* tem sido feito através de eletroforese de campo pulsado (PFGE). Os vários grupos que analisaram o cariótipo de *T. cruzi*, apesar das diferentes cepas e sistemas de PFGE empregados, obtiveram resultados bastante semelhantes quanto ao número e tamanho dos cromossomos de *T. cruzi*. Foi observada a presença de pelo menos 20 bandas cromossomais, variando na faixa de 0,3 a 3,5 Mb (Gibson & Miles, 1986; Engman *et al.*, 1987; Henriksson *et al.*, 1990; Aymerich & Goldenberg, 1989; Cano *et al.*, 1994). Com exceção de Engman *et al.* (1987), que evidenciaram cromossomos de 50-150 kb, não foi descrita a presença de minicromossomos em *T. cruzi*. A discrepância do resultado desse grupo pode ser devida ao sistema de PFGE utilizado, ao número de parasitas empregados ou a migrações anômalas de cromossomos.

Outro aspecto verificado no cariótipo de *T. cruzi* é a heterogeneidade da localização cromossômica dos genes, bem como do tamanho dos cromossomos entre as diferentes cepas (Gibson & Miles, 1986; Engman *et al.*, 1987; Henriksson *et al.*, 1990; Aymerich & Goldenberg, 1989; Cano *et al.*, 1994). Esse resultado está de acordo com a teoria de uma evolução clonal remota seguida de uma evolução independente dos múltiplos clones (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc & Ayala, 1987), aliada a uma grande plasticidade do genoma.

1.4.2. DNA de cinetoplasto (kDNA)

O cinetoplasto representa uma estrutura em forma de disco, perpendicular e próxima ao corpo basal do flagelo, comum aos membros da ordem Kinetoplastida. Essa estrutura é composta de milhares de círculos de DNA concatenados dentro da única mitocôndria da célula, formando uma malha que representa cerca de 10-25% do genoma do parasita (*cf.* Englund, 1982). Cerca de 95% da malha é composta por cerca 5.000-10.000 minicírculos de 700-2.500 pb (1,42 kb em *T. cruzi*) e por 25 a 50 maxicírculos de 20-38 kb (36 kb em *T. cruzi*). Os maxicírculos contêm genes de rRNA, e das proteínas mitocondriais citocromo b, citocromo oxidase e NADH desidrogenase (Clayton, 1988), sendo portanto funcionalmente análogos a outros DNAs mitocondriais (Stuart, 1983). Os minicírculos de *T. cruzi* possuem quatro regiões de 120 pb repetidas e simetricamente arranjadas em ângulos de 90°, intercaladas por quatro regiões não repetidas e variáveis (Degraeve *et al.*, 1988). Até

há alguns anos atrás a função dos minicírculos era completamente desconhecida, mas conforme será discutido no item 1.4.4, sabe-se atualmente que eles participam do processo de editoração de RNA. As razões que privilegiaram a manutenção de uma estrutura em malha tão organizada no cinetoplasto ao longo da evolução não são conhecidas. Borst (1991) propõe que a malha serviria como um dispositivo primitivo de divisão mitótica que reduziria a segregação entre maxicírculos e minicírculos.

1.4.3. "Trans-splicing"

Os membros da ordem Kinetoplastida apresentam outros aspectos bastante peculiares, especialmente quanto ao processamento dos transcritos. A comparação das seqüências de cDNAs e de um gene codificador de VSG ("variant surface glycoproteins") em *T. brucei* demonstrou a existência de uma região de 35 nucleotídios, denominada seqüência líder (SL) ou mini-exon, presente na extremidade 5' terminal do mRNA, mas ausente no respectivo gene (Van der Ploeg *et al.*, 1982). Posteriormente foi observado que essa seqüência estava presente em outros mRNAs de VSGs (Boothroyd & Cross, 1982). A presença ubíqua do mini-exon em mRNAs de tripanossomatídeos que não sofrem variação antigênica (De Lange *et al.*, 1984a; Nelson *et al.*, 1984) descartou a idéia de que o mini-exon ou seus genes pudessem estar associados à regulação da transcrição de genes de VSG (De Lange *et al.*, 1983).

Aparentemente todos os mRNAs maduros apresentam a seqüência líder de 35-39 bases na sua extremidade 5' terminal (De Lange *et al.*, 1984b; Parsons *et al.*, 1984; Walder *et al.*, 1986). Os transcritos dos genes de SL-RNA ("spliced leader RNA") ou medRNA ("mini-exon derived RNA") foram identificados em vários tripanossomatídeos. Em *T. brucei* o transcrito apresenta cerca de 140 bases (Milhausen *et al.*, 1984; Campbell *et al.*, 1984), enquanto em *T. cruzi* o SL-RNA apresenta 105-110 bases (Milhausen *et al.*, 1984; McCarthy-Burke *et al.*, 1989). Os SL-RNAs, assim como os mRNAs, possuem um capacete ("cap") composto de 7-metilguanosina (Lenardo *et al.*, 1985; Laird *et al.*, 1985) e quatro bases modificadas (Freistadt *et al.*, 1987). Admite-se que o SL-RNA tenha como uma de suas funções atuar como uma estrutura doadora de capacete, além de estar possivelmente acoplado ao processo de poliadenilação dos mRNAs (LeBowitz *et al.*, 1993).

Os genes de SL-RNA estão presentes em cerca de 200 cópias, sendo a maior parte delas arranjadas seriadamente em alguns blocos e outras espalhadas no genoma (De Lange *et al.*, 1983; Nelson *et al.*, 1983). A unidade repetitiva apresenta cerca de 1,35 kb em *T. brucei* (De Lange *et al.*, 1983) e 0,6 kb em *T. cruzi* (McCarthy-Burke *et al.*, 1989). A região dos genes correspondente ao SL-RNA é mais conservada nas diferentes espécies do que a região não transcrita (McCarthy-Burke *et al.*, 1989).

A descoberta que o mini-exon está presente em muitos mRNAs e que, por sua vez, os genes de SL-RNA estão contidos em blocos, levou à idéia de que a transcrição dos genes codificadores de proteínas deveria ser descontínua (De Lange *et al.*, 1984). Outro indício a favor da transcrição descontínua veio a partir dos dados de inibição de transcrição por α -amanitina. Foi verificado que os genes de SL-RNA são um pouco mais resistentes à α -amanitina do que os genes de proteínas, mas devem ser transcritos pela RNA polimerase II. Entretanto, os genes de VSG são resistentes a α -amanitina sugerindo que sua transcrição seja feita pela RNA polimerase I (Kooter & Borst, 1984; Laird *et al.*, 1985).

A doação do mini-exon ao pré-mRNA pelo SL-RNA ocorre por um mecanismo de "trans-splicing", ao contrário do que é observado em eucariotos superiores, nos quais ocorre o processamento de introns do mRNA via "cis-splicing". Esse mecanismo foi deduzido a partir da detecção de diferentes intermediários de RNAs semi-processados. Sutton & Boothroyd (1986) demonstraram a existência de um transcrito livre de 100 bases, homólogo à região 3' terminal do SL-RNA de 140 bases, o qual foi denominado mini-intron, em analogia à sequência líder ou mini-exon. Durante o processamento de "trans-splicing" o mini-intron se liga ao pré-mRNA via uma ligação 2'-5' fosfodiéster, gerando uma estrutura em forma de Y ou forquilha. Esse intermediário mini-intron/pré-mRNA já é poliadenilado. O mini-intron pode ser liberado a partir desse intermediário por meio de uma enzima desramificadora (Sutton & Boothroyd, 1986; Murphy *et al.*, 1986; Laird *et al.*, 1987). Ralph *et al.* (1988) demonstraram a existência de outro intermediário semi-processado, em forma de forquilha, contendo o mini-intron ligado somente ao intron 5' terminal do mRNA codificador de proteína.

A partir dos dados acima foi possível deduzir a sequência de eventos envolvidos no processo de "trans-splicing". Primeiramente há uma clivagem do SL-RNA no sítio 5' doador de "splicing", liberando o mini-exon (35 bases) e o mini-intron (100 bases). O mini-intron é unido covalentemente, por uma ligação 2'-5' fosfodiéster, ao sítio aceitor 3' do pré-mRNA. Em seguida ocorre a clivagem da extremidade 5' terminal do pré mRNA, liberando um intermediário em forma de forquilha, o qual contém o mini-intron ligado ao intron do mRNA. Este intermediário pode ser desramificado pela ação da enzima desramificadora. Finalmente há a junção do mini-exon com o pré-mRNA, gerando o mRNA maduro. O processamento por "trans-splicing" apresenta várias características em comum com o "cis-splicing". Os sítios doador e aceitor de "splicing" são definidos pelas sequências GU e AG, respectivamente. Durante o processamento ocorre a formação de um intermediário contendo uma ligação 2'-5' fosfodiéster. Esse intermediário, contendo o intron removido, apresenta uma estrutura de laço no "cis-splicing" e de forquilha no "trans-splicing".

O processo de "trans-splicing" parece estar relacionado à existência de uma região rica em pirimidinas a montante ("upstream") do sítio 3' aceitor do mRNA (Layden & Eisen, 1988; Huang & Van der Ploeg, 1991; de Lafaille *et al.*, 1992) e, além disso, resultados

experimentais sugerem haver uma relação funcional e temporal entre os eventos de "trans-splicing" e poliadenilação de mRNAs (LeBowitz *et al.*, 1993). Estes aspectos serão melhor discutidos no item 4.7.1.

1.4.4. Editoração de RNA

Outro aspecto bastante interessante foi a descoberta da editoração de RNA em transcritos mitocondriais. Até recentemente acreditava-se que somente os maxicírculos continham genes, enquanto que os minicírculos supostamente não eram transcritos. Entretanto esse quadro mudou com a descoberta de que os RNAs de alguns genes mitocondriais sofriam processamentos pós-transcricionais até então desconhecidos. Foi verificado que o gene da subunidade II da citocromo oxidase (gene *coxII*) de *T. brucei* continha uma alteração do passo de leitura em relação a genes homólogos de homem e levedura. Essa alteração também era observada em outros tripanossomatídios como *Crithidia* e *Leishmania*, entretanto, devido à alta conservação desse gene, não parecia tratar-se de um pseudogene. A análise do transcrito revelou a adição de quatro uridinas não codificadas no DNA, que restauravam o passo de leitura (Benne *et al.*, 1986). Esse resultado, aliado ao fato de não ter sido encontrada uma segunda versão do gene *coxII*, levou à conclusão que deveria haver um processo de editoração do RNA. Shaw *et al.* (1988) demonstraram que essa editoração ocorria em outros genes como *coxIII*, MURF2 e MURF3. Um aspecto interessante verificado por esses autores foi que a editoração do RNA podia se dar pela adição assim como pela remoção de uridinas e que ocorria em genes mitocondriais de diferentes membros da ordem Kinetoplastida. Em alguns casos, como o do gene da subunidade III da citocromo oxidase, observou-se que originalmente o gene não continha um ATG de iniciação mas que, após editoração, o códon de iniciação foi criado no transcrito. Além disso, verificou-se que cerca de 50% da sequência do transcrito do gene *coxIII* é criada por editoração (Feagin *et al.*, 1988).

Como possíveis vantagens evolutivas, admite-se que a editoração de RNA poderia ser um ponto de controle da expressão gênica. Outra vantagem é de que um gene poderia dar origem a várias proteínas diferentes se houvesse uma editoração alternativa, criando uma maior flexibilidade genética. Além disso, uma evolução baseada no RNA poderia representar um risco menor para o organismo, já que um transcrito erroneamente processado poderia ser facilmente substituído, enquanto que uma mutação a nível de DNA poderia ser fatal (*cf.* Benne, 1990).

A despeito das evidências descritas acima, o mecanismo de editoração do RNA não era conhecido. Existiam basicamente dois modelos: um assumindo uma sequência de eventos e atividades enzimáticas envolvidas e outro, postulando a existência de um RNA guia que pudesse dirigir a editoração (*cf.* Benne, 1990). Blum *et al.* (1990), realizaram uma

busca de homologia entre a sequência conhecida do maxicírculo de *L. tarentolae*, permitindo pareamentos G-U, e verificaram que pequenos trechos, geralmente presentes em regiões intergênicas do maxicírculo, eram homólogas às regiões editadas dos mRNAs maduros. Essas sequências, em função do modelo de RNA guia, foram consideradas como genes de gRNA. Os autores também identificaram alguns dos transcritos desses genes de gRNAs e propuseram um modelo de editoração de RNA que envolveria, além dos gRNAs, uma terminal uridiltransferase (TUTase), uma endoribonuclease, uma exonuclease e uma ligase. A busca de um número maior de genes de gRNA levou à descoberta que as regiões variáveis de minicírculos codificam gRNAs de maneira similar à descrita em maxicírculos (Sturm & Simpson, 1990b). Além disso, estudando mRNAs parcialmente editados, foi verificado que os padrões de edição encontrados eram compatíveis com uma orientação 3'→5' do processo de editoração (Sturm & Simpson, 1990a). Posteriormente Blum *et al.* (1991) demonstraram que o mecanismo de editoração envolvia duas etapas de transesterificação. Numa primeira etapa haveria o pareamento entre a extremidade 5' terminal do gRNA e o transcrito. A seguir a hidroxila terminal da cauda do gRNA, que contém um segmento de uridinas, atacaria uma ligação interna do RNA pré-editado, clivando-o. Numa segunda etapa, a hidroxila 3' terminal gerada no RNA pré-editado, atacaria por sua vez uma região de duas uridinas da cauda do gRNA, restaurando a integridade do mRNA com um ganho de uma uridina, e o gRNA que perderia esta uridina.

1.5. Objetivos do presente trabalho

Conforme discutido no item 1.1.1, a forma tripomastigota representa o elo de ligação entre as fases de vida do parasita nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Uma das características biológicas mais marcantes deste estágio é a capacidade que ele apresenta de penetrar em vários tipos de células. Até meados da década de 80, os estudos de nosso grupo centravam-se, basicamente, em aspectos da infectividade do parasita *in vivo* e *in vitro*, bem como na determinação da composição da membrana celular, de grande importância para o entendimento da interação entre o parasita e a célula hospedeira (Zingales *et al.*, 1982; Zingales e Colli., 1985). A purificação de antígenos de *T. cruzi* é um processo extremamente difícil e de baixo rendimento, principalmente quando se trata de tripomastigotas. Como alternativa, a partir da segunda metade da década 80 foram iniciados estudos de clonagem e expressão de genes de *T. cruzi*, visando contribuir para o entendimento de aspectos da biologia celular e molecular do parasita, bem como com

aspectos relacionados com a doença de Chagas. Na época em que nosso trabalho foi iniciado, em 1988, poucos genes de *T. cruzi* haviam sido clonados e caracterizados (Peterson *et al.*, 1986; Ibañez *et al.*, 1987; Beard *et al.*, 1988; Hoft *et al.*, 1989; Lafaille *et al.*, 1989; Takle *et al.*, 1989). O objetivo inicial deste trabalho foi o de implantar a tecnologia da clonagem gênica em nosso laboratório, visando isolar e caracterizar genes que codificam antígenos de *T. cruzi*. Para essa finalidade escolhemos, como sonda para a varredura da biblioteca de expressão, um soro policlonal dirigido contra antígenos da superfície de tripomastigotas. A partir do momento em que dois recombinantes foram isolados, passou a ser nosso objetivo a caracterização destes clones quanto aos seguintes aspectos:

- Identificação dos antígenos clonados;
- Distribuição celular no parasita;
- Expressão das proteínas de fusão;
- Avaliação das proteínas de fusão no diagnóstico sorológico da doença de Chagas;
- Arranjo dos genes no genoma do parasita;
- Transcrição nas diferentes formas evolutivas;
- Seqüência nucleotídica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Apresenta-se abaixo a lista de fabricantes dos principais reagentes e de outros itens de consumo empregados nesse trabalho.

- Ajinomoto Co. Inc.: glicina.
- Amersham: [α - 32 P]dATP (3.000Ci/mmol); [35 S]dATP α S (>1.000Ci/mmol); [γ - 32 P]ATP (3.000Ci/mmol); [α - 32 P]dCTP (3.000Ci/mmol); matriz de nitrocelulose Hybond C; matriz de nylon Hybond N; proteína A marcada com 125 I.
- Bayer: Rompun[®].
- Becton-Dickinson: tubos e microplacas de 96 poços Falcon[®]; agulhas; seringas.
- BioRad: acrilamida para ácidos nucleicos; colunas de plástico Poly-Prep[®]; resina de troca iônica RG 501-X8.
- Boehringer Mannheim: DNase I; DNA polimerase I; Fragmento Klenow da polimerase; Nuclease S1; Proteinase K; Terminal desoxinucleotidil transferase.
- Carlo Erba: trietilamina.
- Collaborative Research: resina oligo dT-celulose.
- Cultilab: soro fetal bovino.
- DIFCO: Bacto-ágar; Bacto-triptona; extrato de levedura.
- Du Pont: placa intensificadora com tungstato de cálcio Cronex Lightning Plus.
- Fluka: isotiocianato de guanidina.
- FMC: Nusieve[®] GTG LMP agarose.
- GIBCO BRL: *E. coli* DH5 α ; T4 DNA ligase.
- ICN: dietilpirocarbonato.
- IPEN: Na 131 I.
- Labsynth: vaselina.
- May & Baker - tartarato de sódio/potássio.
- Merck: ácido acético glacial; ácido clorídrico; acetona; cloreto de amônio; *n*-butanol; cloreto de cálcio; clorofórmio; dietilamina; EDTA; etanol; fenol; formaldeído 37%; isopropanol; metanol; POPOP; acetato de potássio; cloreto de potássio; reagente de Folin-Ciocalteu; tolueno.
- Millipore: filtros para esterilização (0,4 μ m); filtros de nitrocelulose de 85 mm (HATF).
- Nestlé: leite desnatado Molico[®].

-New England Biolabs: *EcoRI* metilase; enzimas de restrição; adaptadores de *EcoRI* não fosforilados; S-adenosil-L-metionina; T4 DNA ligase; T4 DNA polimerase; T4 polinucleotídeo quinase; "Universal Primer (-20) 17 MER"; "Reverse Primer (-24) 16 MER".

-Parke-Davis - Ketalar[®].

-Pharmacia: agarose NA; ATP; ddNTP; dNTP; Ficoll 400; pGEX3X; Sepharose 4B ativada por brometo de cianogênio; Sepharose CL-4B; sulfato de dextrana; T7 Sequencing Kit[™].

-Pierce: azul de bromofenol; Iodogen[®].

-Promega: Erase-a-Base[®]; Proclone[®] λgt11 System; RNasin[®].

-QEEL: parafina.

-Reagen: ácido bórico; sulfato de amônio; cloreto de cálcio; sulfato de cobre; fosfato monobásico de potássio; acetato de sódio; fosfato dibásico de sódio; fosfato monobásico de sódio; frutose; glicose; cloreto de magnésio; sulfato de magnésio; maltose; sacarose; bicarbonato de sódio; citrato de sódio; cloreto de sódio; hidróxido de sódio.

-Riedel de Haën: uréia.

-Sigma: ácido tricloroacético; acrilamida; adjuvante completo de Freund; adjuvante incompleto de Freund; ágar; aprotinina; persulfato de amônio; ampicilina; anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase; anticorpo anti-IgG humana conjugado a peroxidase; anticorpo anti-IgM (cadeia μ) humana conjugado a peroxidase; pAPG-agarose; azul de Coomassie; BSA fração V; CDNB; cloreto de césio; 4-cloro- α -naftol; dimetildiclorosilano; DMSO; DNA de esperma de salmão; DTT; espermidina; etanolamina; brometo de etídio; formamida; gelatina; glicerol; glicina; glutatona reduzida; GSH-agarose; HEPES; cloreto de hexaminocobalto; hidroxiquinolina, IPTG; cloreto de lítio; cloreto de manganês; marcadores de peso molecular para SDS-PAGE; β -mercaptoetanol; MES; N,N'-metileno-bis-acrilamida; Nonidet P-40; MOPS; PEG 8000; PMSF; polivinilpirrolidona; Ponceau S; PPO; putrescina; ONPG; Sarkosyl; SDS; azida sódica; pirofosfato de sódio; TEMED; tiamina; timerosal; TLCK; Triton X-100; Trizma base; Tween 20; X-Gal; xileno cianol FF; sulfato de zinco.

-Synth: carbonato de sódio; tetraborato de sódio.

-Stratagene: pBluescript[®] KS⁺.

-Whatman: filtros GF/C; papel 3MM.

-Worthington: lisozima; RNase A.

-USB: T7 DNA polimerase (Sequenase[®]).

2.2. Soluções

TBE 1x - 89 mM Tris-base; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA, pH 8,3.

SSPE 20x - 3 M NaCl; 0,2 M NaH₂PO₄; 20 mM EDTA, pH 7,4.

Solução de Denhardt 50x concentrada - 1% (p/v) Ficoll; 1% (p/v) polivinilpirrolidona; 1% (p/v) BSA.

Tampão MOPS 1x - 20 mM MOPS; 5 mM acetato de sódio pH 7,0; 1 mM EDTA.

SSC 1x - 0,15 M NaCl; 0,015 M citrato de sódio, pH 7,0.

TAE 1x - 40 mM Tris-base; 20 mM ácido acético glacial; 1 mM EDTA, pH 8,3.

SM - 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 8 mM $MgCl_2$; 0,01% gelatina.

TBS - 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl.

TE - 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA.

TES - 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 0,1 mM EDTA.

TNE - 25 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA pH 8,0.

TSM - 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 10 mM $MgCl_2$.

2.3. Meios de cultura

2-TY - 16 g/L (p/v) Bacto-triptona; 10 g/L (p/v) extrato de levedura; 10 g/L (p/v) NaCl, pH 7,4.

λ Ágar - Bacto-triptona 10 g/L; NaCl 5 g/L; ágar 15 g/L, pH 7,4.

λ Top Ágar - Bacto-triptona 10 g/L; NaCl 5 g/L; ágar 7 g/L, pH 7,4.

λ Top Agarose - Bacto-triptona 10 g/L; NaCl 5 g/L; agarose 7 g/L, pH 7,4.

LB - Bacto-triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L, pH 7,4.

LB Ágar - LB com 15 g/L de ágar.

LBM - LB com 10 mM de $MgSO_4$

Meio M9 10x concentrado - 6 g/L (p/v) Na_2HPO_4 ; 3 g/L (p/v) KH_2PO_4 ; 0,5 g/L (p/v) NaCl; 1,0 g/L (p/v) NH_4Cl . pH 7,4.

Meio mínimo - meio M9 1x; 2 mM $MgSO_4$; 0,2% (p/v) glicose; 0,1 mM $CaCl_2$; 1 mg/mL (p/v); 1 mg/mL (p/v) vitamina B1; 15 g/L (p/v) bacto-ágar.

SOB - Bacto-triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L e NaCl 0,5 g/L, pH 7,4.

2.4. Bactérias

Para a estocagem, todas as cepas de bactérias foram cultivadas em meio 2-TY durante 18 horas. O estoque de longo prazo foi feito pela mistura de volumes iguais do cultivo bacteriano e de glicerol estéril e posterior armazenamento em tubos de plástico estéreis a $-70^{\circ}C$. O mesmo tipo de procedimento foi adotado para o estoque de médio prazo (6 meses) a $-20^{\circ}C$. Para o uso, procedeu-se a repiques em placas a partir dos tubos estocados a $-20^{\circ}C$. As placas foram guardadas a $4^{\circ}C$ e utilizadas no prazo de 2 semanas. Abaixo estão listadas as cepas de *E. coli* utilizadas e seus respectivos genótipos:

- BHB2688 (Hohn & Murray, 1977; Hohn, 1979) - (N205 *recA*⁻ [λ *imm*⁴³⁴, *clts*, *b2*, *red*⁻, *Eam*, *Sam*]/ λ)
- BHB2690 (Hohn & Murray, 1977; Hohn, 1979) - (N205 *recA*⁻ [λ *imm*⁴³⁴, *clts*, *b2*, *red*⁻, *Dam*, *Sam*]/ λ)
- DH5 α [®] (Bethesda Research Laboratories) - F- λ -*recA1 endA1 hsdR17* (*r*_k⁻, *m*_k⁺), Δ (*lacZYA-argF*) U169 ϕ 80d *lacZ* Δ M15 *supE44 thi-1 gyrA96 relA1*
- JM101 - (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) - *supE*, *thi*, Δ (*lac-proAB*), [*F'*, *traD36*, *proAB*, *laq*^{lq} Δ M15].
- JM109 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) - *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, λ ⁻, Δ (*lac-proAB*), [*F'*, *traD36*, *proAB*, *laq*^{lq} Δ M15]
- Q358 (Karn *et al.*, 1980) - *hsdR*⁻_k *hsdM*⁺_k *supF* ϕ 80^r
- Q359 (Karn *et al.*, 1980) - *hsdR*⁻_k *hsdM*⁺_k *supF* ϕ 80^r P2
- Y1089 (Young & Davis, 1983b) - Δ *lacU169*, *proA*⁺, Δ *lon*, *ara* D139, *strA*, *hflA150*, [*chr::Tn10*], *hsdR*⁻, *hsdM*⁺, (pMC9).
- Y1090 (Young & Davis, 1983b) - Δ *lacU169*, *proA*⁺, Δ *lon*, *ara* D139, *strA*, *supF*, [*trpC22::Tn10*], *hsdR*⁻, *hsdM*⁺, (pMC9).

2.5. Vetores

- λ EMBL3 (Frischauf *et al.*, 1983) - *sbh1* λ 1^o *b139* [sítio de policlonagem *int29 nin44 trpE* sítio de policlonagem] KH54 *chiC srl* λ 4^o *nin5 srl* λ 5^o.
- λ gt11 (Young & Davis, 1983a) - *lac5 nin5 cl857 S100*.
- M13mp18 (Messing & Vieira, 1982).
- pBluescript[®] (Stratagene; Short *et al.*, 1988).
- pGEX3X (Pharmacia; Smith & Johnson, 1988).
- pMSgt11 (Scherf *et al.*, 1990).
- pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

2.6. Parasitas

Neste estudo utilizou-se basicamente a cepa Y de *T. cruzi* (Silva & Nussenzweig, 1957). Em alguns casos especificados no texto utilizaram-se as cepas CL (Brenner & Chiari, 1963) e G (Yoshida, 1983). As formas epimastigotas foram cultivadas no meio LIT (infusão de fígado e triptose) de Castellani *et al.* (1967), preparado pela técnica Cecília França Lopes. As formas tripomastigotas de cultura de tecido foram obtidas pela infecção de monocamadas de células LLC-MK2, como descrito por Zingales *et al.* (1982). Os parasitas foram cultivados pelos técnicos do laboratório Marinei Ferreira Gonçalves e Roberto Zangrandi.

2.7. Soros

2.7.1. Soro de coelho anti-tripomastigotas de cultura de tecido (tct) da cepa Y

Este soro foi preparado e cedido pela Dra. Eufrosina S. Umezawa (Instituto de Medicina Tropical, São Paulo). Para sua obtenção, tct foram inativados com o agente intercalante 8-MOP, conforme previamente descrito (Andrews *et al.*, 1985) e inoculados em coelhos em duas doses com intervalo de 15 dias. Os tripomastigotas assim tratados podem infectar as células do hospedeiro e se diferenciar em amastigotas, mas não são capazes de se multiplicar.

2.7.2. Obtenção de soros de coelhos anti-proteínas de fusão

2.7.2.1. Emulsificação do antígeno

Para a imunização de coelhos foram utilizadas doses de 300 µg de proteína purificada e liofilizada. A proteína foi dissolvida em 750 µl de PBS estéril. Preparou-se uma emulsão de água em óleo empregando um volume igual de adjuvante completo de Freund. Para a emulsificação foram utilizadas duas seringas de vidro com agulhas 25 x 8 conectadas entre si por um tubo fino (Tygon[®]) ou mediante uma agulha de duplo canhão. Injetou-se primeiramente a fase aquosa dentro da fase oleosa e a seguir repetiu-se o procedimento em ambas as direções de 25 a 30 vezes. Para comprovar que de fato a emulsão resultante era de água em óleo e não de óleo em água, pingou-se uma gota sobre um frasco com água. Uma gota de uma emulsão de água em óleo permanece na superfície da água, sem dissolução. Coelhos da raça New Zealand foram imunizados em duplicata pelas duas vias de inoculação descritas a seguir, utilizando-se 300 µg de proteína emulsificada em cada dose.

2.7.2.2. Imunização por inoculações subcutâneas

Os coelhos foram imunizados por via subcutânea em vários pontos ao longo do dorso e próximos a linfonodos regionais. Na primeira dose empregou-se adjuvante completo de Freund e, dois meses após, aplicou-se a segunda dose, emulsionada em adjuvante incompleto de Freund. Doses subsequentes foram aplicadas com intervalos de um mês. Os animais foram sangrados regularmente a partir da segunda dose pela veia marginal da orelha para monitoramento da resposta sorológica. O sangue foi incubado por uma hora em estufa a 37°C e depois a 4°C durante a noite, para melhor retração do

coágulo. O soro foi então centrifugado a 2.500 rpm em centrífuga de mesa e inativado a 56°C por 15 minutos.

2.7.2.3. Imunização por múltiplas inoculações intradérmicas

Seguiu-se, com algumas modificações, técnica descrita por Vaitukaitis (1981). Os coelhos foram sedados com a inoculação por via intramuscular de 25 mg/kg de Ketalar® (cloridrato de quetamina) e 3 mg/kg de Rompun® (cloridrato de xilazina). Em seguida os animais foram tricotomizados na região dorsal entre os membros anteriores e posteriores. A primeira dose do antígeno, emulsificado em adjuvante completo de Freund, foi aplicada em volumes de 50 µl por via intradérmica, em um total de 60 pontos de inoculação. Após 60 dias, os animais passaram a ser sangrados mensalmente e inoculados com doses subcutâneas de 300 µg emulsificadas em adjuvante incompleto de Freund.

2.7.3. Soros humanos

Os soros humanos de indivíduos normais ou portadores da doença de Chagas, leishmaniose, malária, toxoplasmose e esquistossomose foram obtidos de laboratórios de referência (Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás; Instituto de Medicina Tropical e Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo). Estes soros foram previamente testados por exames sorológicos convencionais. Alguns dos pacientes chagásicos foram submetidos a xenodiagnóstico e exames clínicos, incluindo eletrocardiografia, ingestão de contraste de bário e enema de bário. Os soros da região endêmica de Bambuí foram cedidos pelo Dr. E. Chiari e pelo Dr. J.C. Pinto Dias, com informações relativas aos sintomas clínicos dos pacientes e o zimodema dos parasitas isolados destes indivíduos.

2.8. Purificação de ácidos nucleicos de *T. cruzi*

2.8.1. Preparação simultânea de DNA e RNA

2.8.1.1. Ultracentrifugação em gradiente de césio

Com o objetivo de eliminar qualquer fonte de ribonuclease, todas as soluções utilizadas foram tratadas com DEP 0,1% (v/v) durante a noite e posteriormente autoclavadas, com exceção da solução de Tris, que somente foi autoclavada. Todo o material de vidraria foi lavado, seco e esterilizado em forno Pasteur a 180°C por 4 horas.

Uma suspensão contendo 3×10^{10} parasitas foi centrifugada e o sedimento lavado 3 vezes com PBS e estocado a -70°C até o momento do uso.

O método empregado seguiu basicamente o protocolo de Sambrook *et al.* (1989). O sedimento de parasitas foi ressuspensão em 8 mL de uma solução contendo isotiocianato de guanidina (4 M), citrato de sódio (5 mM pH 7,0), β -mercaptoetanol (1% v/v) e Sarkosyl (0,5% p/v). Após a total homogeneização, o material foi centrifugado a 5.000 g por 10 minutos a 10°C . Uma solução 5,7 M de cloreto de cézio em 10 mM EDTA pH 7,5 foi preparada, tratada com DEP e autoclavada. A seguir mediu-se o índice de refração para corrigir a concentração da solução. Volumes de 2 mL desta solução foram dispensados em tubos (Beckman - Ultraclear) do rotor SW-60. Por sobre a solução de cézio foram dispensados cuidadosamente cerca de 2,5 mL do homogenato de parasitas. Os tubos foram centrifugados por 18 horas a 40.000 rpm na temperatura de 20°C em ultracentrífuga Beckman.

2.8.1.2. Obtenção do DNA

Após a centrifugação, retiraram-se cuidadosamente os debris celulares da parte superior dos tubos. Com uma seringa e agulha 30 x 8 aspirou-se vagarosamente o DNA, que concentra-se pouco abaixo da interface do homogenato com a solução de cézio. O material foi dialisado 3 vezes (3 horas cada) contra 1.000 volumes de tampão (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 0,5% p/v SDS). a seguir adicionou-se Proteinase K (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubou-se por 2 horas a 65°C . O procedimento acima foi repetido e, após a segunda incubação, o DNA foi extraído com fenol, fenol/clorofórmio e clorofórmio e, finalmente, precipitado com 1/10 volume de acetato de sódio (3M pH 5,3) e 2 volumes de etanol a -20°C por 2 horas. Em seguida o DNA foi centrifugado a 12.000 g por 15 minutos, lavado por duas vezes com etanol 70%/TE e redissolvido em 10 mL de TE. Procedeu-se então a uma digestão com 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase A (livre de DNase) por 30 minutos a 37°C . O DNA foi então extraído com fenol e clorofórmio e a fase aquosa foi dialisada duas vezes contra 1.000 volumes de TE (10 mM EDTA) e outras duas contra TE (0,1 mM EDTA). A concentração final do DNA foi determinada pela absorbância a 260 nm (assumindo que $1 \text{ D.O.}_{260} = 50 \mu\text{g DNA}/\text{mL}$). O estoque de DNA foi mantido a 4°C até o momento do uso.

2.8.1.3. Obtenção do RNA total

O RNA encontra-se sedimentado no fundo dos tubos. Após a remoção do DNA, os tubos foram cortados com uma navalha quente a uma altura de cerca de 1 cm do fundo e a solução remanescente foi cuidadosamente removida. Os tubos foram lavados com etanol 70% e secos à temperatura ambiente. Os sedimentos foram ressuspensos em 4 mL de TE com 0,1% (p/v) de SDS e precipitados com 400 μL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2,5

volumes de etanol gelado a -20°C por uma hora. Após uma centrifugação a $12.000g$ por 15 minutos, os sedimentos foram lavados com etanol 70%, secos ao ar e ressuspensos em 2 mL de água. Mediu-se a absorbância da amostra a 260 nm para estimar a concentração de RNA (assumindo que $1 \text{ D.O.}_{260} = 40 \mu\text{g RNA/mL}$). A solução foi alíquotada, adicionada de 3 volumes de etanol e estocada a -70°C . No momento do uso adicionou-se acetato de sódio para 0,3 M final e centrifugou-se a amostra.

2.8.2. Purificação da fração de RNA mensageiro poli A⁺

Para a purificação do mRNA contendo cauda poliadenilada foi empregada uma coluna com a resina oligo dT-celulose. Uma massa de 0,5 g da resina foi ressuspensa em 0,1 N NaOH e utilizada para empacotar uma coluna de plástico descartável (Poly-Prep - BioRad). A resina foi lavada 3 vezes com água e com o tampão de carga (50 mM citrato de sódio pH 7,0; 0,5 M NaCl; 1,0 mM EDTA; 0,1% Sarkosyl) até o pH ficar abaixo de 8,0. O RNA total foi ressuspenso em H_2O , aquecido a 65°C por 5 minutos e rapidamente resfriado em gelo. Adicionou-se um volume de tampão de carga 2x concentrado e o material foi aplicado na coluna.

Coletou-se o eluato da coluna e adicionou-se mais um volume de tampão de carga. Após o recolhimento, o eluato foi aquecido a 65°C por 5 minutos e reaplicado na coluna. A coluna foi lavada com 5 a 10 volumes de tampão de carga, coletando-se frações de 1 mL e medindo-se em seguida a absorbância a 260 nm. Quando as frações apresentaram absorbância próxima de zero, procedeu-se à eluição do mRNA com 2 a 3 volumes de tampão de eluição (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,05% p/v SDS). A absorbância a 260 nm foi determinada e as frações de interesse foram reunidas. O RNA foi precipitado pela adição de acetato de sódio para 0,3 M final e 2,5 volumes de etanol, seguida de uma incubação de 30 minutos em gelo. Após uma centrifugação, o sedimento de RNA foi ressuspenso em H_2O e estocado com 3 volumes de etanol a -70°C .

2.8.3. Preparação do RNA pelo método do fenol quente

Para a extração rápida de RNA total de *T. cruzi* foram utilizados 10^8 epimastigotas ou 2×10^8 tripomastigotas por preparação. Os parasitas foram centrifugados por 1 minuto em um tubo Eppendorf®. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de PBS estéril e novamente centrifugado por 1 minuto. Em seguida ressuspendeu-se o sedimento em 100 μL de PBS e adicionou-se o inibidor de ribonuclease RNasin® para uma concentração final de 0,4 U/ μL . Paralelamente saturou-se uma solução de fenol com TNE. A seguir adicionou-se ao fenol saturado um igual volume de TNE com 1% (p/v) de SDS e manteve-se a mistura em banho a 80°C , até formar uma solução monofásica. Adicionou-se então 1 mL da solução de fenol

quente ao tubo com os parasitas e agitou-se levemente. O tubo foi centrifugado por 5 minutos e a fase aquosa resultante foi extraída com igual volume de clorofórmio. O RNA foi precipitado pela adição de 2,2 volumes de etanol frio à fase aquosa. Manteve-se o tubo a -20°C durante a noite. No dia seguinte o tubo foi centrifugado por 30 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensão em 100 µL de água e estocado a -70°C até o momento de uso.

2.9. Construção de biblioteca genômica de *T. cruzi* no vetor de expressão λ gt11

2.9.1. Preparação dos insertos

Partiu-se de 35 µg de DNA de formas epimastigotas da cepa Y, purificado como descrito no item 2.8.1. O DNA foi introduzido em uma seringa e submetido a passagens sucessivas através de uma agulha (13 x 8) por 250, 500, 750 e 1.000 vezes, visando atingir um tamanho médio de fragmentos de 3 kb. O DNA fragmentado (28 µg em 1,1 mL) foi adicionado de 120 µL de tampão de S1 10x concentrado (3M NaCl; 0,5 M acetato de potássio pH 4,6; 0,1 M ZnSO₄; 50% glicerol v/v) e 1 µL de nuclease S1 (300 U/µL), e incubado a 37°C por 30 minutos. Em seguida o DNA foi extraído com um volume de fenol/clorofórmio e precipitado com 2,5 volumes de etanol a -20°C por 2 horas. Após uma centrifugação a 13.000 g por 15 minutos, o DNA foi lavado com etanol 70%/TE, seco sob vácuo e ressuspensão em 200 µL de água. À metade desse volume foram adicionados 26 µL de tampão de *Eco*RI metilase 5x concentrado (0,5 M Tris-HCl pH 8,0; 5 mM EDTA; 25 mM DTT), 4 µL de S-adenosil-metionina (3,2 mM) e 5 µL de *Eco*RI metilase (20 U/µL). A amostra foi incubada por 1 hora a 37°C e em seguida extraída e precipitada com descrito acima. A seguir procedeu-se a uma reação de preenchimento com T4 DNA polimerase. Um total de 2 µg de DNA, ressuspensos em 5,2 µL, foram adicionados de 14 µL de tampão 5x concentrado de T4 DNA polimerase (335 mM Tris-HCl pH 8,8; 83 mM sulfato de amônio; 33,5 mM MgCl₂; 50 mM β-mercaptoetanol; 33,5 mM EDTA), 1,4 µL de dNTP (5 mM de cada), 7,0 µL de T4 DNA polimerase e água para um volume final de 70 µL. Incubou-se a 37°C por 40 minutos e, em seguida, o DNA foi novamente extraído e precipitado.

2.9.2. Marcação radioativa dos adaptadores de *Eco*RI

Seguiu-se basicamente o método de Sambrook *et al.* (1989). Foram utilizados adaptadores de *Eco*RI não fosforilados de 8, 10 e 12 pares de bases. A 2,5 µL de adaptador (cerca de 2,5 µg de DNA) foram adicionados 2,0 µL de tampão de fosforilação de adaptadores 10x concentrado (0,7 M Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M MgCl₂; 50 mM DTT), 30 µCi de [γ -³²P]ATP, 1,5 µL de polinucleotídeo quinase (New England Biolabs - 10 U/µL) e H₂O totalizando um volume de 20 µL. A amostra foi incubada a 37°C por 30 minutos e

posteriormente a 65°C por 5 minutos, a fim de inativar a enzima. Cada adaptador foi fosforilado em uma reação individual.

2.9.3. Controle da eficiência de fosforilação dos adaptadores

Para se ter certeza de que cada um dos três adaptadores foi adequadamente fosforilado, procedeu-se a uma reação de ligação. Um volume de 1,5 µL da reação de fosforilação foi adicionado de 1,0 µL de tampão de ligação 10x concentrado (660 mM Tris-HCl pH 7,6; 50 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 10 mM ATP), 1 µL de T4 DNA ligase (1 U Weiss/µL) e H₂O para completar um volume de 10,0 µL. As amostras foram incubadas a 18°C durante a noite. Após uma inativação a 65°C por 10 minutos, 5 µL de cada reação de ligação foram misturados a 2 µL de tampão de *EcoRI* 5x concentrado (500 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM MgCl₂; 500 µg/mL BSA), 1 µL de *EcoRI* (20 U/mL) e H₂O para um volume final de 10 µL. Os tubos foram incubados a 37°C por 2 horas e a seguir a 65°C por 5 minutos. Para a visualização dos resultados, foi preparado um gel de poliacrilamida 8% em tampão TBE 0,5x contendo 0,06% de persulfato de amônio 0,03% de TEMED. Foram utilizados, como amostras, 0,75 µL da reação de fosforilação, 5 µL da reação de ligação e os 10 µL da digestão com *EcoRI*. Todas as amostras tiveram os seus volumes ajustados para 10 µL e foram adicionadas de 2 µL de tampão de amostra do tipo II (Sambrook *et al.*, 1989 - 0,25% p/v azul de bromofenol; 0,25% p/v xileno cianol; 15% p/v Ficoll tipo 400). A corrida eletroforética foi realizada em tampão 0,5x TBE a 100 V até o azul de bromofenol atingir a metade do gel. O gel foi recoberto com um plástico fino (Magipack[®]) e um filme radiográfico foi exposto durante uma hora. Este procedimento controle foi utilizado para cada um dos três adaptadores de forma individual.

2.9.4. Ligação de insertos com os adaptadores e digestão com *EcoRI*

A reação de ligação foi efetuada com 1 µg de DNA de inserto, 0,5 µL de cada adaptador fosforilado, 2 µL de tampão de ligação 10x concentrado (660 mM Tris-HCl pH 7,6; 50 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 10 mM ATP), 2 µL de T₄ DNA ligase (1 U Weiss/µL) e H₂O para um volume final de 20 µL. O material foi incubado durante a noite a 18°C e posteriormente a enzima foi inativada a 65°C por 10 minutos. A 18 µL da reação de ligação foram adicionados 1 µL de espermidina 50 mM, 6,4 µL de tampão de restrição de médio sal pH 7,5 5x concentrado (250 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 500 µg/mL BSA), 5 µL de *EcoRI* (20 U/µL), 0,5 µL de NaCl 2M e H₂O para um volume final de 50 µL. A incubação foi feita a 37°C por 4 horas. Como procedimento de controle, procedeu-se a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, como descrito no item acima, usando como amostras 0,75 µL de adaptadores fosforilados, 2 µL da reação de ligação e 5 µL da

reação de digestão com *EcoRI*. A presença de uma banda radioativa de alto peso molecular na amostra de DNA ligado foi indicativa da ocorrência de ligação entre insertos e adaptadores.

2.9.5. Separação do excesso de adaptadores não ligados ao DNA dos insertos

O excesso de adaptadores não ligados aos insertos foi removido por gel filtração em uma coluna de Sepharose® CL-4B. A resina foi empacotada e equilibrada em tampão TE/0,6 M NaCl. A coluna foi calibrada utilizando-se azul dextrana e adaptadores radioativos. O material foi aplicado e coletado em um total de 40 frações, cuja radioatividade foi determinada em contador de cintilação líquida, pelo método de Cerenkov. Comparando-se o perfil obtido com aquele padronizado pela passagem de adaptadores não ligados, foi possível coletar as frações correspondentes aos insertos de *T. cruzi* ligados a adaptadores. O volume das frações escolhidas, contendo um total de 800 ng de DNA, foi de 220 µL.

2.9.6. Reação de ligação entre o DNA de *T. cruzi* e o DNA de λ gt11

Utilizou-se como vetor o fago λ gt11 (Young & Davis 1983a), contido no kit Protoclone® da Promega. Este kit apresenta uma alta eficiência de recombinação porque o DNA do vetor já vem previamente digerido com *EcoRI* e defosforilado com fosfatase alcalina de bezerro. Para a reação de ligação utilizou-se uma razão de 3 moles DNA de inserto por mol de DNA de vetor. Um total de 500 ng de DNA de insertos foi co-precipitado com o DNA do vetor. Após lavagem com etanol 70%/TE, o DNA foi ressuspensão em 8 µL de TE e adicionado de 1 µL de tampão de ligação 10 x concentrado e 1 µL de T4 DNA ligase (1 U Weiss). Procedeu-se a uma incubação de 18 horas a 16°C.

2.9.7. Encapsidação *in vitro* do DNA

2.9.7.1. Preparação do extrato de empacotamento sonificado (SE)

Utilizou-se o protocolo descrito em Sambrook *et al.* (1989). Uma colônia de *E. coli* da cepa BHB2690 foi cultivada durante a noite em 50 mL de meio 2-TY a 30°C. No dia seguinte a D.O.₆₀₀ foi determinada e inoculou-se um erlenmeyer de 2 litros contendo 500 mL de meio 2-TY pré-aquecido. Utilizou-se um volume de inóculo suficiente para gerar uma D.O. inicial de 0,1. O frasco foi incubado sob agitação a 32°C até atingir uma D.O.₆₀₀ = 0,3. Para a indução, o frasco foi colocado em um banho de água a 65°C e, com um termômetro no meio de cultura, foi agitado manualmente até a temperatura do meio atingir 45°C. Em seguida o frasco foi transferido para um banho de água a 45°C e agitado por 15 minutos

com o objetivo de inativar o inibidor Cl^- . Posteriormente o frasco foi incubado em estufa, sob agitação vigorosa, a 38-39°C por cerca de 2 a 3 horas. Para se monitorar o momento adequado de interromper o cultivo, coletaram-se amostras da cultura e adicionou-se nelas uma gota de clorofórmio. O clareamento do meio, decorrente da lise celular, serviu como indicação de que as células já apresentavam uma grande concentração das proteínas de empacotamento do fago λ . Após a incubação, as células foram centrifugadas a 4.000 g por 10 minutos a 4°C. O meio foi totalmente drenado e as células ressuspensas em 3,6 mL de uma solução recém-preparada de tampão de sonicação (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 5 mM β -mercaptoetanol). A suspensão foi transferida para um tubo plástico Falcon® e sonicada no gelo com pulsos de 5 segundos cada, com intervalos de 30 segundos na unidade 4 de intensidade do aparelho (Heat Systems, Ultrasonics Inc. - Modelo W185D). Após o clareamento da solução e redução da viscosidade, o lisado foi centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi adicionado de um volume de tampão de sonicação frio e 1/6 de volume de tampão de empacotamento (6 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM espermidina; 50 mM putrescina; 20 mM MgCl_2 ; 30 mM ATP; 30 mM β -mercaptoetanol). A solução foi alíquotada em volumes de 15 μL em tubos Eppendorf® pré-resfriados. Os tubos foram congelados em nitrogênio líquido e estocados a -70°C até o uso.

2.9.7.2. Preparação do extrato de empacotamento congelado-degelado (FTL)

Na preparação do extrato congelado-degelado foi empregada a cepa BHB2688, utilizando-se as mesmas condições de cultivo e indução descritas no item anterior, mas em um volume total de cultura de 1,5 litros. O meio foi totalmente drenado e as células ressuspensas em 3 mL de uma solução gelada de 10% sacarose/50 mM Tris-HCl pH 8,0. Distribuíram-se 6 frações de 0,5 mL em tubos Eppendorf® previamente resfriados em gelo. Adicionaram-se a cada fração 25 μL de solução recém-preparada de lisozima (2 mg/mL em 0,25 M Tris-HCl pH 8,0) e homogeneizou-se. Os tubos foram congelados em nitrogênio líquido e depois deixados descongelar em gelo. A cada tubo foram adicionados 25 μL de tampão de empacotamento e homogeneizou-se. Os extratos foram reunidos em um tubo e centrifugados a 48.000 g por 1 hora a 4°C. Após a centrifugação, removeu-se o sobrenadante e alíquotaram-se volumes de 10 μL em tubos Eppendorf® pré-resfriados. Os tubos foram congelados em nitrogênio líquido e estocados a -70°C até o uso.

2.9.7.3. Reação de encapsidação

Os tubos contendo os extratos de empacotamento foram removidos do estoque a -70°C e descongelados em gelo. Para a reação de encapsidação foram utilizados 5 μL da reação de ligação descrita no item 2.9.6. Adicionaram-se a essa amostra 10 μL do extrato

congelado-degelado (FTL) e 15 μ L do extrato sonicado (SE). Incubou-se à temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida foram adicionados 500 μ L de SM e uma gota de clorofórmio e a biblioteca foi estocada a 4°C.

2.9.8. Determinação do título e taxa de recombinação da biblioteca

A bactéria Y1090 foi cultivada durante a noite a 37°C em meio 2-TY com 0,2% (p/v) de maltose. No dia seguinte a cultura foi centrifugada e ressuspensa em SM para uma D.O.₆₀₀=2,0. Para a titulação e determinação da porcentagem de recombinação na biblioteca foram feitas diluições seriadas em SM de uma alíquota da reação de encapsidação. A cada amostra de 100 μ L foram adicionados 25 μ L de IPTG 0,1 M, 40 μ L de X-Gal (2% p/v em DMSO) e 200 μ L da suspensão de Y1090. Os tubos foram incubados a 37°C por 20 minutos para permitir a adsorção dos fagos na superfície das bactérias. Em seguida cada amostra foi misturada com 3 ml de LB Top Ágar (contendo 10 mM de MgSO₄) pré-aquecido a 48°C e despejada sobre placas de Petri contendo 25 mL de LB ágar. Após solidificação as placas foram incubadas em posição invertida a 37°C por cerca de 18 horas. No dia seguinte a placa contendo um número entre 30 e 300 placas de lise foi selecionada para a contagem. A porcentagem de recombinação foi calculada a partir da razão entre o número de placas de lise brancas (recombinantes) sobre o número total de placas (azuis + brancas).

2.10. Varredura da biblioteca genômica de *T. cruzi* em λ gt11 com anticorpos

2.10.1. Absorção do soro anti-tct

Soros de animais freqüentemente apresentam um alto nível de anticorpos contra antígenos bacterianos. Durante a seleção dos clones recombinantes é desejável a remoção desses anticorpos, afim de se obter respostas mais específicas e reduzir o ruído de fundo. Adaptou-se um método largamente empregado na obtenção de soros destinados à classificação sorotípica de *E. coli* (Ørskov & Ørskov, 1984). Uma colônia da bactéria Y1090 foi inoculada em 400 mL de meio 2-TY e cultivada sob agitação vigorosa a 37°C durante a noite. No dia seguinte a cultura foi distribuída em dois erlenmeyers. Um dos frascos foi autoclavado a 121°C por 1 hora e depois deixado esfriar. À outra alíquota da cultura adicionou-se formaldeído para uma concentração final de 0,5% e incubou-se com agitação a 37°C por 2 horas. As duas suspensões foram reunidas, lavadas duas vezes com 160 mL de tampão TBS pH 8,0 e distribuídas em 8 tubos de centrifuga com tampa de rosca (Sorvall). Os tubos foram centrifugados (6.000 g) e os sobrenadantes desprezados. Os tubos contendo os sedimentos foram estocados a -20°C até o momento do uso.

Um volume de 600 μ L de soro anti-tct foi diluído 1:50 em TBS/BSA 1% totalizando 30 mL. Cada 15 mL do soro foram colocados em um tubo contendo um sedimento bacteriano. Os tubos foram vigorosamente agitados até a total ressuspensão e, em seguida, incubados a 4°C sob agitação leve por 2 horas. Os tubos foram centrifugados a 6.000 g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes transferidos para um novo par de tubos. Os sedimentos foram ressuspensos nos soros a repetiu-se o procedimento descrito acima até concluir 4 ciclos de absorção. Finalmente, após a última centrifugação, o soro foi adicionado de timerosal (0,01 % p/v), aliquotado em volumes de 2,5 mL, e estocado a -20°C até o momento do uso.

2.10.2. Seleção dos clones recombinantes

A biblioteca de λ gt11 foi plaqueada com uma densidade de 10.000 UFP por placa de Petri de 85 mm. Os fagos, diluídos em SM, foram incubados com 200 μ L de uma suspensão de bactérias da cepa Y1090 (D.O.₆₀₀ = 2,0) por 37°C por 20 minutos. Em seguida o material foi misturado a 2,5 mL de λ Top Ágar (contendo 10 mM MgSO₄), pré-fundido a 48°C, e vertido sobre uma placa de Petri contendo λ Ágar. As placas foram incubadas a 42°C até o surgimento das primeiras placas de lise (cerca de 2,5 a 3 horas) e transferidas para uma estufa a 37°C. Neste momento foram colocados sobre as placas filtros de nitrocelulose previamente impregnados com 10 mM IPTG, procedendo-se a uma incubação de 3 horas. Os filtros foram então lavados em TBS por 10 minutos, bloqueados com TBS/20% SFB por 30 minutos e incubados durante a noite com o soro a 4°C. Em seguida os filtros sofreram 5 lavagens de 10 minutos em TBS/0,05% Tween 20 e um novo bloqueio de 30 minutos com TBS/20% SFB. A seguir incubaram-se os filtros com TBS/1% BSA, contendo 5×10^5 cpm/mL de [¹²⁵I] Proteína A em um volume de 5 mL por filtro. Os filtros foram novamente lavados por 5 vezes com TBS/0,05% Tween 20, secos e montados sobre um papel mata-borrão. Procedeu-se à auto-radiografia na presença de uma placa intensificadora de sinal (Du Pont Cronex Lightning Plus) a -70°C com uma exposição de 24 a 48 horas. Este tipo de placa é constituída de tungstato de cálcio, uma das melhores substâncias fosforescentes para uso em placas e que tem um máximo de eficiência em temperaturas muito baixas (Laskey & Mills, 1977; Swanstrom & Shank, 1978). A purificação dos clones foi obtida após três ciclos de replaqueamento e incubação com o soro.

2.11. Varredura de biblioteca genômica de *T. cruzi* em λ EMBL3 com sondas radioativas

Uma biblioteca genômica de *T. cruzi* foi construída no vetor λ EMBL3 por Monika Vieira de Arruda (Arruda *et al.*, 1990). Esta biblioteca contém insertos da ordem de 15 a 20 kb. Para a varredura da biblioteca foi utilizada a bactéria hospedeira Q359 (Karn *et al.*,

1980). Os fagos (10^4 UFP) foram incubados com uma cultura bacteriana ($D.O_{600} = 2,0$) por 15 minutos a 37°C . A mistura foi adicionada a 3 mL de λ Top Ágar (contendo 10 mM MgSO_4) pré-fundido a 48°C e vertida sobre placas com λ Ágar. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite. No dia seguinte foram colocados filtros de nitrocelulose sobre os meios. O posicionamento dos filtros foi feito por meio de perfurações com agulha e as placas foram deixadas a 4°C por 15 minutos. A seguir os filtros foram retirados e réplicas foram feitas através da colocação de novos filtros seguida de mais uma incubação de 15 minutos a 4°C . Os filtros de nitrocelulose foram então colocados sobre papéis de filtro previamente embebidos em solução NaOH 5 N/NaCl 1,5 M. Após 2 minutos, os filtros foram parcialmente secos em papéis absorventes e mergulhados por 15 segundos em solução Tris-HCl 0,5 M pH 7,5/NaCl 3 M. Em seguida as nitroceluloses foram secas em papel de filtro e ao ar por 30 minutos. A fixação do DNA na matriz de nitrocelulose foi feita mediante incubação dos filtros a 80°C por 2 horas.

Os filtros foram colocados em sacos plásticos e incubados a 67°C por 2 horas em tampão de hibridização com 100 $\mu\text{g/mL}$ de DNA de esperma de salmão. Para a hibridização, as sondas foram fervidas por 7 minutos e diluídas para 10^6 cpm/mL em tampão de hibridização com DNA de esperma de salmão. A hibridização foi realizada a 67°C durante a noite. No dia seguinte, os filtros foram submetidos a uma lavagem em solução SSC 3x/SDS 0,1 % (p/v) por uma hora, uma lavagem com SSC 1x/SDS 0,1 % (p/v) por mais uma hora e duas lavagens de 30 minutos em SSC 0,1 x/SDS 0,1 % (p/v). Todas as lavagens foram feitas a 67°C . Os filtros foram secos, colocados sobre um papel mata-borrão e recobertos com uma membrana plástica fina (tipo Magipack). A exposição de filmes de raios X foi feita por 18 a 36 horas, utilizando um intensificador, a -70°C . Após a revelação das chapas, as regiões das placas de Petri correspondentes aos sinais positivos foram identificadas e excisadas com a ponta larga de uma pipeta Pasteur. A porção de ágar excisada foi agitada em 1 mL de SM para liberar os fagos. A solução foi então diluída seriadamente em SM. Escolheram-se as diluições que, quando plaqueadas, permitiram obter placas de lise isoladas. A bactéria hospedeira empregada nestes plaqueamentos foi a Q358 (Karn *et al.*, 1980). Todo o procedimento descrito acima foi repetido, visando identificar e isolar de forma pura, por replaqueamentos, as placas de lise que apresentaram sinal positivo de hibridização.

2.12. Preparação de sondas de DNA radioativas

2.12.1. "Nick-translation"

Amostras de DNA contendo de 100 a 200 ng totais foram utilizadas para a marcação radioativa por "nick translation". Ao DNA foram adicionados 30 μCi de

[α - ^{32}P]dATP; 50 μM dCTP; 50 μM dGTP e 50 μM dTTP; 50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM MgSO_4 ; 10 mM DTT; 100 $\mu\text{g/mL}$ BSA; 1 μL de DNase I (diluição 1:10.000 da preparação comercial) e 5 U de DNA Polimerase I, em um volume total de 50 μL . A reação foi incubada a 16°C por 90 minutos e interrompida pela adição de 2 μL de 0,5 M EDTA pH 8,0. Em seguida o volume foi completado para 100 μL com solução TES.

2.12.2. "Primer extension"

Para esse protocolo foram utilizadas preparações de ssDNA de clones recombinantes no vetor M13, como descrito no item 2.25.2.1. A etapa de hibridização foi feita com 6 μL da preparação de fita molde, 4 μL de solução de iniciador (0,2 picomoles/ μL) e 2 μL de tampão 10x concentrado (54 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,27 M NaCl; 54 mM MgCl_2 ; 6 mM DTT) a 65°C por 30 minutos. Após esfriamento à temperatura ambiente, adicionaram-se 5 μL de uma solução de desoxinucleotídeos (0,5 mM de cada, com exceção de dATP), 50 μCi de [α - ^{32}P]dATP, 0,5 μL de fragmento Klenow da *E.coli* DNA polimerase I (5 U/ μL) e H_2O qsp 20 μL . Incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente e a seguir foram adicionados 2 μL de dATP (0,5 mM). Incubou-se a amostra por mais 5 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 1 μL de EDTA 0,5 M pH 8,0. O volume foi então completado para 100 μL com solução TES.

2.12.3. Remoção dos nucleotídeos não incorporados

Os nucleotídeos não incorporados foram removidos através de gel filtração (Sambrook *et al.*, 1989). Uma seringa de insulina de 1 mL foi empacotada com resina Sephadex® G-50 pré-equilibrada em TES e colocada dentro de um tubo Corex® de 15 mL contendo no seu interior um tubo Eppendorf®. O volume de 100 μL da reação de marcação foi aplicado na seringa. Centrifugou-se a 1.000 rpm por 3 minutos em um centrífuga de mesa. Aplicaram-se mais 50 μL de TES e novamente centrifugou-se. Finalmente, recolheu-se o tubo Eppendorf® contendo a sonda marcada.

2.12.4. Determinação da incorporação dos nucleotídeos radioativos

Transferiu-se 1 μL da solução de sonda radioativa para um tubo Eppendorf® e adicionaram-se 89 μL de pirofosfato de sódio 0,2 M e 10 μL de DNA de esperma de salmão (3 mg/mL). Uma alíquota de 10 μL foi dispensada em um filtro de fibra de vidro (Whatman GF/C), para determinar a radioatividade total. Ao volume restante foram adicionados 0,5 mL de pirofosfato de sódio 0,2 M e 2,5 mL de uma solução de pirofosfato de sódio 0,1 M contendo 20% (p/v) de TCA. A precipitação dos ácidos nucléicos foi feita em gelo por 10 minutos e, a seguir, o conteúdo foi filtrado sob vácuo, em filtro GF/C

previamente equilibrado em solução de pirofosfato de sódio 0,1 M/TCA 5%. O filtro foi lavado com 15 mL de TCA 5% e 5 mL de etanol, e seco em estufa a 67°C. Os filtros foram colocados em frascos contendo 5 mL de solução PPO-POPOP (0,4% difeniloxazol e 0,01% 1,4-bis[5-fenil-2-oxazolil]-benzeno) e a radioatividade foi determinada em contador de cintilação líquida (LKB).

2.13. Preparação de DNA de fago λ

2.13.1. Minipreparação de DNA de fago λ

Utilizou-se um método derivado dos protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989) e Lockett (1990). Uma suspensão contendo a bactéria hospedeira infectada com fagos foi misturada com 3 mL de λ Top Agarose e vertida sobre placas contendo meio λ Agarose. Utilizou-se uma densidade de UFP capaz de formar uma lise confluenta. Após uma incubação a 37°C durante a noite, despejaram-se 3 mL de diluente λ (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgSO_4) sobre as placas que em seguida foram agitadas à temperatura ambiente por 2 horas. O lisado foi recolhido e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. Ao sobrenadante adicionaram-se 5 μL de RNase A (1 mg/mL) e 5 μL de DNase I (1 mg/mL) e incubou-se a 37°C por 30 minutos. Em seguida adicionou-se um volume de solução 20% PEG/2,5 M NaCl e incubou-se por uma hora em gelo. O sedimento contendo os fagos foi ressuspensão em 500 μL de solução 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA; 0,5% SDS; 50 $\mu\text{g/mL}$ Proteinase K e incubado a 65°C por uma hora. O material foi submetido a uma extração com fenol e outra com clorofórmio. O DNA foi precipitado pela adição de 10 μL de 5M NaCl e um volume de isopropanol e posterior incubação a -70°C por 15 minutos. Após uma centrifugação de 15 minutos a 13.000 g, o sedimento de DNA foi lavado com etanol 70%, seco sob vácuo e ressuspensão em 50 μL de TE.

2.13.2. Preparação de DNA de fago λ em larga escala

2.13.2.1. Cultivo de fagos em larga escala

Inoculou-se uma colônia da bactéria hospedeira em 50 mL de caldo 2-TY, acrescido de 0,2% (p/v) de maltose e MgSO_4 10 mM final. O meio foi incubado durante a noite, a 37°C, sob agitação. Dois erlenmeyers de 2 litros, com 500 mL de caldo 2-TY (10 mM MgSO_4) cada um, foram inoculados com 5 mL da cultura, e incubados sob agitação a 37°C, até uma $\text{D.O.}_{600}=0,5$ (cerca de 2×10^{11} células totais por frasco). Cada frasco foi adicionado de 2×10^{10} fagos, mantido em repouso por 10 minutos a 37°C e, em seguida, incubado sob vigorosa agitação a 37°C até a lise das células bacterianas. Adicionaram-se a cada frasco 10 mL de clorofórmio e procedeu-se a uma incubação de 30 minutos a 37°C, sob agitação. Tal

medida visou lisar as células ainda remanescentes no meio. Em seguida foram dissolvidos 30 g de NaCl em cada frasco. As culturas foram mantidas em gelo por uma hora e a seguir centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos, a 4°C. Ao sobrenadante adicionou-se lentamente PEG 8000, até a concentração atingir 10% (p/v). A suspensão de fagos foi incubada a 4°C durante a noite, com agitação lenta, e centrifugada no dia seguinte a 10.000 g por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as paredes dos tubos foram secas com algodão. O sedimento contendo os fagos foi ressuspense em 20 mL de TSM (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl e 10 mM MgCl₂). A suspensão foi submetida a uma ultracentrifugação em gradiente descontínuo, com 9 mL de 3 M CsCl e 9 mL de 5 M CsCl em TSM, a 22.000 rpm por 90 minutos, em rotor Beckman SW 27, a 18°C. A banda opalescente de fagos, formada na interface 3M/5M de CsCl, foi recolhida e colocada em um tubo de 13,2 mL do rotor Beckman SW 41. O volume dos tubos foi completado com uma solução 4 M de CsCl em TSM, e as amostras foram centrifugadas a 38.000 rpm por 18 horas, a 18°C. A banda de fagos, com cerca de 1 mL, foi coletada e guardada a 4°C até posterior purificação do DNA.

2.13.2.2. Purificação de DNA de fago λ

A suspensão de fagos foi dialisada contra 1.000 volumes de TSM por uma hora. Trocou-se o tampão e dialisou-se por mais uma hora. A seguir adicionaram-se a cada amostra de fagos Proteinase K (50 µg/mL), 20 mM EDTA e 0,5% (p/v) de SDS. Incubou-se a 67°C por uma hora. A seguir as amostras foram extraídas duas vezes com fenol, e cinco vezes com clorofórmio. A suspensão aquosa de fagos foi então dialisada contra 1000 volumes de TE, com 3 trocas, a 4°C. A concentração do DNA foi determinada pela medição da absorbância a 260 nm. O grau de pureza foi estimado pelo quociente entre as leituras obtidas a 260 e 280 nm.

2.14. Purificação de DNA de plasmídeo

2.14.1. Minipreparações de DNA de plasmídeo

Seguiu-se basicamente o método da lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Uma colônia da bactéria contendo o plasmídeo foi inoculada em 10 mL de caldo 2-TY (com 50 µg/mL de ampicilina) e incubada a 37°C durante a noite, sob agitação. A seguir 1,5 mL da cultura foram transferidos para um tubo Eppendorf® e centrifugados por 1 minuto em microcentrífuga (13.000 g). O sobrenadante foi aspirado e o sedimento bacteriano foi ressuspense em 100 µL de uma solução fria de 50 mM glicose/10 mM EDTA/25 mM Tris.Cl pH 8,0. Incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos e, a seguir, adicionaram-se 200

μL de uma solução NaOH 0,2 N/SDS 1 % (p/v). O tubo foi invertido rapidamente por 3 vezes para uma homogeneização e posteriormente foram adicionados 150 μL de uma solução fria de acetato de potássio 3 M pH 4,8. Agitou-se o tubo por 10 segundos e centrifugou-se a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e extraído com volume igual de fenol/clorofórmio e depois clorofórmio. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e o DNA precipitado com 2 volumes de etanol, à temperatura ambiente, por 2 minutos. O tubo foi centrifugado por 5 minutos à temperatura ambiente e o sedimento de DNA plasmidial, lavado duas vezes com etanol 80 %/TE. A seguir o sedimento foi seco sob vácuo por 30 minutos e ressuspensão em 50 μL de TE contendo 20 $\mu\text{g/mL}$ de RNase livre de DNase. Esse tipo de preparação foi utilizada para obter DNA destinado a digestões por enzimas de restrição, visando identificar a presença de um inserto em clones recombinantes.

2.14.2. Minipreparações rápidas de DNA ("speed preps").

Para a seleção de clones com seqüências sobrepostas gerados pela digestão com Exonuclease III (ver item 2.25.1) utilizou-se um protocolo originalmente descrito por He *et al.* (1990) para digestões por enzimas de restrição e posteriormente aplicado ao seqüenciamento de DNA (Goode & Feinstein, 1992). Esta técnica permite a realização de um número muito grande de preparações em um tempo muito curto, gerando um DNA de pureza suficiente para a digestão com enzimas de restrição ou mesmo uma reação de seqüenciamento.

Colônias bacterianas contendo o plasmídeo recombinante foram inoculadas em 2 mL de caldo 2-TY (contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina) e cultivadas a 37°C durante a noite. No dia seguinte 1,5 mL do meio foram transferidos para um tubo Eppendorf® e centrifugados por 30 segundos. O sedimento bacteriano foi ressuspensão em 100 μL de solução TELT (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 62,5 mM EDTA; 2,5 M LiCl; 4% (v/v) Triton X-100) e extraído com 100 μL de fenol saturado com Tris-HCl pH 8,0/clorofórmio 1:1, agitando-se vigorosamente por 10 segundos cada tubo. Após centrifugação de 2 minutos em microcentrífuga (13.000 g), a fase superior foi cuidadosamente removida e transferida para um tubo contendo 200 μL de etanol gelado. O tubo foi agitado rapidamente e centrifugado por 5 minutos. O sedimento contendo o DNA foi lavado com etanol 70%, seco sob vácuo por 15 minutos e ressuspensão em 20 μL de TE contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de RNase A.

2.14.3. Midipreparação de DNA de plasmídeo

Para a obtenção de DNA plasmidial, em quantidade e pureza adequadas para a determinação de mapas de restrição e seqüência nucleotídica, procedeu-se ao método da

lise alcalina baseado no protocolo de Davis *et al.* (1986). Bactérias contendo o plasmídeo recombinante foram inoculadas em 20 mL de caldo 2-TY (contendo 50 µg/mL de ampicilina) e incubadas a 37°C durante a noite. No dia seguinte as células foram centrifugadas a 5.000 g por 10 minutos. O sedimento bacteriano foi ressuspensão em 600 µL de tampão com glicose (50 mM glicose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl pH 8,0) e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionaram-se então à amostra 1,2 mL de solução 0,2 N NaOH/1% SDS e incubaram-se os tubos por 5 minutos em gelo. O material foi transferido para tubos Corex® com capacidade de 15 mL e adicionado de 900 µL de solução gelada de acetato de potássio (3M, pH 4,8). A seguir centrifugaram-se os tubos a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido a outro tubo e o DNA precipitado com um volume de isopropanol a -20°C por 15 minutos. Após uma centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4°C, o sedimento de DNA foi ressuspensão em 1,5 mL de TE, adicionado de RNase A (livre de DNase) na concentração final de 50 µg/mL e incubado por 20 minutos a 37°C. O DNA foi extraído uma vez com um volume de fenol e uma vez com um volume de clorofórmio. A seguir o DNA foi precipitado pela adição de acetato de sódio (pH 5,2) na concentração de 0,3 M e 2,5 volumes de etanol, com uma incubação a -20°C por 30 minutos. Após uma centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4°C, o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70% e seco sob vácuo. Finalmente, o DNA foi ressuspensão em 200 µL de TE, o que corresponde a uma concentração de DNA de cerca de 250 µg/mL.

2.1.4.4. Preparação de DNA de plasmídeo em gradiente de cloreto de cézio

Foi utilizado um método comunicado pessoalmente pelo Dr. Hernando del Portillo (Depto. de Parasitologia, ICB - USP). Células bacterianas contendo o plasmídeo foram cultivadas em 200 mL de caldo 2-TY (contendo 50 µg/mL de ampicilina) a 37°C durante a noite. No dia seguinte as bactérias foram centrifugadas a 5.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Os sedimentos ressuspensos em 1,5 mL de solução STE (25% p/v sacarose; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM EDTA pH 8,0) foram transferidos para tubos Beckman #326819 (Polyallomer) e adicionados de 100 µL de lisozima (20 mg/mL). Após uma incubação de 5 minutos em gelo, foram adicionados 2,3 mL de Solução de Triton X-100 e incubou-se por mais 20 minutos em gelo. A seguir os tubos foram centrifugados a 45.000 rpm por 20 minutos a 15°C em rotor Beckman SW 50.1. O sobrenadante foi misturado a 3,8 g de cloreto de cézio e 200 µL de brometo de etídio (10 mg/mL) e incubado em gelo, no escuro, por uma hora. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C em rotor Sorvall SS-34. O sobrenadante foi transferido para um tubo Beckman #344075 (Quick-Seal/Ultra-Clear). Centrifugaram-se os tubos em rotor Beckman VTi-65 a 45.000 rpm por 16 horas a 15°C. Os tubos foram iluminados com luz UV. de onda longa e a banda correspondente ao plasmídeo foi removida com agulha e seringa em um volume de 1

mL. O DNA foi extraído 5 vezes com uma solução de 2-propanol saturado em solução aquosa saturada com NaCl. Esta etapa tem a finalidade de remover o brometo de etídio, bem como trocar os íons de césio por sódio. O volume das amostras foi aumentado com TE para 4 mL e o DNA foi precipitado pela adição de 8 mL de etanol e posterior incubação a -20°C por pelo menos 2 horas. Após uma centrifugação a 12.000 g a 4°C por 15 minutos, o sedimento de DNA foi lavado com etanol 70%, seco sob vácuo e ressuspenso em 500 µl de TE. A concentração de DNA foi determinada através da medida da absorbância a 260 nm (assumindo 1 D.O.₂₆₀ = 50 µg de DNA/mL).

2.15. Subclonagem de fragmentos de DNA

2.15.1. Digestão do DNA com enzimas de restrição

As amostras de DNA foram digeridas em um volume final de 20 a 50 µl com a enzima de restrição desejada (2 a 5 U/µg de DNA), incubando-se a 37°C por 3 a 5 horas. Utilizou-se o tampão recomendado pelo fabricante (New England Biolabs) para cada enzima. Nas digestões múltiplas utilizou-se o sistema de 4 tampões do fabricante. Alternativamente foi empregado um sistema de três tampões: sem sal, médio sal (50 mM final de NaCl) ou de alto sal (100 mM NaCl), descrito por Fuchs & Blakesley (1983) e cuja composição está descrita abaixo. Além disso, todas as digestões foram efetuadas na presença de 1 mM final de espermidina. Foi demonstrado (Bouché, 1981) que a espermidina melhora a eficiência da digestão, possivelmente porque, sendo uma poliamina, tem a capacidade de se ligar ao DNA e deslocar moléculas que poderiam inibir a digestão.

Tampão de restrição com baixo sal pH 8,0 5x concentrado - 250 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 500 µg/mL BSA.

Tampão de restrição com médio sal pH 8,0 5x concentrado - 250 mM Tris-HCl pH 8,0; 250 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 500 µg/mL BSA.

Tampão de restrição com alto sal pH 8,0 5x concentrado - 250 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 500 µg/mL BSA.

Após a incubação, a amostra foi aquecida a 65°C por 5 minutos para inativar a enzima, o DNA foi extraído com fenol e clorofórmio, e precipitado com acetato de sódio e etanol a -20°C por 2 horas.

2.15.2. Eletroforese em minigel de agarose

Com a finalidade de monitorar a eficiência das digestões com enzimas de restrição, utilizou-se um gel de agarose com uma concentração de 0,7% a 1,2%, em função da faixa de resolução desejada. Para a preparação do gel, a agarose foi misturada com uma solução de TBE 1x e fundida em forno de microondas. Após o resfriamento do gel até 60°C, adicionou-se brometo de etídio para uma concentração final de 0,5 µg/mL. Amostras de DNA, previamente acrescidas de tampão de amostra de DNA 6x concentrado (30% v/v glicerol; 0,25% p/v azul de bromofenol; 0,6% p/v SDS; 60 mM EDTA, pH 8,0), foram aquecidas a 65°C por 5 minutos e imediatamente colocadas em gelo e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi feita em tampão TBE 1x contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, sob tensão constante de 8 V/cm em cubas pequenas ou até uma voltagem total de 150 V, no sistema de minigel da Hoefer. Como marcador de peso molecular foi utilizado o DNA de λ cl857 digerido com *HindIII* ou com *EcoRI/HindIII*.

2.15.3. Purificação de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose de baixo ponto de fusão (agarose LMP)

O DNA foi digerido com a(s) enzima(s) de restrição apropriada(s) e submetido a uma eletroforese em um gel de agarose de baixo ponto de fusão em tampão TAE 1x, na concentração de 1,0 %. A corrida eletroforética foi feita à temperatura ambiente com uma circulação contínua de tampão, a fim de manter o pH homogêneo em toda a cuba ao longo da corrida eletroforética. Foi utilizado brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL no gel e no tampão de corrida. Após a corrida, o gel foi iluminado com uma lâmpada de UV de ondas longas e as bandas desejadas foram excisadas com um estilete. Os fragmentos de agarose foram colocados no interior de tubos Eppendorf® previamente pesados. O volume do fragmento de agarose excisado foi estimado pela diferença de peso dos tubos. As amostras foram colocadas em um banho de água a 67°C por 5 minutos para fundir a agarose LMP e então adicionaram-se 5 volumes de solução 50 mM Tris pH 7,5/2 mM EDTA pH 8,0. Os tubos foram novamente mantidos em banho a 67°C por mais 10 minutos e, em seguida, as amostras foram extraídas com fenol, fenol/clorofórmio e clorofórmio. O DNA foi precipitado mediante a adição de 0,5 volume de acetato de amônio 7,5 M pH 6,0 e incubação durante a noite a -20°C. Após uma centrifugação de 15 minutos a 13.000 rpm, o sedimento de DNA foi lavado com TE/etanol 80%, seco sob vácuo por 20 minutos e ressuspenso em 50 µl de TE. Um volume de 5 µl da amostra foi aplicado em um minigel de agarose e submetido à eletroforese. A visualização da banda purificada permitiu estimar a concentração de DNA, bem como a pureza do fragmento recuperado.

2.15.4. Reação de ligação

A reação de ligação foi realizada com cerca de 20 ng totais de DNA e relações molares vetor/inserto de 1:1, 1:3 e 1:5. As condições finais da reação foram 60 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT e 1 U Weiss de T4 DNA ligase, em um volume total de 20 µL. A incubação foi feita a 18°C durante a noite.

2.15.5. Preparação de células bacterianas competentes e transformação

A preparação de células competentes foi feita de acordo com o protocolo de Hanahan (1985). Uma colônia em placa da bactéria hospedeira foi utilizada para inocular um Erlenmeyer contendo 20 mL de meio 2-TY. O frasco foi cultivado durante a noite a 37°C. Um inóculo desta cultura foi adicionado a cem volumes de caldo SOB contendo 10 mM MgSO₄. Procedeu-se a uma incubação a 37°C, sob agitação, até que a D.O.₆₀₀ atingisse um valor entre 0,4 a 0,6. O frasco foi então mantido em gelo por 10 minutos e, em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 1.000 g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi muito bem drenado e as células bacterianas foram ressuspensas em 1/3 do volume inicial em TFB (100 mM KCl; 45 mM MnCl₂.4H₂O; 10 mM CaCl₂.2H₂O; 3 mM cloreto de hexaminocobalto; 10 mM K-MES, pH 6,3). Seguiu-se uma incubação de 10 minutos em gelo e nova centrifugação. As células foram então ressuspensas em 1/12,5 do volume original em TFB, e adicionou-se 3,5% v/v de DnD (1 M DTT; 90% DMSO; 10 mM acetato de potássio, pH 7,5). Procedeu-se a uma incubação de 10 minutos em gelo e adicionou-se mais DnD, para completar 7,0% final, seguindo-se mais uma incubação de 10 a 20 minutos em gelo. A suspensão de células foi transferida para tubos de ensaio previamente resfriados, em alíquotas de 200 µl. Para a transformação adicionou-se o DNA da respectiva amostra e incubou-se por 20 a 40 minutos em gelo. As células transformadas foram então submetidas a um choque térmico a 42°C por 90 segundos e nova incubação no gelo por 2 minutos. No caso de plasmídios, o conteúdo dos tubos foi espalhado com uma alça de Drigalski sobre placas de Petri contendo LB Ágar. No caso específico dos vetores pBluescript[®] e pUC, foram aplicadas com uma alça de Drigalski 65 µl de X-Gal (2% p/v) e 25 µl de IPTG (0,1 M) nas placas de LB Ágar, antes do plaqueamento das bactérias transformadas. Para o plaqueamento de clones de M13, o IPTG e X-Gal foram adicionados a 3 mL de Top Ágar ainda fundido. Em seguida a suspensão de células foi misturada ao meio e vertida sobre placas de LB ágar. As colônias ou placas contendo o vetor recombinante apresentam coloração branca, enquanto que as não recombinantes desenvolvem uma cor azul. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite.

2.15.6. Identificação dos clones recombinantes

No caso da subclonagem no vetor pBluescript[®], as colônias brancas obtidas a partir da transformação foram cultivadas em caldo 2-TY, seguindo-se minipreparações de DNA plasmidial, como descrito no item 2.14.1. As amostras de DNA foram digeridas com as enzimas de restrição apropriadas (ver item 2.15.1) e submetidas a uma eletroforese em um minigel de agarose como descrito (item 2.15.2). Os clones foram identificados em função da presença e tamanho dos respectivos insertos. Nas subclonagens efetuadas no vetor M13, as placas brancas foram utilizadas como inóculos para a preparação de moldes de fita simples destinados ao seqüenciamento de DNA. A confirmação da subclonagem foi feita por seqüenciamento do DNA e comparação com o vetor não recombinante.

2.16. Expressão dos antígenos clonados

2.16.1. Expressão das proteínas de fusão em bactérias lisogênicas de λ gt11

2.16.1.1. Obtenção de bactérias lisogênicas

Foram utilizadas células da cepa Y1089, que apresenta alta frequência de lisogenização. Uma colônia foi inoculada em um frasco com 20 mL de meio LB (contendo 0,2% maltose e 50 μ g/mL ampicilina) e incubou-se a 37°C durante a noite. Esta cultura fresca foi utilizada como inóculo, na diluição 1:100, de outro Erlenmeyer com 20 mL de LBM. A incubação foi feita a 37°C, sob agitação, até a cultura atingir uma D.O.₆₀₀ = 1,25 ($\pm 10^9$ bactérias/mL). Foram testadas três multiplicidades de infecção: 100x, 500x e 1000x. Para cada infecção misturaram-se em um tubo 200 μ L de um lisado de λ gt11 recombinante de título conhecido, e um volume apropriado da cultura de Y1089, conforme a multiplicidade desejada. Os tubos foram mantidos a 32°C por 30 minutos. A cultura de cada tubo foi semeada em estrias até o esgotamento em uma placa de meio LB Ágar (com ampicilina 50 μ g/mL). As placas foram incubadas a 32°C durante a noite. Cerca de 15 colônias isoladas de cada placa foram coletadas com alça de platina e ressuspensas individualmente em 200 μ L de caldo LB. De cada suspensão foram feitas inoculações de 2 μ L, em duplicata, sobre placas de LB Ágar. Uma placa foi incubada a 30°C e a outra a 42°C, por cerca de 18 horas. As bactérias lisogênicas crescem a 30°C mas não a 42°C, devido ao ciclo lítico do fago λ . As colônias presentes somente na placa cultivada a 30°C foram então escolhidas.

2.16.1.2. Expressão das proteínas de fusão por indução das bactérias lisogênicas

Uma colônia da bactéria lisogênica foi utilizada como inóculo de um Erlenmeyer com 10 mL de caldo LBM. Incubou-se a 32°C até a cultura atingir $D.O_{600} = 0,5$. Procedeu-se à indução em banho de água a 65°C e, através de um termômetro inserido dentro do frasco, deixou-se o meio atingir 42°C. O frasco foi então colocado rapidamente em um banho a 42°C e mantido sob agitação vigorosa durante 20 minutos. Aliquotas de 1 mL foram transferidas para 5 tubos de vidro previamente colocados em banho de água a 37°C. Em 4 dos tubos foi adicionado IPTG para 10 mM final (110 µL de uma solução 100 mM de IPTG). Os tubos com IPTG foram incubados sob agitação a 37°C por períodos de 30, 60, 90 e 120 minutos, enquanto o tubo sem IPTG permaneceu incubando por 90 minutos. Ao final da incubação cada amostra foi transferida para um tubo Eppendorf® e centrifugada a 12.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o sedimento ressuspensionado em 200 µL de tampão de amostra de proteína, fervido por 3 minutos e analisado em SDS-PAGE.

2.16.2. Subclonagem de B12 e B13 em pMSgt11 e expressão (fusão com β-galactosidase)

2.16.2.1. Purificação dos insertos e ligação com o vetor

O DNA dos fagos recombinantes B12 e B13 foi obtido por minipreparações (ver item 2.13.1), digerido com *EcoRI* (ver item 2.15.1.) e submetido a uma eletroforese em gel de agarose LMP. Os respectivos insertos foram purificados a partir de uma eletroforese em gel de LMP agarose (ver item 2.15.3). O DNA dos insertos foi ligado ao DNA do vetor pMSgt11 previamente linearizado com *EcoRI* conforme técnica descrita anteriormente (item 2.15.4). O DNA foi então utilizado para transformar células competentes da cepa DH5α (ver item 2.15.5).

2.16.2.2. Imunoensaio de colônias bacterianas

O vetor pMSgt11 apresenta um sítio de *EcoRI* no mesmo passo de leitura do vetor λgt11, de forma que insertos subclonados, desde que na orientação adequada, expressam corretamente a mesma proteína. Para se determinar quais colônias bacterianas transformadas continham o inserto ligado na orientação correta, utilizou-se um ensaio de seleção imunológica. Empregou-se o método descrito por Helfman *et al.* (1983) com algumas modificações.

Placas de LB Ágar (contendo ampicilina 50 µg/mL) inoculadas com as bactérias transformadas foram incubadas durante a noite a 37°C. No dia seguinte as colônias de cada placa foram cobertas com um filtro de nitrocelulose (Millipore HATF). O

posicionamento do filtro foi marcado com uma agulha. Os filtros foram retirados lentamente, tomando-se o cuidado de não arrastar as colônias. Os filtros foram então colocados sobre novas placas com meio LB/ampicilina, com as colônias voltadas para cima. As placas originais e réplicas foram incubadas a 37°C por 2 horas. A seguir os filtros, com as colônias para cima, foram colocados sobre folhas de papel Whatman 3MM previamente embebidas em solução de SDS 1% (p/v). Após uma incubação de 15 minutos, os filtros foram colocados dentro de uma cuba saturada com vapores de clorofórmio e deixados a 37°C por 15 minutos. Em seguida procedeu-se a uma lavagem dos filtros por uma hora em tampão TBS com BSA 3% (p/v), lisozima 10 µg/mL e DNase I 5 µg/mL. Os filtros foram então incubados em dupla, dentro de sacos plásticos, com o soro anti-tct na diluição 1:200, durante a noite a 4°C. No dia seguinte procedeu-se a 5 lavagens de 10 minutos com TBS/Tween 20 0,05 % (v/v) e uma lavagem em TBS/BSA 1 % (p/v) por 30 minutos. A seguir os filtros foram incubados durante uma hora com [¹²⁵I] Proteína A diluída em TBS/BSA 1% (10⁶ cpm/mL). Após 5 lavagens de 10 minutos em TBS/Tween 20 os filtros foram secos ao ar e submetidos à auto-radiografia em filmes de raios X, com uma placa intensificadora. A exposição foi feita por 18 a 36 horas a -70°C. As colônias das placas originais, reconhecidas pelo soro, foram inoculadas em novas placas e utilizadas para os ensaios de expressão das proteínas de fusão.

2.16.2.3. Produção das proteínas de fusão

Bactérias da cepa DH5α contendo o vetor pMSgt11 recombinante foram inoculadas em placas de ágar LB/ampicilina de forma a se obter colônias isoladas. Inoculou-se uma colônia em 10 mL de caldo 2-TY/ampicilina e procedeu-se a uma incubação a 37°C, sob agitação, durante a noite. No dia seguinte utilizou-se 1 mL da cultura como inóculo de 100 mL de caldo 2-TY. O meio foi incubado sob agitação a 37°C por 7 horas. Após esse período a cultura foi centrifugada a 6.000 g por 10 minutos a 4°C. O sedimento bacteriano foi congelado em gelo seco/acetona e estocado a -20°C até o momento do uso.

2.16.2.4. Obtenção do lisado bacteriano

O sedimento bacteriano foi ressuspensado em 10 mL de tampão de lise TSM (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 10 mM) adicionado de PMSF e TLCK para 1 mM final e de lisozima 0,2 mg/mL. Incubou-se à temperatura ambiente por 20 minutos para se obter a lise celular. O volume do lisado foi aumentado com a adição de mais 20 mL de TSM, e submetido a 3 ciclos de 10 segundos de sonicação (Modelo W185D - Heat Systems, Ultrasonics Inc.) na unidade 4 de intensidade. Este procedimento visou fragmentar parcialmente o DNA e reduzir a viscosidade da solução.

Alternativamente, quando se buscava obter uma pequena amostra de lisado, destinada a uma eletroforese, foi empregado um outro método. Um volume de 1 mL da cultura foi centrifugado em tubo Eppendorf® por 1 minuto. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspense em 200 µl de tampão de amostra de proteína (ver item 2.19). Como esse tampão já contém SDS, a lise bacteriana é quase instantânea. A solução foi então fervida por 3 minutos e analisada em géis de poliacrilamida com SDS.

2.16.2.5. Determinação da solubilidade das proteínas de fusão

As proteínas de fusão freqüentemente formam corpúsculos de inclusão insolúveis nas células bacterianas, que podem ser facilmente purificados. Para verificar se as proteínas de fusão estavam presentes nesses corpúsculos seguiu-se o protocolo desenvolvido por Marco Krieger (FIOCRUZ/RJ), modificado a partir de Marston (1987). Partiu-se de 3 mL do lisado bacteriano, correspondente a 10 mL da cultura original, e aumentou-se o volume com TSM para 20 mL. O lisado foi centrifugado a 8.000 g por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi então submetido a uma sequência de ciclos de lavagem/centrifugação utilizando, respectivamente, TSM, TSM/Triton X-100 0,1 % (v/v) e TSM/Triton X-100 0,5 % (v/v). Todos os precipitados foram ressuspensos em 20 mL (2 vezes o volume original da cultura). Após a última centrifugação o sedimento foi ressuspense em 1 mL (1/10 do volume original) de TSM/uréia 6 M e incubado a 37°C por uma hora. Em seguida centrifugou-se a 22.000 g por 30 minutos. A solução foi então dialisada durante a noite contra 1.000 volumes de TSM, com uma troca. Esta solução e os demais sobrenadantes obtidos durante a execução do protocolo foram liofilizados e utilizados para análise por eletroforese em géis de poliacrilamida com SDS.

2.16.2.6. Cromatografia de afinidade em colunas de pAPTG-agarose

As proteínas de fusão presentes no lisado bacteriano foram purificadas por cromatografia de afinidade, segundo o método de Steers *et al.* (1971). Uma coluna de vidro com 7 mm de diâmetro por 10 cm de altura foi empacotada com 1 mL da resina pAPTG-agarose. A resina foi equilibrada com TSM e 8 mL de lisado bacteriano (ver item 2.16.2.4) foram aplicados na coluna. Esse volume foi reciclado por 5 vezes, com um fluxo de uma gota a cada 15 segundos. A seguir a coluna foi lavada com 30 mL de TSM e as proteínas de fusão eluídas em tampão tetraborato de sódio 0,1 M com pH 10,0. Foram recolhidas frações de 1 mL em um total de 20 mL. A coluna foi reequilibrada em TSM, podendo ser reutilizada cerca de 6 a 8 vezes. No sistema de expressão DH5α/pMSgt11 as proteínas de fusão mantêm a atividade enzimática. Dessa forma, as frações coletadas foram analisadas quanto à atividade enzimática da β-galactosidase quimérica. As frações ativas foram reunidas e

dialisadas durante a noite contra 1000 volumes de água destilada, com uma troca. Em seguida determinou-se a concentração protéica pelo método de Hartree (1972) e a solução foi alíquotada e liofilizada.

2.16.2.7. Detecção da atividade de β -galactosidase

Para a identificação das frações ativas da separação cromatográfica foi utilizado um microensaio qualitativo baseado no método descrito por Steers *et al.* (1971). Volumes de 100 μ L do substrato ONPG (0,75 g/L em tampão TSM) foram dispensados em tubos Eppendorf® e incubados a 37°C por 5 minutos. Em seguida foram adicionadas alíquotas de 2,5 μ L de cada fração. Os tubos foram agitados e deixados à temperatura ambiente por 5 minutos. O desenvolvimento de uma coloração amarela indicava qualitativamente a atividade da enzima β -galactosidase.

2.16.3. Subclonagem e expressão do fragmento S3S4 em pGEX3X (fusão com GST)

2.16.3.1. Construção do clone pGEX3X-S3S4

O DNA do clone BGE 7 (ver figura 8) teve o fragmento S3S4 subclonado no vetor pBluescript® conforme técnica descrita anteriormente (itens 2.15.1 a 2.15.6). O DNA de pBluescript®-S3S4 foi digerido com a enzima *HincII*, que cliva todo sítio de *SaII*, mas gera fragmentos com extremidades alinhadas. O DNA foi submetido a uma eletroforese em LMP agarose e a banda de 1,85 kb, correspondente ao fragmento S3S4, foi excisada e purificada conforme técnica descrita no item 2.15.3. Adaptadores de *EcoRI* de 8, 10 e 12 pb foram fosforilados com [γ -³²P]ATP (ver itens 2.9.2 e 2.9.3) e ligados ao DNA de S3S4. A seguir a amostra foi digerida com *EcoRI* e a eficiência das reações de ligação e digestão foi monitorada em gel de poliacrilamida seguido de auto-radiografia (ver item 2.9.4). Posteriormente o DNA foi submetido a uma nova eletroforese em gel de LMP agarose com a finalidade de eliminar o excesso de adaptadores não ligados. A banda de 1,85 kb foi excisada e purificada e, a seguir, ligada ao DNA do vetor pGEX3X, previamente digerido com *EcoRI* (como descrito no item 2.15.4). O DNA ligado foi utilizado para transformar células bacterianas da cepa DH5 α (conforme item 2.15.5). Para a seleção dos clones positivos, que apresentam o inserto ligado na orientação e passo de leitura corretos, foi utilizado o imunoensaio de colônias.

Para o imunoensaio de colônias bacterianas utilizou-se basicamente o protocolo relatado no item 2.16.2.2. A única diferença é que os filtros de nitrocelulose, utilizados para a obtenção de placas réplicas, foram previamente impregnados com uma solução 10 mM de IPTG. Além disso, espalharam-se com uma alça de Drigalski 40 μ L de 100 mM IPTG sobre as

placas de LB/Ampicilina, antes da aplicação dos filtros réplicas. Esse procedimento visou induzir a produção das proteínas de fusão. O imunoenensaio foi realizado com o soro anti-tet na diluição 1:200, previamente absorvido contra antígenos bacterianos (ver item 2.10.1).

2.16.3.2. Cinética de expressão da proteína de fusão GST-S3S4

Para se testar as melhores condições de expressão da proteína recombinante GST-S3S4 no vetor pGEX, cada colônia bacteriana foi inoculada em 2 mL de caldo 2-TY (contendo 100 µg/mL de ampicilina). Após uma incubação de uma hora a 37°C, adicionou-se IPTG para uma concentração final de 0,1 mM. Foram testados períodos de incubação pós-indução de 1, 2, 3 e 4 horas. Volumes de 1 mL da cultura foram centrifugados em tubos Eppendorf® por um minuto. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 200 µL de tampão de amostra de proteína. Após uma homogeneização, os tubos foram fervidos por 3 minutos e alíquotas de 20 µL foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (segundo Laemmli, 1970 - ver item 2.19). Após a corrida gel foi corado com azul de Coomassie ou então transferido para nitrocelulose para um ensaio de Western blot.

2.16.3.3. Produção de proteína de fusão

2.16.3.3.1. Cultivo das células e indução

Uma colônia bacteriana foi inoculada em 10 mL de caldo 2-TY (com ampicilina) e o meio incubado a 37°C durante a noite. No dia seguinte procedeu-se a uma subcultura em 100 mL de caldo 2-TY, com posterior incubação por 90 minutos a 37°C. Após esse período, adicionou-se IPTG para uma concentração final de 0,1 mM e prolongou-se a incubação por mais três horas e meia. O meio foi então centrifugado a 5.000 g por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O sedimento bacteriano foi congelado rapidamente em gelo seco com etanol, e armazenado a -20°C até o momento de ser utilizado para a purificação da proteína de fusão.

2.16.3.3.2. Obtenção do lisado das células bacterianas

Um sedimento bacteriano resultante de 100 mL de cultura foi ressuspenso em PBS (150 mM NaCl; 16 mM Na₂HPO₄; 4 mM NaH₂PO₄; pH 7,3) contendo inibidores de proteases (1 mM final de PMSF e TLCK). A suspensão foi submetida a 3 ciclos de 10 segundos de sonicação (Heat Systems, Ultrasonics Inc. - Modelo W185D) na unidade 4 de intensidade. A seguir o lisado foi centrifugado a 13.000g por 10 minutos a 4°C. Adicionou-se Triton X-100

para uma concentração final de 1%. Este detergente tem a finalidade de diminuir as interações inespecíficas entre componentes do lisado bacteriano e a resina de GSH-agarose.

2.16.3.4. Purificação da proteína GST-S3S4

2.16.3.4.1. Cromatografia de afinidade

2.16.3.4.1.1. Cromatografia de afinidade em resina de GSH-agarose

Um volume de 10 mL de lisado bacteriano foi incubado em lote com 1 mL de resina GSH-agarose, previamente equilibrada em PBS pH 7,3. Procedeu-se a uma incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação leve. O material foi centrifugado a 1.000 rpm por 3 minutos em centrífuga de mesa (Beckman - modelo TJ-6 com rotor TH4) e lavado por 4 vezes com 15 mL de PBS. A eluição foi feita com 1 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0/GSH 5 mM, incubando-se por 2 minutos. Dois ciclos subsequentes de eluição foram realizados e o eluato total foi dialisado durante a noite contra 1.000 volumes de PBS, a 4°C. A concentração protéica foi determinada segundo o método de Hartree (1972). A resina, após a eluição, foi lavada com 15 mL de PBS e estocada a 4°C com timerosal 0,01% (p/v) até um mês.

2.16.3.4.1.2. Detecção da atividade enzimática de GST

Foi padronizado um sistema semi-quantitativo de detecção da atividade enzimática de GST, modificado a partir do protocolo de Simons & Vander Jagt (1977). Para a reação foram dispensados em um tubo 167 µL de tampão fosfato (0,2 M KH_2PO_4 , 0,1 M Na_2HPO_4 , pH 6,5), 100 µL de GSH (25 mM em H_2O), 40 µL de CDNB (25 mM em etanol) e 683 µL de H_2O . O tubo foi incubado a 37°C por 5 minutos e a seguir adicionaram-se 10 µL da amostra contendo a enzima (lisado bacteriano ou a proteína pura). Após uma incubação de 5 minutos, o tubo foi colocado em gelo e procedeu-se à determinação da absorbância da amostra a 340 nm.

2.16.3.4.2. Precipitação seletiva

2.16.3.4.2.1. Precipitação da proteína de fusão GST-S3S4

Bactérias contendo pGEX3X-S3S4 foram induzidas e lisadas por tratamento com lisozima e sonicação (como descrito nos itens 2.16.3.3.1 e 2.16.3.3.2). A diferentes alíquotas destes lisados foram adicionados os seguintes reagentes: 1% Triton[®] X-100, 0,03% SDS, 10

mM DTT e 0,03% SDS + 10 mM DTT. As alíquotas foram incubadas a 37°C por 10 minutos e a seguir centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos (rotor Sorvall SS-34). Os respectivos sedimentos e sobrenadantes foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida. Este experimento visou determinar a ação dos agentes acima sobre a solubilidade da proteína. .

2.16.3.4.2.2. Ressolubilização da proteína de fusão GST-S3S4

Sedimentos contendo a proteína de fusão foram ressuspensos e incubados por 5 minutos a 37°C nos seguintes tampões de concentração 50 mM, contendo NaCl 150 mM: glicina pH 2,3; acetato pH 4,0; citrato pH 5,0; fosfato pH 7,0; Tris-HCl pH 8,0; Tris-HCl pH 9,0; bicarbonato pH 9,6; dietilamina pH 11,5. Após a incubação as amostras foram centrifugadas por 3 minutos em microcentrífuga (13.000 g). Os sobrenadantes e sedimentos respectivos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida.

2.17. Utilização das proteínas de fusão no diagnóstico sorológico da doença de Chagas

2.17.1. Radioimunoensaio em microplacas

Foram utilizadas as proteínas produzidas pelo vetor pMSgt11 e purificadas, por afinidade, em colunas de *p*APTG-agarose (ver itens 2.16.2.3, 2.16.2.4 e 2.16.2.6) ou a proteína GST-S3S4, purificada por precipitação seletiva com 0,03% (p/v) SDS, seguida de ressolubilização em tampão 50 mM trietanolamina pH 11,5. As proteínas em solução de PBS foram aplicadas em poços de microplacas (Falcon[®] #9311), em um volume de 50 µL. As microplacas foram cobertas com um plástico fino (Magipack[®]) e incubadas durante a noite a 4°C para permitir a adsorção dos antígenos. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS e bloqueados com PBS/BSA 1% por uma hora. Os soros humanos, diluídos em PBS/BSA 1%, foram incubados por 2 horas em um volume de 100 µL por poço. A seguir os poços foram lavados três vezes com PBS/Tween 20 0,05%, três vezes com PBS e rebloqueados com PBS/BSA 1% por uma hora. Em seguida distribuíram-se volumes de 70 µL por poço de uma solução de proteína A radioiodada em PBS/BSA 1% (200.000 cpm/poço) e incubou-se por mais uma hora. Os poços foram novamente lavados três vezes com PBS/Tween 20 e três vezes com PBS, e deixados secar. A seguir os poços foram recortados e colocados em tubos de plástico (Beckman). A contagem foi feita em contador de radiação γ (Beckman Gamma 5500). Em alguns soros de pacientes chagásicos agudos foi investigada a presença de IgM. Neste caso, após a incubação com o primeiro soro, lavagens e bloqueio, foi incluída uma incubação de uma hora com IgG de coelho anti-IgM humana (cadeia µ), na diluição 1:500. As demais etapas subsequentes foram idênticas às descritas acima.

2.17.2. ELISA

Os dados de ELISA apresentados nesse trabalho foram obtidos a partir de reagentes da Polychaco S.A.I.C. (Argentina) e gentilmente cedidos pelo Dr. Jorge Yanovsky. Microplacas de plástico foram adsorvidas com 50 ng da proteína β -gal-B13 como descrito no item anterior. Após a incubação com o soro, um segundo anticorpo conjugado a peroxidase de raiz forte foi utilizado. Empregou-se como cromogênio trimetilbenzidina. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico e a absorbância foi determinada a 450 nm.

2.17.3. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados sorológicos foi calculado o índice κ (Kappa), descrito por Cohen (1960), que mede a proporção de acertos verdadeiros (número de acertos observados corrigido contra o número de acertos esperados ao acaso). Os acertos foram atribuídos tendo como base a prévia análise dos soros por técnicas sorológicas convencionais. Os índices κ foram calculados, para cada antígeno, de acordo com a fórmula $\kappa = (Po - Pe) / (1 - Pe)$; onde Po é o número de acertos observados e Pe o número de acertos esperados ao acaso. Esse teste foi escolhido pela Organização Mundial da Saúde para um estudo multicêntrico de avaliação de antígenos de *T. cruzi* no diagnóstico sorológico da doença de Chagas (Moncayo & Luquetti, 1990).

2.18. Ensaio de imuno-seleção

2.18.1. Acoplamento de proteínas à resina de agarose ativada

As proteínas β -galactosidase, β -gal-B12 e β -gal-B13 foram purificadas por cromatografia de afinidade (ver item 2.16.2.6) e liofilizadas. Cada proteína (4 mg) foi ressuspensa em 1,2 mL de tampão de acoplamento (0,1 M tampão bicarbonato pH 8,3; 0,5 M NaCl) e dialisada durante a noite contra 500 mL do mesmo tampão. No dia seguinte, o volume de cada solução, bem como sua absorbância a 280 nm foram medidos. Para o acoplamento utilizou-se a resina Sepharose 4B ativada por brometo de cianogênio. O método empregado seguiu as instruções do fabricante (Pharmacia). Cerca de 200 mg da resina foram inchados em 70 mL de uma solução 1 mM de HCl por 15 minutos. A suspensão foi filtrada e, no próprio filtro, lavou-se a resina com mais 70 mL da solução de HCl. A seguir a resina foi lavada com 4 mL de tampão de acoplamento e transferida para um tubo com 1,2 mL da solução da proteína em tampão de acoplamento. Procedeu-se a uma incubação de 3,5 horas, à temperatura ambiente, sob agitação leve. A resina foi então

novamente filtrada e lavada com 2 mL de tampão de acoplamento, para eliminar o excesso de proteína não ligada. As soluções recolhidas nesta filtração tiveram seu volume e absorbância a 280 nm determinados. Estes dados foram comparados com os obtidos na solução de proteína anterior ao acoplamento, a fim de se determinar a eficiência da reação. Em seguida a resina foi ressuspensa em 6 mL de 1 M etanolamina e incubada por uma hora e meia, a fim de bloquear os grupos ativos remanescentes. Finalmente, lavou-se a resina, sob filtração, com 40 mL de tampão de acoplamento, 40 mL de solução tampão acetato 0,1 M pH 4,0/NaCl 0,5 M e 40 mL de tampão de acoplamento. A resina foi então estocada até o uso em solução de NaCl 0,15 M com 0,02 % (p/v) de timerosal, a 4°C.

2.18.2. Purificação de IgG a partir de soros de pacientes chagásicos

Foram feitos testes de RIA (ver item 2.17.1) para várias amostras de soros de pacientes chagásicos crônicos, a fim de se determinar sua reatividade frente a um lisado total de formas tripomastigotas. O soros mais reativos foram selecionados e testados em RIA contra os antígenos B12 e B13 puros. Os soros positivos foram reunidos e utilizados para a purificação de IgG, partindo-se de um volume total de 50 mL. Como controle, também foi utilizada uma mistura de soros humanos normais. A purificação foi feita por "salting-out". A cada amostra de soros adicionou-se sulfato de sódio na concentração de 18 g/100 mL. A amostra foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação leve. Em seguida centrifugou-se a 1.000 g por 15 minutos e o sedimento foi ressuspense em tampão 0,1 M fosfato pH 8,0 para um volume final de 30 mL. Seguiram-se duas precipitações com sulfato de sódio, na proporção de 12 g por 100 mL de solução. O sedimento final foi ressuspense no tampão fosfato descrito acima, em um volume final de 15 mL. A solução foi dialisada durante a noite contra 6 litros do mesmo tampão a 4°C. A concentração protéica foi medida pelo método de Hartree (1972), como descrito no item 2.22.

2.18.3. Cromatografia de afinidade para obtenção de anticorpos monoespecíficos

Para a cromatografia de afinidade procedeu-se a uma diálise de 117 mg de IgG de pacientes chagásicos contra tampão 10 mM fosfato pH 8,0/150 mM NaCl. As resinas acopladas às proteínas B12, B13 e β -galactosidase foram equilibradas em PBS e empacotadas em colunas. A amostra de IgG chagásica foi submetida a uma cromatografia sequencial nas colunas, de β -galactosidase, B12 e B13. A solução de anticorpos foi recirculada 3 vezes na primeira coluna, o eluato transferido para a próxima coluna e assim por diante. Após a passagem das amostras, as colunas foram lavadas com 10 mL de tampão 10 mM fosfato pH 8,0/0,5 M NaCl. A eluição foi feita com 10 mL de

tampão 0,2 M glicina pH 2,3/0,15 M NaCl, coletando-se frações de 1 mL. Os eluatos foram imediatamente neutralizados com 1 M Tris.Cl pH 8,8 e acrescidos de BSA para 1 % (p/v) final. As colunas foram lavadas com 5 mL de 0,05 M dietilamina pH 11,6 e reequilibradas em PBS pH 8,0.

2.19. Eletroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

Foi utilizado o sistema de gel descontínuo de Laemmli (1970) contendo um gel de empilhamento e um de separação. Foram utilizadas as seguintes soluções para essa técnica:

- Solução estoque de acrilamida para gel de separação (A) - 30% (p/v) acrilamida; 0,8% (p/v) bisacrilamida.

- Solução tampão para gel de separação 4x concentrada (B) - 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,4% (p/v) SDS.

- Solução estoque de acrilamida para gel de empilhamento (C) - 30% (p/v) acrilamida; 1,6% (p/v) bisacrilamida.

- Solução tampão para gel de empilhamento 4x concentrada (D) - 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4% (p/v) SDS.

Todas as soluções acima foram filtradas após o preparo e estocadas em frascos escuros a 4°C.

- Gel de empilhamento - 3% de acrilamida (da solução estoque C); 1x solução D; 0,03% (p/v) persulfato de amônio; 0,2% (v/v) TEMED.

- Gel de separação - 7,5% acrilamida (da solução estoque A); 1x solução B; 0,03% (p/v) persulfato de amônio; 0,1% (v/v) TEMED.

- Tampão de corrida - 25 mM Tris-HCl pH 8,6; 192 mM glicina; 0,1% (p/v) SDS.

- Tampão de amostra de proteína 2x concentrado - 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS (p/v); 5% 2-mercaptoetanol (v/v); 20% glicerol (v/v); 0,02% (p/v) azul de bromofenol.

- Mistura de vaselina/parafina - 50 g de vaselina e 2 g de parafina. A mistura foi aquecida, homogeneizada e distribuída em seringas de plástico.

- Solução de azul de Coomassie - 0,3% (p/v) azul de Coomassie R-250; 50% (v/v) metanol; 10% (v/v) ácido acético.

- Solução de descoloração - 10% (v/v) etanol; 7% (v/v) ácido acético.

Para a montagem do gel foram utilizadas duas placas de vidro de 14,5 x 16,5 cm e espaçadores de acrílico com 1,5 mm de espessura. A vedação das placas e espaçadores foi feita com uma mistura de vaselina e parafina (ver acima). Aplicou-se então a solução de gel de separação, até o gel atingir uma altura de 8,5 cm. Em seguida borrifou-se

cuidadosamente uma solução 0,1% de SDS formando uma camada de cerca de 1 cm sobre o gel. Após a polimerização a solução de SDS foi removida e o gel lavado com água destilada. A seguir foi aplicada a solução de gel de empilhamento, perfazendo uma altura de cerca 2,5 cm, e posicionado o pente. As amostras de proteína, previamente dissolvidas em tampão de amostra, foram fervidas por 3 minutos e aplicadas no gel. Como marcadores de peso molecular foram utilizadas as seguintes proteínas: miosina (205 kDa); β -galactosidase (116 kDa); fosforilase b (97,4 kDa); albumina (66 kDa), ovalbumina (43 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). A eletroforese foi feita em tampão de corrida a 30 mA, até o azul de bromofenol, presente no tampão de amostra, atingir o fundo do gel. O gel de separação foi então removido e mergulhado na solução de azul de Coomassie que, além de corar o gel, também promove sua fixação. A cuba contendo o gel foi aquecida no forno de microondas por 3 minutos. Em seguida a solução do corante foi removida e substituída pela solução de descoloração. O gel foi descorado sob agitação leve, fazendo-se várias trocas da solução de descoloração. Finalmente, o gel foi colocado sobre um papel mata-borrão, coberto com um plástico fino e seco, sob vácuo, em aparelho secador de géis (BioRad) a 80°C.

2.20. Ensaio de Western blot

2.20.1. Transferência das proteínas para filtro de nitrocelulose

As proteínas foram separadas em SDS-PAGE como descrito no item 2.19, com a exceção que foram usados espaçadores mais finos, com 1 mm de espessura. Após a eletroforese as placas de vidro foram separadas e o gel de empilhamento removido. O procedimento adotado para a transferência seguiu a técnica de Towbin *et al.* (1979) com algumas modificações (Burnette, 1981). O gel de separação foi colocado sobre um conjunto de 5 folhas de papel de filtro previamente molhadas em tampão de transferência (20 mM Tris-HCl pH 8,3; 192 mM glicina; 20 % (v/v) metanol). Por cima do gel foi colocado um filtro de nitrocelulose e mais 5 folhas de papel de filtro. O conjunto foi montado em uma cuba vertical de transferência, tendo-se o cuidado de remover todas as bolhas de ar. A cuba foi totalmente preenchida com tampão e a transferência foi realizada sob tensão constante a 50 V por 18 horas.

2.20.2. Coloração do filtro de nitrocelulose

Após a transferência, o filtro de nitrocelulose foi corado por 3 minutos com uma solução de Ponceau S (0,2% p/v Ponceau S; 1,0% v/v ácido acético). Após a coloração o filtro foi colocado sobre uma folha de papel de filtro para melhor visualização das bandas de proteínas. A posição das bandas do padrão de peso molecular foi demarcada no filtro com

um lápis. Finalmente, o filtro foi lavado várias vezes com TBS até o total descoramento. Na última lavagem adicionou-se timerosal na concentração final de 0,01% p/v e o filtro foi guardado úmido, selado em um saco plástico, a 4°C até o momento do uso.

2.20.3. Reação com anticorpos e revelação

2.20.3.1. Revelação imunoenzimática

Os soros de coelhos foram utilizados na diluição 1:100 e a fração de imunoglobulina chagásica, obtida por imuno-seleção (ver item 2.18), usada diretamente. Os filtros foram lavados 2 vezes em TBS e bloqueadas em TBS/BSA 2% ou em TBS/3% leite desnatado (Molico[®]) por 1 hora. Os anticorpos, diluídos em TBS/BSA 1%, foram incubados com as tiras durante a noite a 4°C. No dia seguinte as tiras foram submetidas a três lavagens de 10 minutos com TBS e um novo bloqueio com TBS/Molico 3%. O anticorpo secundário, conjugado com peroxidase de raiz forte, foi diluído 1:500 em TBS/Molico 3% e incubado com as tiras de nitrocelulose por 2 horas. As tiras foram então lavadas três vezes com TBS e tratadas com uma solução recém-preparada de revelador (6 mg de 4-cloro- α -naftol; 2 mL de metanol; 10 mL de TBS ; 10 mL de H₂O₂). A revelação foi interrompida com água destilada.

2.20.3.2. Revelação com proteína A radioativa

O filtro de nitrocelulose, após a incubação com o soro, foi submetido a 5 lavagens de 10 minutos com TBS/Tween 20 0,05% e novo bloqueio de 30 minutos com TBS/BSA 1%. O filtro foi então incubado por 1 hora com proteína A marcada com ¹²⁵I, diluída em TBS/BSA 1% (4 x 10⁵ cpm/mL). Seguiram-se mais 5 lavagens de 10 minutos com TBS/Tween 20 0,05%. O filtro foi seco e fixado em papel mata-borrão. A auto-radiografia foi feita mediante exposição de uma chapa radiográfica por 18 a 36 horas, a -70°C com um intensificador de sinal.

2.21. Ensaio de imunoprecipitação

2.21.1. Marcação radioativa da superfície de parasitas

Formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura de tecido, da cepa Y de *T. cruzi*, tiveram as proteínas de sua superfície marcadas com iodo radioativo segundo o protocolo de Zingales *et al.* (1982), modificado de Markwell & Fox (1978). Os epimastigotas foram lavados três vezes, por centrifugação, com PBS e os tripomastigotas com meio DME. A radioiodação foi feita pela incubação de 10⁸ células em 0,5 mL de PBS contendo 250 μ Ci de

Na^{131}I , a 4°C por 10 minutos, em tubos previamente revestidos com 20 µg de Iodogen® (1,3,4,6-tetracloro-3α,6α-difenilglicoluril - Pierce Chemical Co.). Os parasitas foram lavados duas vezes em PBS (epimastigotas) ou DME (trypomastigotas), por centrifugação, a 3.000 g por 10 minutos.

2.21.2. Precipitação dos antígenos

A imunoprecipitação dos parasitas marcados foi realizada segundo o método de Kessler (1975) adaptado por Zingales *et al.* (1982). Os parasitas (10^8 células) foram lavados com PBS e ressuspensos em 150 µL de tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1% (v/v) Nonidet P-40; 1 mM PMSF; 1 mM TLCK; 2,8 U/mL aprotinina). Após uma incubação de 15 minutos a 4°C, a solução foi centrifugada a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. Aliquotas do sobrenadante (correspondentes a 3×10^7 parasitas) foram diluídas com um volume igual de tampão contendo 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA, 300 mM NaCl; 0,02% (p/v) azida sódica, e incubadas seqüencialmente com soro normal, anti-β-galactosidase, anti-β-gal-B12 e anti-β-gal-B13. As incubações variaram de 1 a 2 horas a 4°C. Os imunocomplexos foram adsorvidos pela adição de 70 µL de uma suspensão 10 % de *Staphylococcus aureus* da cepa Cowan I (inativado pelo calor e fixado com formalina). Após uma incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada. Os precipitados foram lavados duas vezes com solução tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 0,05% (v/v) Nonidet P-40; 1 mg/mL (p/v) BSA; 0,01% (p/v) azida sódica. A seguir procedeu-se a mais uma lavagem com uma solução contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,7); 0,3 M NaCl; 0,1% (p/v) SDS e 0,05% (p/v) Nonidet P-40, a fim de reduzir as precipitações inespecíficas. Os precipitados foram ressuspensos em 70 µL de tampão de amostra de eletroforese e fervidos por 5 minutos. Após uma centrifugação, os sobrenadantes foram aplicados em gel de poliacrilamida, e submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Os géis foram corados, secos e expostos com um filme de raios X com uma placa intensificadora a - 70°C.

2.22. Dosagem de proteína

Utilizou-se o método de Hartree (1972) que é uma modificação do protocolo de dosagem de proteínas de Lowry (1951). Entre as vantagens destacam-se uma maior intensidade de coloração e uma proporcionalidade direta em uma maior faixa de concentração protéica (entre 15 a 100 µg). Para esse método foram utilizadas as soluções descritas abaixo:

Solução A - 2 g de tartarato de sódio e potássio e 100 g Na_2CO_3 foram dissolvidos em 500 mL de 1 N NaOH e em seguida diluídas para 1 litro.

Solução B - 2 g de tartarato de sódio e potássio e 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em 90 mL de água e adicionados de 10 mL de 1 N NaOH.

Solução C - 1 volume do reagente de Folin-Ciocalteu foi diluído com 15 volumes de água no momento do uso.

Para o ensaio as amostras das proteínas, diluídas em 1 mL de água, foram dispensadas em tubos de ensaio, adicionadas de 0,9 mL da solução A e incubadas em um banho de água a 50°C por 10 minutos. Os tubos foram deixados esfriar à temperatura ambiente e adicionaram-se 0,1 mL da solução B. Após uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 3 mL da solução C em cada tubo, homogeneizando-se rapidamente. Os tubos foram então incubados a 50°C por mais 10 minutos e deixados esfriar. As absorbâncias foram medidas em um comprimento de onda de 650 nm. Como branco foi utilizada uma amostra de água e, como padrão, uma solução de albumina com uma concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Ambos os controles foram tratados como descrito acima. A conversão das absorbâncias para mg/mL foi feita em relação a uma solução-padrão de albumina 1 mg/mL que apresenta uma $\text{D.O.}_{600} = 0,66$.

2.23. Ensaio de Southern blot

2.23.1. Transferência do DNA para membrana de nylon

Após a corrida eletroforética o gel foi visualizado sob luz UV e fotografado. Em seguida foi lavado por 15 minutos em solução 0,25 N de HCl para hidrolisar parcialmente o DNA e facilitar a transferência de fragmentos grandes. O gel foi então tratado com solução 0,5 N NaOH e 1,5 M NaCl por 30 minutos, para promover a desnaturação do DNA. Procedeu-se à neutralização por meio de lavagem com solução 1 M Tris-HCl pH 8,0/1,5 M NaCl por 30 minutos. Todas as lavagens foram feitas com agitação suave. A transferência foi feita de forma semelhante ao método de Southern (1975). Utilizou-se um reservatório com tampão SSC 20x e uma ponte de filtro Whatman 3MM. O gel foi colocado invertido sobre o filtro e por cima colocou-se uma membrana de nylon Hybond N[®]. A membrana foi coberta por um filtro Whatman 3MM, uma pilha de folhas de papel toalha e um peso de cerca de 1,5 kg. A transferência foi feita por um período de 16 a 18 horas à temperatura ambiente. Alternativamente, o DNA foi transferido para a membrana de nylon sob vácuo (5 a 10 cmHg), por 90 minutos, utilizando-se o aparelho Trans-Vac[®] TE 80 da Hoefer. Após a transferência a membrana de nylon foi lavada em solução de acetato de amônio 1 M por alguns segundos e seca. A membrana foi então revestida com plástico fino (tipo Magipack[®])

e colocada sobre um transiluminador de UV (330 nm), com a face do DNA voltada para a lâmpada. Após uma exposição de 3 a 5 minutos, a membrana foi guardada entre dois papéis de filtro revestidos de papel alumínio e estocada a -20°C até o momento de uso.

2.23.2. Hibridização das sondas com a membrana

As membranas de nylon foram colocadas dentro de sacos plásticos e submetidas à pré-hibridização com 0,1 mL/cm² de tampão de hibridização (3x SSC; 1 mM EDTA; 0,1% p/v SDS; 0,1% p/v Ficoll; 0,1% p/v PVP; 100 µg/mL DNA de esperma de salmão), a 67°C por 90 minutos. Alternativamente, os filtros de nitrocelulose foram colocados em tubos de vidro da estufa de hibridização HybAid® e pré-hibridizados cada um com 20 mL de solução. Para a hibridização, as sondas foram desnaturadas em banho de água fervente por 7 minutos e diluídas em tampão de hibridização para 10⁶ cpm TCA precipitáveis/mL. A hibridização foi realizada a 67°C durante a noite. Após a hibridização, as membranas foram submetidas a uma lavagem em solução SSC 3x/SDS 0,1% por 1 hora, uma lavagem em SSC 1x/SDS 0,1% por uma hora e duas lavagens em SSC 0,1x/SDS 0,1%, de 30 minutos cada. Todas as lavagens foram efetuadas a 67°C com tampões pré-aquecidos. A membrana úmida foi então colocada sobre um plástico transparente rígido e recoberta com um plástico fino (Magipack®). A exposição com uma chapa radiográfica foi feita com um ou dois intensificadores de sinal a -70°C por 18 a 36 horas.

2.24. Ensaio de Northern blot

2.24.1. Eletroforese de RNA em géis de agarose/formaldeído

Foi preparado um gel de agarose em concentrações variando entre 0,7 % a 1,2 % (p/v), escolhida em função da faixa ótima de resolução desejada. A agarose foi fundida em água bidestilada em um forno de microondas. Quando a temperatura diminuiu para 60°C, adicionaram-se tampão MOPS 10x autoclavado para uma concentração final de 1x e formaldeído 37 % (p/v) para 0,66 M final. Os sedimentos de RNA (20 µg de RNA total ou 2 µg de RNA poli A⁺) foram ressuspensos em 20 µL de tampão de amostra de RNA (50% v/v formamida deionizada; 6,5% v/v formaldeído; tampão MOPS 1x). As amostras foram então aquecidas a 65°C por 15 minutos e em seguida adicionaram-se 2 µL de solução corante (50% v/v glicerol; 0,4% p/v azul de bromofenol; 0,4% p/v xilenocianol; 1 mM EDTA).

Cada amostra foi rapidamente colocada em gelo até o momento de ser aplicada no gel. A corrida eletroforética foi realizada em tampão MOPS 1x a 120 mA, e interrompida quando o azul de bromofenol atingiu 3/4 do gel. Após a eletroforese o gel foi lavado em água destilada em vários períodos de 10 minutos. A região do gel contendo os marcadores

de peso molecular foi corada com uma solução de 0,5 µg/mL de brometo de etídio, por 45 minutos, e descorada por uma hora em água destilada. Como marcadores foram utilizados os RNAs ribossomais de células LLC-MK2, de *E. coli* e de *T. cruzi*. Alternativamente empregou-se como marcador um DNA de λ cl857 digerido com *Hind*III e marcado com [α - 32 P]dATP. Neste caso o marcador foi transferido para a matriz de nitrocelulose junto com as demais amostras.

2.24.2. Transferência do RNA

O gel foi tratado segundo o método descrito por Sambrook *et al.* (1989). Foram realizadas várias lavagens de 5 minutos em água destilada. Em seguida o gel foi tratado com uma solução NaOH 50 mM/NaCl 10 mM por 45 minutos para se obter uma hidrólise alcalina parcial. Este procedimento visa melhorar a eficiência da transferência de moléculas de RNA de alto peso molecular. O gel foi posteriormente neutralizado por 45 minutos em uma solução Tris-HCl 0,1 M pH 7,5. Finalmente colocou-se o gel em uma solução SSC 15x por 1 hora. A transferência do RNA para um filtro de nitrocelulose (Hybond C[®]) ou de nylon (Hybond N[®]) foi feita de forma semelhante ao método de Southern (1975) conforme descrito no item 2.23. Utilizou-se a solução SSC 15x para a transferência, por um período de 16 a 18 horas à temperatura ambiente. Alternativamente, o RNA foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, sob vácuo (5 a 10 cmHg), por 90 minutos, utilizando-se o aparelho da Trans-Vac[®] TE 80 da Hoefer. A seguir o filtro foi lavado brevemente em solução SSC 3x e seco ao ar. A fixação do RNA na matriz foi feita através de uma incubação em forno a 80°C por 2 horas.

2.24.3. Hibridização das sondas com as membranas

As membranas foram colocados em tubos de vidro da estufa de hibridização HybAid[®] e pré-hibridizados cada um com 20 mL de solução de hibridização para Northern blot (5x SSPE; 50% v/v formamida; 5x solução Denhardt; 0,1% p/v SDS; 0,1 mg/mL DNA de esperma de salmão) a 42°C por 2 horas. A seguir esta solução foi substituída por 10 mL de solução de hibridização nova contendo sulfato de dextrana 10% (p/v) e a sonda de DNA (5-10 x 10⁶ cpm) previamente fervida por 7 minutos. Os tubos contendo as membranas foram incubados sob rotação durante a noite a 42°C. No dia seguinte as membranas sofreram 2 lavagens de 15 minutos a 42°C com 25 mL de solução SSC 2x/NaPPi 1 mM, e 4 lavagens de 30 minutos a 42°C com 25 mL de solução SSC 0,1 x/SDS 0,1%. Em seguida procedeu-se à exposição das membranas com filmes de raios-X a -70°C, com uma ou duas placas intensificadoras de sinal, por 18 a 36 horas a -70°C.

2.25. Seqüenciamento de DNA

2.25.1. Digestão unidirecional do DNA com Exonuclease III

Com o objetivo de seqüenciar inteiramente fragmentos de DNA com um tamanho superior ao limite de resolução de um gel de seqüenciamento (cerca de 300 pares de bases), foi utilizado o protocolo de Henikoff (1987) com algumas modificações (Sambrook *et al.* 1989), a partir do sistema Erase-a-Base® (Promega). Uma massa de 20 µg de DNA foi digerida com duas enzimas de restrição. Uma das enzimas tem um sítio de clivagem próximo ao inserto, que resulta em uma extremidade de fita simples 5' protuberante, enquanto a outra enzima cliva mais próximo ao vetor, deixando uma extremidade de fita simples 3' protuberante com quatro bases. A extremidade 3' protuberante é resistente à ação da Exonuclease III, de forma que a digestão é unidirecional.

Para esse protocolo foram utilizadas as seguintes soluções:

- Tampão de Exonuclease III 10x concentrado - 660 mM Tris-HCl pH 8,0; 6,6 mM MgCl₂.

- Tampão de nuclease S1 7,4x - 0,3 M acetato de potássio pH 4,6; 2,5 M NaCl; 10 mM ZnSO₄; 50% (v/v) glicerol.

- Mistura de nuclease S1 (para 25 pontos de cinética) - 172 µL água deionizada; 27 µL tampão de nuclease S1 7,4x; 60 U nuclease S1.

- Tampão de término de S1 - 0,3 M Tris base; 0,05 M EDTA.

- Tampão de Klenow - 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM MgCl₂.

- Mistura de Klenow - 30 µL tampão de Klenow; 3-5 U de fragmento Klenow da DNA polimerase.

- Tampão de ligase 10x concentrado - 500 mM Tris-HCl pH 7,6; 100 mM MgCl₂; 10 mM ATP.

- Mistura de ligase - 790 µL água deionizada; 100 µL tampão de ligase 10x; 100 µL 50% PEG; 10 µL 100 mM DTT; 50 U T4 DNA ligase.

O DNA foi extraído com fenol e clorofórmio e precipitado com acetato de sódio 0,3 M final e 2,5 volumes de etanol a -20°C durante a noite. No dia seguinte o tubo foi centrifugado a 13.000 g por 15 minutos e o sedimento lavado com etanol 70%, seco ao ar e ressuspensão em 60 µL de tampão de Exonuclease III 1x concentrado. Um total de 25 tubos Eppendorf® foram adicionados de 7,5 µL de mistura de nuclease S1 e colocados em gelo. O tubo contendo o DNA foi incubado a 37°C por 5 minutos e adicionado de 500 U de Exonuclease III. Foram removidas alíquotas de 2,5 µL em intervalos de 30 segundos, as quais foram transferidas para os tubos com a mistura S1. Após a transferência do conteúdo

do último tubo, os tubos com S1 foram incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1 μ L de solução de término de S1 e posterior incubação a 70°C por 10 minutos. Para a visualização do resultado da digestão por Exonuclease III, alíquotas de 2 μ L foram aplicadas em um gel de agarose. O restante das amostras foi transferido para um banho a 37°C e adicionado de 1 μ L de mistura Klenow. Após uma incubação de 2 a 5 minutos, foi dispensado 1 μ L de solução de dNTP (0,125 mM de cada) e os tubos foram incubados por mais 5 minutos a 37°C. A seguir os tubos foram removidos à temperatura ambiente, adicionados de 40 μ L de mistura de ligação e incubados por uma hora a 37°C. A transformação foi feita na hospedeira JM109 conforme descrito no item 2.15.5, utilizando 10 μ L de cada amostra.

2.25.2. Seqüenciamento de DNA de fita simples

2.25.2.1. Preparação dos moldes de DNA de fitas simples

Placas brancas de fagos, obtidas na transfecção de bactérias competentes, foram removidas com as pontas de palitos de dente estéreis. Cada palito foi colocado em um tubo contendo 1,5 mL de caldo 2-TY e uma diluição 1:100 de uma cultura fresca de JM101. Os tubos foram incubados sob vigorosa agitação a 37°C por 4 horas. Cada cultura foi transferida para um tubo Eppendorf® e centrifugada por 5 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e adicionaram-se 150 μ L de uma solução 20% PEG 8000 (p/v)/2,5 M NaCl. Após homogeneização e uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados por 15 minutos na mesma temperatura. Os sobrenadantes foram desprezados e os tubos novamente centrifugados por 1 minuto. Com o auxílio de um pipeta Pasteur de ponta bem fina aspirou-se o sobrenadante remanescente. O precipitado contendo os fagos foi ressuspensão em 100 μ L de TE e extraído com 50 μ L de fenol saturado sob vigorosa agitação durante 30 segundos. Adicionaram-se para cada tubo 10 μ L de acetato de sódio (3 M, pH 5,3) e 2,5 volumes de etanol, incubando-se durante a noite a -20°C. A seguir os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 4°C e o DNA precipitado foi lavado 2 vezes com etanol 80%, seco sob vácuo e ressuspensão em 30 μ L de TE.

2.25.2.2. Reação de seqüenciamento

O seqüenciamento de DNA de fita simples foi feito em microplaca de plástico (Falcon® #9311) utilizando como polimerase o fragmento Klenow. As reações de seqüenciamento foram feitas pelo método de terminação de cadeia de Sanger (1977). Abaixo estão apresentadas as soluções utilizadas:

-TM - 100 mM Tris-HCl pH 8,5; 50 mM MgCl₂.

-Solução mistura de enzima - 12 mM DTT; 0,5 μ Ci/ μ l [³⁵S]dATP α S; 0,25 U/ μ l fragmento Klenow da *E.coli* DNA polimerase I.

-"T mix" - 6,25 μ M dTTP; 125 μ M dCTP; 125 μ M dGTP; 250 μ M ddTTP; 25 mM Tris-HCl pH 7,5.

-"C mix" - 125 μ M dTTP; 6,25 μ M dCTP; 125 μ M dGTP; 40 μ M ddCTP; 25 mM Tris-HCl pH 7,5.

-"G mix" - 125 μ M dTTP; 125 μ M dCTP; 6,25 μ M dGTP; 80 μ M ddGTP; 25 mM Tris-HCl pH 7,5.

-"A mix" - 125 μ M dTTP; 125 μ M dCTP; 125 μ M dGTP; 5 μ M ddATP; 25 mM Tris-HCl pH 7,5.

-Solução caça de dNTP - dATP, dCTP, dGTP e dTTP 0,25 mM cada.

-Solução de corantes/formamida - 98% (v/v) formamida deionizada; 0,1% (p/v) azul de bromofenol; 0,1% (p/v) xileno cianol; 10 mM EDTA.

Prepararam-se 8 μ L de uma solução de oligonucleotídeo iniciador para cada clone a ser sequenciado. Esta solução é composta de 2 μ L (0,4 picomoles) de iniciador, 1 μ L de TM e 5 μ L de água bidestilada. Dispensaram-se alíquotas de 2 μ L de fita molde em 4 poços contíguos de uma microplaca de plástico e a cada um destes poços foram adicionados 2 μ L da solução do iniciador. A microplaca foi coberta com um plástico fino (Magipack[®]) e centrifugada por 30 segundos a 1.000 rpm (centrífuga de mesa Beckman TJ-6 com rotor TH4). Procedeu-se então a uma incubação em estufa a 55°C por uma hora.

A microplaca contendo as fitas molde e o iniciador foi retirada da estufa a 55°C, centrifugada e esfriada até atingir a temperatura ambiente. Em cada um dos poços foram adicionados 2 μ L das soluções de desoxi e didesoxinucleotídios. A seguir adicionaram-se em cada poço 2 μ L da solução mistura de enzima. A microplaca foi centrifugada por 30 segundos e mantida à temperatura por 15 minutos. A seguir adicionaram-se em cada poço 2 μ L de uma solução caça de dNTP. Novamente centrifugou-se a microplaca e incubou-se por mais 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de 2 μ L por poço de solução de corantes/formamida. A microplaca foi centrifugada e incubada sem tampa a 80°C por 20 minutos para desnaturar o DNA e reduzir o volume total de cada amostra.

2.25.3. Sequenciamento de DNA de fita dupla

2.25.3.1. Preparação dos moldes de DNA por desnaturação alcalina

Para cada reação de seqüenciamento foram utilizados 3 µg de DNA plasmidial obtido por midipreparações (item 2.14.3) ou por preparações em larga escala em gradiente de césio (item 2.14.4). A desnaturação do DNA foi realizada de acordo com o método de Mierendorf & Pfeffer (1987). O DNA foi diluído em 20 µL de água deionizada e adicionado de 2 µL de uma solução 2 N NaOH/2 mM EDTA. As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente, adicionadas de 7 µL de água, 3 µL de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e 75 µL de etanol. Após uma incubação de 5 minutos em banho de gelo seco/acetona, procedeu-se a uma centrifugação a 10.000 g por 5 minutos. Os sedimentos foram lavados com 200 µL de etanol 70% gelado, sêcos sob vácuo e armazenados a -20°C até o uso.

2.25.3.2. Reação de seqüenciamento com T7 DNA Polimerase

Utilizou-se o sistema "T7Sequencing Kit™" (Pharmacia), seguindo as instruções do fabricante. As soluções utilizadas e sua composição estão listadas abaixo:

- "Annealing buffer" - 1 M Tris-HCl (pH 7,6); 100 mM MgCl₂; 160 mM DTT.
- "Labelling mix" - 1,375 µM dCTP, dGTP e dTTP (de cada um); 333,5 mM NaCl.
- "A short-mix" - 840 µM dCTP, dGTP e dTTP (de cada); 93,5 µM dATP; 14 µM ddATP; 40 mM Tris-HCl (pH 7,6); 50 mM NaCl.
- "C short-mix" - 840 µM dATP, dGTP e dTTP (de cada); 93,5 µM dCTP; 17 µM ddCTP; 40 mM Tris-HCl (pH 7,6); 50 mM NaCl.
- "G short-mix" - 840 µM dATP, dCTP e dTTP (de cada); 93,5 µM dGTP; 14 µM ddGTP; 40 mM Tris-HCl (pH 7,6); 50 mM NaCl.
- "T short-mix" - 840 µM dATP, dCTP e dGTP (de cada); 93,5 µM dTTP; 14 µM ddTTP; 40 mM Tris-HCl (pH 7,6); 50 mM NaCl.
- "Stop solution" - 0,3% Azul de Bromofenol; 0,3 % Xileno Cianol FF; 10 mM EDTA (pH 7,5); 97,5% (v/v) formamida deionizada.
- "T7 dilution buffer" - 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 5 mM DTT; 100 µg/mL BSA; 5 % glicerol (v/v).

Ao sedimento de DNA desnaturado foram adicionados 5 picomoles de iniciador e 2 µL de "annealing buffer", completando-se o volume com água para um total de 14 µL. A hibridização entre iniciador e molde foi feita através de incubações a 67°C por 2 minutos, 37°C por 15 minutos e à temperatura ambiente por 10 minutos.

Após o esfriamento foram adicionados a cada amostra 1 µL de [³⁵S]dATPαS, 2 µL de T7 DNA polimerase (previamente diluída 1:5 em "T7 dilution buffer") e 3 µL de "labelling mix". Os componentes da mistura foram homogeneizados e incubados à temperatura

ambiente por 5 minutos. Paralelamente, 4 tubos Eppendorf® foram marcados com as letras T, C, G e A, adicionados de 2,5 µL das soluções de terminação ("short mix") contendo ddTTP, ddCTP, ddGTP e ddATP, e aquecidos a 37°C por 1 minuto. A cada um destes tubos foram adicionados 4,5 µL da reação de marcação, seguindo-se uma incubação a 37°C por 5 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de 5 µL de "stop solution".

Para as amostras destinadas apenas à identificação de clones deletados, com sobreposição de sequência, obtidas por digestão com Exonuclease III (ver item 2.25.1), procedeu-se a uma reação de sequenciamento com apenas uma base. Nesse caso, 5 µL de DNA obtido por "speed-prep" (ver item 2.14.2) foram utilizados na desnaturação alcalina. Foi preparada uma solução-mãe de iniciador, "annealing mix" e água, mantendo-se as mesmas proporções de cada reagente recomendadas no protocolo original. Para cada tubo contendo o sedimento de DNA foram adicionados 3,5 µL da solução (um quarto do volume do protocolo original). A hibridização foi realizada nas condições já descritas acima. A seguir adicionaram-se a cada tubo 1,5 µL de uma solução contendo o radioisótopo, "labelling mix" e T7 DNA Polimerase (com as mesmas proporções relatadas previamente) e incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos. A reação de terminação foi feita com a adição de 2,5 µL da "termination mix" e incubação a 37°C por 7 minutos. Nesta etapa foi feita uma alteração maior em relação à técnica padrão. A transferência de 4,5 µL da reação de marcação de cada tubo tornaria o método muito lento e complexo para um número grande de amostras. Optou-se em aplicar o volume de "termination mix" diretamente no tubo contendo a reação de marcação e, para compensar o fato de ele não estar previamente aquecido a 37°C, aumentou-se o tempo de incubação para 7 minutos. Após incubação, adicionaram-se a cada tubo 5 µL de "stop solution".

2.25.3.3. Reação alternativa de extensão com Terminal desoxinucleotidil Transferase (TdT)

O sequenciamento de DNA de fita dupla está mais sujeito à ocorrência de artefatos do que o de fita simples. Regiões de estrutura secundária podem causar paradas prematuras da polimerização da cadeia de DNA em pontos específicos. Nesse locais as bandas normais são obscurecidas por bandas radioativas de igual intensidade nos quatro canais e na mesma posição. Para reduzir a ocorrência desse tipo de artefato foi empregado o protocolo descrito por Fawcett & Bartlett (1990). Às amostras presentes nos tubos, após a reação de terminação, adicionou-se 1 µL de uma solução de TdT contendo 1 mM dNTP e 1,5 U de TdT em tampão 40 mM Tris-HCl pH 7,5/20 mM MgCl₂/50 mM NaCl. Os tubos foram incubados por 30 minutos a 37°C e adicionados de 5 µL de "stop solution". A função da enzima TdT é de estender randomicamente as fitas de DNA que tenham sofrido uma parada prematura, de forma a espalhar o sinal na parte superior do gel e permitir a leitura.

2.25.4. Gel de seqüenciamento

2.25.4.1. Gel de seqüenciamento com gradiente de força iônica

Utilizaram-se as seguintes soluções para a preparação do gel de seqüenciamento:

-Solução estoque 40% Acrilamida - 38,0% (p/v) acrilamida e 2,0% (p/v) de bisacrilamida. A solução foi deionizada por 15 minutos com a resina Biorad RG 501-X8 (5 g de resina para 250 mL de solução), filtrada e armazenada a 4°C em frasco escuro.

-0,5 x TBE gel mix - 7,5% acrilamida (do estoque 40%); 7,66 M uréia; 0,5 x TBE, estocada a 4°C em frasco escuro.

-5.0 x TBE gel mix - 7,5 % acrilamida (do estoque 40%); 7,66 M uréia; 5 x TBE; 0,005% azul de bromofenol, estocada a 4°C em frasco escuro.

Foi utilizada uma cuba de seqüenciamento de DNA Sequi-Gen[®] da Bio-Rad. Para a montagem do gel as placas de vidro foram meticulosamente limpas com água e detergente, e em seguida com etanol. A placa interna foi siliconizada com dimetildiclorosilano (solução 2% v/v em hexano). A montagem foi feita utilizando espaçadores de teflon com 0,3 mm de espessura. As placas foram seladas com 15 mL de gel de seqüenciamento 6% contendo 0,125% (p/v) de persulfato de amônio e 0,5% de TEMED. O gel de corrida, baseado no método de Biggin *et al.* (1983), foi feito em gradiente de 0,5x a 5x TBE. Recolheram-se 6 mL da solução 0,5 x TBE gel mix contendo 0,05% de persulfato de amônio e 0,2% de TEMED em uma pipeta de 10 mL. Na mesma pipeta foram recolhidos 7 mL da solução 5,0 x TBE gel mix contendo persulfato e TEMED. O gradiente foi formado pela aspiração lenta de três bolhas de ar pela pipeta. A solução foi vagarosamente aplicada entre as placas de vidro e o volume total do gel foi completado com a solução 0,5 x TBE gel mix. Deixou-se então o gel polimerizar por pelo menos 30 minutos. A corrida eletroforética foi realizada sob potência constante a 37 W em tampão 1 x TBE e prosseguiu um pouco além da saída do azul de bromofenol pelo fundo do gel (totalizando cerca de 2,5 horas). Após a eletroforese, a placa siliconizada foi removida e o gel, ainda aderido à outra placa, foi fixado por 30 minutos em solução 10% de ácido acético e 10% metanol. A seguir o gel foi transferido para uma folha de papel Whatman 3MM, recoberto com plástico fino (Magipack[®]) e secado sob vácuo a 80°C por 20 minutos. A auto-radiografia foi obtida mediante exposição de uma chapa de raio X ao gel durante a noite à temperatura ambiente.

2.25.4.2. Gel de seqüenciamento com gradiente de espessura

O gel foi preparado na cuba de seqüenciamento Sequi-Gen[®] (BioRad) seguindo-se os mesmos procedimentos de limpeza e selagem das placas descritos no item anterior. Foram utilizados espaçadores com gradiente de espessura de 0,25 a 0,53 mm (Bio-Rad). O gel de corrida foi feito com uma concentração de 6% de acrilamida e 7 M uréia em tampão TBE 1x, contendo 0,0375% de persulfato de amônio e 0,15% de TEMED. Com o objetivo de aquecer o gel até a temperatura de 50-55°C, procedeu-se a uma pré-corrída eletroforética por 40 minutos a 45 W. As amostras de DNA foram incubadas em banho de água a 85°C por 3 minutos, colocadas em gelo, e imediatamente aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada a 40 W por cerca de 2 horas em tampão TBE 1x. Para a resolução de fragmentos maiores foi utilizado um gel com apenas 5% de acrilamida e um tempo de corrida de 4 a 5 horas de duração. Após a eletroforese, o gel, aderido a uma das placas, foi fixado por 30 minutos em solução contendo 10% de ácido acético e 10% de etanol. A seguir o gel foi transferido para papel Whatman 3MM, recoberto com plástico fino (tipo Magipack[®]) e sêco sob vácuo a 80°C por 30 minutos. A auto-radiografia foi obtida mediante exposição de um filme radiográfico ao gel durante 24 a 48 horas à temperatura ambiente.

2.26. Análise computacional dos dados das seqüências nucleotídicas

2.26.1. Programa DNASIS

O pacote de programas DNASIS 6.0 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.) foi utilizado para a entrada de dados das seqüências nucleotídicas. Além disso, esse pacote foi empregado para a tradução de seqüências e determinação dos possíveis passos de leitura (ORFs) e sítios de restrição.

2.26.2. Busca de homologia em bancos de dados

2.26.2.1. WinBlast

As seqüências de DNA e proteínas foram convertidas para o formato FASTA (Pearson & Lipman, 1988). A requisição de busca foi preparada através do programa WinBlast (autoria de A. V. Sivaprasad) que foi obtido por FTP anônimo no endereço ftp.embl-heidelberg.de. WinBlast é um programa que auxilia a elaboração de requisições de busca e recuperação de seqüências via o servidor BLAST do NCBI por correio eletrônico. Para seqüências protéicas foram utilizadas as matrizes de substituição PAM250 e BLOSUM62.

2.26.2.2. BLAST

A requisição de busca de homologia, preparada pelo programa WinBlast, foi enviada por correio eletrônico para o computador servidor do NCBI (National Center for Biotechnology Information) no endereço blast@ncbi.nlm.nih.gov. Esse servidor processa a informação utilizando o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) cujo algoritmo busca alinhamentos que otimizam a medição de similaridades locais. O programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) pode ser utilizado com o parâmetro N, para a comparação de uma sequência nucleotídica contra um banco de dados de sequências nucleotídicas. Caso se queira a comparação de sequências protéicas utiliza-se o parâmetro P. Finalmente, se o objetivo for a comparação de uma sequência nucleotídica contra um banco de sequências protéicas, pode-se usar o parâmetro X. Nesse caso, a sequência nucleotídica é traduzida nos seis passos de leitura possíveis (considerando-se as duas orientações). Cada uma das sequências protéicas geradas é então comparada às sequências de proteínas.

2.26.3. Recuperação de sequências

2.26.3.1. Network Entrez

O programa cliente Network Entrez foi obtido por FTP anônimo no endereço ncbi.nlm.nih.gov. Este programa funciona no ambiente operacional Windows e necessita da plataforma de TCP/IP Winsock 1.1. Para fornecer essa plataforma foi utilizado o programa Trumpet Winsock 1.0 (autoria de Peter Tattam), que por sua vez foi obtido por FTP anônimo no endereço petros.psychol.utas.edu.au. Através do programa cliente do Entrez foi possível acessar em tempo real o computador servidor nos Estados Unidos. Utilizando os respectivos números de acesso dos genes, foi possível receber os dados completos das sequências nucleotídicas e protéicas, bem como os respectivos sumários do banco de dados Medline.

2.26.3.2. Serviço de recuperação de sequências por correio eletrônico

Uma alternativa à recuperação das sequências em tempo real por meio do Nentrez foi a utilização do serviço de fornecimento de sequências do NCBI por correio eletrônico. Utilizando o programa WinBlast, descrito no item 2.26.2.1, foram elaboradas requisições de recuperação de sequências nucleotídicas e protéicas. As requisições foram enviadas por correio eletrônico para o computador servidor do NCBI no endereço retrieve@ncbi.nlm.nih.gov.

2.26.4. Programas de alinhamento de seqüências para computadores IBM-PC

2.26.4.1. MACAW

O alinhamento de seqüências nucleotídicas e protéicas foi feito com o programa MACAW (Multiple Alignment Construction and Analysis Workbench), desenvolvido por Schuler *et al.* (1991). Esse programa foi obtido por FTP anônimo no endereço ncbi.nlm.nih.gov e utiliza um algoritmo semelhante ao do programa BLAST. O programa MACAW roda sob o ambiente operacional Windows e permite a elaboração de múltiplos alinhamentos e sua apresentação na forma de seqüências alinhadas, blocos de alinhamento e esquema de blocos de similaridade.

2.26.4.2. Clustal V

O programa Clustal V (Higgins & Sharp, 1988; Higgins *et al.*, 1991), obtido por FTP anônimo do servidor ftp.embl-heidelberg.de, também permite o alinhamento de múltiplas seqüências. Sua vantagem em relação ao MACAW é a maior velocidade e menores requerimentos de memória e equipamento, uma vez que roda sob o DOS. Entretanto, apresenta uma limitação quanto ao tamanho das seqüências a serem alinhadas, que não pode exceder 1.300 pares de bases ou aminoácidos.

2.26.5. Pacote de análise de seqüências GCG

Para a análise das características estruturais das seqüências nucleotídicas e protéicas foi utilizado o pacote de análise de seqüências GCG (Genetics Computer Group Inc.), desenvolvido originalmente na Universidade de Wisconsin (Devereux *et al.* 1984). Esse conjunto de programas roda em estações de trabalho VAX sob sistema operacional VMS ou em plataformas com sistema UNIX. Nesse trabalho utilizou-se um computador VAX da FIOCRUZ (Rio de Janeiro) e um IRIS (Silicon Graphics) do BBRC (Brazilian Bioinformatics Resource Center) em Brasília. Esses computadores foram acessados via Internet por "login" remoto nos endereços dcc001.cict.fiocruz.br e asparagin.cenargen.embrapa.br, respectivamente. A seguir serão apresentados brevemente os programas do pacote GCG utilizados nesse trabalho, como descritos no manual original do programa:

-CODONPREFERENCE - Programa que tenta reconhecer seqüências codificadoras de proteínas medindo a similaridade de seu uso de códons com uma tabela de freqüência de uso de códons. Também considera a tendência ("bias") de sua composição (geralmente GC) na terceira posição de cada códon.

-BESTFIT - Faz um alinhamento do melhor segmento de similaridade entre duas seqüências. Alinhamentos ótimos são obtidos mediante a inserção de lacunas para maximizar o número de identidades.

-COMPARE - Compara duas seqüências de DNA ou proteínas e cria um arquivo de pontos de similaridade entre elas.

-DOTPLOT - Produz um gráfico tipo "dot-plot" a partir do arquivo gerado pelo programa COMPARE.

-FRAMES - Mostra as ORFs nos seis passos de leitura de uma seqüência de DNA.

-GAP - Faz um alinhamento de duas seqüências completas maximizando o número de identidades e minimizando o número de lacunas.

-MOTIFS - Procura motivos de seqüências a partir de padrões definidos no banco de dados PROSITE .

-PEPTIDESTRUCTURE - Faz predições de estrutura secundária para uma seqüência protéica, incluindo medições de antigenicidade, flexibilidade, hidrofobicidade e probabilidade de localização na superfície.

-PLOTSTRUCTURE - Produz um gráfico a partir do arquivo de medições criados pelo programa PEPTIDESTRUCTURE.

-REFORMAT - Permite a importação de arquivos de seqüências e sua conversão no padrão GCG.

-REPEAT- Ajuda a encontrar repetições diretas em seqüências.

-TESTCODE - Programa que ajuda a identificar seqüências codificadoras plotando uma medição da não randomicidade de composição a cada terceira base.

2.27. Eletroforese de campo pulsado

A eletroforese de campo pulsado de cromossomos de formas epimastigotas de *T. cruzi*, foi gentilmente realizada por Maria Isabel Cano (laboratório do Dr. José Franco da Silveira - Escola Paulista de Medicina) em um gel de agarose 1,2% no aparelho Gene Navigator[®] System da Pharmacia, que utiliza um sistema de eletrodos dispostos em um contorno hexagonal (Chu *et al.* 1986). As condições de corrida e outros aspectos do protocolo serão publicados brevemente pelos autores. Após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado. Os cromossomos foram transferidos para uma matriz de nylon segundo o método de Southern (1975), conforme descrito no item 2.23.1. As membranas, gentilmente cedidas por M. I. Cano, foram hibridizadas com sondas radioativas nas mesmas condições apresentadas no item 2.24.2.

3. RESULTADOS

3.1. Construção da biblioteca genômica de *T. cruzi* em λ gt11

Com o objetivo de isolar genes codificadores de antígenos de *T. cruzi*, procedeu-se à construção de uma biblioteca genômica no vetor de expressão λ gt11. A razão de se preferir utilizar o DNA genômico, ao invés do cDNA, residuiu na evidência de que, ao contrário de outros eucariotos, não foi relatada até o momento a existência de introns nos genes de tripanossomatídeos. Além disso, a construção de bibliotecas genômicas é mais fácil e rápida.

Para a construção da biblioteca, o DNA do parasita foi fragmentado mecanicamente por múltiplas passagens através de uma agulha, conforme descrito no item 2.9.1. Após 1.000 passagens, o DNA apresentou uma população de fragmentos de 2,1 a 5,4 kb, com predominância na faixa de 3,4 kb. Os fragmentos obtidos tiveram suas extremidades reparadas e foram ligados a adaptadores de *Eco*RI de três tamanhos diferentes (item 2.9.1). Os fragmentos foram então ligados com o DNA do vetor de expressão λ gt11 (item 2.9.6) e o produto encapsidado *in vitro* (item 2.9.7).

A biblioteca resultante foi plaqueada (ver item 2.9.8) na presença do substrato cromogênico X-gal e do indutor IPTG. Utilizou-se como hospedeira a cepa Y1090 que apresenta deficiências no sistema de restrição (*hsd R*⁻), bem como na protease *lon*. Dessa forma, essa cepa pode ser utilizada tanto para a amplificação da biblioteca, como para a expressão dos genes clonados. As placas de lise não recombinantes apresentam coloração azul devido à ação enzimática da β -galactosidase sobre o substrato gerando um produto colorido. As recombinantes são brancas, pois com a inserção do fragmento de DNA exógeno na extremidade 3' do gene codificador da β -gal ocorre a produção de uma enzima inativa.

Através da contagem das placas de lise da biblioteca obteve-se como resultado um total de 76% de recombinação. O título da biblioteca foi de $2,1 \times 10^6$ recombinantes. A representatividade da biblioteca pode ser calculada a partir da equação abaixo:

$$N = 6 \times \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)} \quad \text{onde:}$$

N = número de recombinantes necessários a clonagem de um determinado evento.

p = probabilidade.

f = razão entre o tamanho médio da população de fragmentos sobre o tamanho do genoma.

Assumindo-se uma probabilidade de 99% ($p = 0,99$) de qualquer sequência estar representada, bem como a orientação do inserto e o passo de leitura estarem corretos; um tamanho médio da população de fragmentos de 3,4 kb; e uma complexidade genômica de $2,5 \times 10^8$ pb para *T. cruzi* (Lanar *et al.*, 1981), obtém-se um número total de clones

recombinantes de $2,0 \times 10^6$. O título da biblioteca superou, portanto, o valor teórico esperado para a clonagem de determinado evento, com 99% de probabilidade.

3.2. Absorção do soro policlonal anti-tct

Visando a varredura da biblioteca, obteve-se um soro policlonal anti-tct em coelho, conforme a técnica descrita no item 2.7.1. Para a remoção dos anticorpos inespecíficos contra antígenos bacterianos, procedeu-se à absorção do soro (ver item 2.10.1). Após 4 ciclos de absorção o soro ainda apresentou uma pequena reatividade contra placas de lise não recombinantes. Optou-se em não eliminar totalmente essa reatividade, pois ela permite distinguir perfeitamente as placas de lise negativas das positivas. Além disso, a visualização das placas negativas ajuda a identificar mais facilmente o posicionamento das placas positivas e distingui-las de sinais devidos a artefatos.

3.3. Isolamento dos clones recombinantes B12 e B13

A biblioteca genômica de *T. cruzi* foi plaqueada e os clones foram selecionadas utilizando o soro anti-tct absorvido, conforme relatado no item 2.10.2. O plaqueamento de 34.000 recombinantes levou à identificação de 7 sinais positivos. Após três etapas subseqüentes de plaqueamento, destinadas à purificação dos clones, os sinais positivos foram confirmados para apenas dois clones. Esses clones foram denominados B12 e B13 em referência ao número das placas de origem. O DNA dos fagos recombinantes foi obtido por minipreparações (ver item 2.13.1) e digerido com *EcoRI*. Após eletroforese em gel de agarose (dados não mostrados), foi possível determinar o tamanho dos insertos. O clone B12 apresentou um inserto de 350 pb enquanto B13, um fragmento de 600 pb.

3.4. Subclonagem dos insertos B12 e B13 para os vetores M13mpl8 e pUC18

Com a finalidade de subclonar os insertos dos clones B12 e B13, procedeu-se a minipreparações de DNA (item 2.13.1). O DNA foi digerido com *EcoRI* e submetido a uma eletroforese em um gel de agarose LMP. As bandas correspondentes aos respectivos insertos foram recolhidas e o DNA purificado como descrito no item 2.15.3. Os insertos foram ligados ao sítio de *EcoRI* dos vetores M13mpl8 e pUC18. O DNA foi transfectado na bactéria hospedeira JM101 (ver item 2.15.5) e os clones recombinantes foram identificados como descrito no item 2.15.6.. A subclonagem dos insertos dos clones B12 e B13 em pUC 18 visou atender à produção de sondas. Esses insertos são relativamente pequenos quando comparados ao DNA de λ gt11. Como consequência, a digestão de uma dada massa desse DNA recombinante com *EcoRI* acaba rendendo uma pequena quantidade de DNA de inserto.

Utilizando o vetor pUC18, cujo tamanho é de 2,7 kb, acaba-se obtendo uma massa relativamente maior de inserto liberado por massa de DNA digerido. A subclonagem de B12 e B13 no vetor M13mpl8 visou a determinação da sequência nucleotídica desses fragmentos.

3.5. Seqüenciamento dos clones B12 e B13

As placas brancas de M13 recombinante foram utilizadas para a produção de fitas-molde destinadas à reação de seqüenciamento (ver item 2.25.2.1). O seqüenciamento dos moldes de DNA de fita simples foi feito pelo método de terminação de cadeia (Sanger, 1977), conforme descrito no item 2.25.2.2. Foram obtidos subclones em cada uma das orientações dos insertos. A seqüência total do clone B12 revelou um inserto de 350 pb, contendo aproximadamente 6 repetições seriadas de 60 pb ao longo de toda a seqüência. As repetições são bem conservadas, mas contém algumas variações, como pode ser visto na Figura 1. A seqüência do clone B12 é inédita na literatura. O clone B13 foi seqüenciado parcialmente, nas extremidades 5' e 3' do inserto. Esse clone também apresenta um padrão de seqüências repetidas em série (aproximadamente 17), contendo 36 pb. A seqüência do clone B13 é homóloga à do clone #2 descrito por Ibañez *et al.* (1987, 1988) e do clone TCR39 isolado por Hoft *et al.* (1989).

3.6. Análise do arranjo genômico dos clones B12 e B13

O arranjo genômico dos insertos clonados foi determinado por Southern blot com DNA de epimastigotas (cepa Y) digerido com *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Nco*I e *Sal*I. As sondas B12 e B13 foram sintetizadas a partir dos clones de M13 recombinantes, utilizando a técnica de "primer extension" (ver item 2.12.2). Conforme pode ser visto na Figura 2, a sonda B12 hibridizou com bandas únicas em todas as digestões, com exceção de *Sal*I, onde houve hibridização com uma dupla de bandas na região de 9,4 kb e uma banda de 1,85 kb. A sonda B13 hibridizou com uma banda única na digestão com *Bam*HI e com duas bandas nas demais digestões. Esse resultado parece indicar que ambos os genes devem ter apenas uma cópia por genoma haplóide ou então formar um aglomerado de cópias homogêneas e seriadas. Um fato interessante é que ambas as sondas hibridizam com a dupla de bandas de 9,4 kDa. Como será visto adiante (ver item 3.13), isso é uma consequência da proximidade física dos dois genes.

B12																			
CCA	CCC	GCG	GAG	TCT	CCT	CTC	AAG	AGC	GTG	TTT	GGA	GCA	CCG	TCT	TCG	ACT	GCT	GCA	AAG
P	P	A	E	S	P	L	K	S	V	F	G	A	P	S	S	T	A	A	K
*					*		*												
ACC					TTC		ACC												
T					F		N												
B13																			
CCA	CCA	TTT	GGA	CAG	GCC	GCA	GCA	GGT	GAC	AAA	CCA								
P	P	F	G	Q	A	A	A	G	D	K	P								
*	*						*	*			*								
TCA	CTA						GAA	GCT			CTA								
S	L						E	A			L								

Figura 1 - Sequências nucleotídicas das repetições seriadas dos clones B12 e B13. As seqüências protéicas deduzidas e as posições variáveis estão apresentadas.

Figura 2 - Southern blot de DNA de formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) digerido com diferentes enzimas de restrição e hibridizado com sondas dos clones B12 e B13. Gel de agarose 0,7%. Enzimas: (B) *Bam*HI; (E) *Eco*RI; (H) *Hind*III; (N) *Nco*I; (S) *Sal*I. Marcadores de peso molecular, em quilobases, estão indicados.

Com o objetivo de verificar se há uma variação do arranjo genômico entre diferentes cepas e estágios evolutivos do parasita, procedeu-se a um ensaio de Southern blot contendo DNA das cepas Y e CL e do clone CL14, isolado de formas epimastigotas e tripomastigotas e digerido com *HindIII*. O resultado está apresentado na Figura 3, onde podemos verificar que há uma variação entre as cepas Y e CL, mas não entre as formas epimastigotas e tripomastigotas de uma mesma cepa. A sonda B12 (Figura 3A) hibridizou com uma banda única em epimastigotas (canal *a*) e tripomastigotas (canal *d*) da cepa Y. Ao contrário, em epimastigotas da cepa CL (canal *b*) e do clone CL14 derivado da cepa CL (canal *c*), e tripomastigotas da cepa CL (canal *e*), houve hibridização com duas bandas. Para o clone B13 (Figura 3B) também foram evidenciadas diferenças no arranjo genômico entre cepas (comparar canais *a* e *b* ou *d* e *e*), porém apenas quanto ao tamanho dos fragmentos que hibridizam com a sonda. Novamente não se verificou nenhuma variação entre as formas epimastigotas e tripomastigotas (comparar canais *a* e *d* ou *b* e *e*).

3.7. Identificação dos transcritos correspondentes a B12 e B13

Com o objetivo de se identificar as espécies de mRNA correspondentes aos insertos B12 e B13 procedeu-se à purificação de RNA total de formas epimastigotas e tripomastigotas pelo método do fenol quente, como relatado no item 2.8.3. O rendimento médio obtido nesse método foi da ordem de 20 µg de RNA total por 10⁸ epimastigotas e cerca da metade para tripomastigotas. O RNA total foi submetido a uma eletroforese em gel desnaturante de agarose/formaldeído, como descrito no item 2.24.1. Como controle, utilizou-se uma amostra desse RNA previamente tratada com 50 mM NaOH por uma hora a 67°C. O RNA foi então transferido para nitrocelulose e hibridizado com sondas marcadas dos clones B12 e B13. Conforme podemos ver na Figura 4, a sonda B12 hibridizou com uma banda larga de cerca de 7,2 a 8,8 kb em RNA de epi e tripomastigotas. Como será visto adiante (Figura 15) essa banda é composta por duas espécies co-migrantes, não resolvidas na concentração de agarose utilizada nesse gel (1,2%). B13 hibridizou com bandas de 3,5 e 4,2 kb em ambas as formas evolutivas. O controle tratado com NaOH não apresentou nenhum sinal, indicando que a hibridização não se devia à presença de DNA contaminante.

3.8. Expressão dos clones B12 e B13

3.8.1. Expressão das proteínas de fusão em bactérias lisogênicas Y1089

Os fagos recombinantes de λ gt11 foram utilizados para lisogenizar a bactéria hospedeira Y1089, que apresenta uma mutação que favorece uma alta frequência de

Figura 3 - Southern blot de DNA de *T. cruzi* digerido com *Hind*III e hibridizado com sondas dos clones B12 e B13. Amostras: (a) epimastigotas da cepa Y; (b) epimastigotas da cepa CL; (c) epimastigotas do clone CL14; (d) tripomastigotas da cepa Y; (e) tripomastigotas metacíclicas do clone CL 14. Marcadores de peso molecular, em quilobases, estão indicados.

Figura 4 - Northern blot de RNA total de *T. cruzi* hibridizado com as sondas dos clones B12 e B13. Amostras: (C) controle de RNA de epimastigotas previamente tratado com 50 mM NaOH; (E) RNA de epimastigotas; (T) RNA de tripomastigotas. Marcadores de peso molecular de DNA de λ cl857 digerido com *Hind*III, em quilobases, estão indicados.

lisogenização (*hflA150*). A lisogenização foi efetuada conforme o item 2.16.1.1. A maior eficiência de lisogenização foi obtida com uma multiplicidade de infecção de 500. As bactérias lisogênicas dos clones B12 e B13 foram induzidas por diferentes períodos de incubação a fim de otimizar a produção da proteína de fusão (ver item 2.16.1.2). Como controle da indução foi utilizada uma bactéria lisogênica de λ gt11 não recombinante. Mesmo após várias tentativas, não se observou nenhuma banda correspondente à proteína de fusão, em géis de poliacrilamida com SDS corados com azul de Coomassie ou com nitrato de prata. A bactéria lisogênica do λ gt11 não recombinante apresentou uma boa expressão de β -galactosidase, atestando que as condições do experimento foram adequadas. É possível que a expressão das proteínas de fusão fosse extremamente baixa ou então houvesse um alto grau de degradação. Foi tentado o uso de um tampão de amostra de proteína contendo 1 mM de inibidores de proteases (PMSF e TLCK), assim como a utilização de aquecimento a 55°C ao invés de fervura por 3 minutos. Em nenhum caso houve expressão visível das proteínas de fusão nos géis de poliacrilamida. Em vista desses resultados, tentou-se fazer um Western blot dos lisados das bactérias induzidas, utilizando o soro anti-trípomastigota que serviu para a varredura da biblioteca, e que foi previamente absorvido contra antígenos de *E. coli*. Esse teste, por ser muito mais sensível do que qualquer coloração de proteína em gel, poderia indicar se houve ao menos uma pequena expressão das proteínas de fusão. De fato foi possível verificar que o soro reconheceu uma proteína de 132 kDa para o clone B12 e de 140 kDa para o clone B13. Não houve qualquer reação do soro frente a um lisado de uma bactéria lisogênica de λ gt11 não recombinante (dados não mostrados). Os pesos moleculares das proteínas de fusão são compatíveis com o tamanho dos respectivos insertos clonados.

3.8.2. Expressão e purificação das proteínas de fusão em DH5 α /pMSgt11

3.8.2.1. Subclonagem de B12 e B13 no vetor pMSgt11

Em função da baixa expressão das proteínas de fusão no vetor λ gt11, decidiu-se subclonar os insertos B12 e B13 no vetor pMSgt11, gentilmente cedido pelo Dr. Artur Scherf (Institute Pasteur, Paris). Esse vetor tem 5350 pb e apresenta os genes de resistência à ampicilina e o *lacZ*. Na extremidade 3' terminal do gene *lacZ* existe uma região de múltiplos sítios de restrição. A tradução de um inserto clonado no sítio de *EcoRI* obedece ao mesmo passo de leitura existente no vetor λ gt11. No sistema DH5 α /pMSgt11 não existe o gene *lacI^q*, cujo produto é a proteína repressora que se liga ao sítio operador do operon-*lac*. Conseqüentemente, a síntese de β -galactosidase é constitutiva nessa bactéria. Outra característica desse sistema é que a proteína de fusão também é enzimaticamente ativa, impedindo uma distinção entre os clones recombinantes e não recombinantes pela

coloração das colônias plaqueadas com X-Gal. Além disso, entre a extremidade carboxila terminal da β -galactosidase e o polipeptídeo recombinante existe uma sequência de 4 aminoácidos que define um sítio de clivagem por Fator Xa. Essa característica permite a separação e obtenção do antígeno clonado em sua forma isolada (Scherf *et al.*, 1990).

O DNA dos clones B12 e B13 em λ gt11 foi obtido por minipreparações (ver item 2.13.1). Após digestão com *EcoRI* seguida de eletroforese em agarose LMP, os insertos foram excisados e purificados (ver item 2.15.3). A seguir os fragmentos foram ligados ao DNA do vetor pMSgt11 e as amostras foram utilizadas para transformar a hospedeira DH5 α . Para a identificação dos clones positivos foi feito um imunoensaio das colônias bacterianas, conforme descrito no item 2.16.2.2. Foram selecionadas várias colônias isoladas com sinal positivo, as quais foram testadas quanto à expressão do produto recombinante.

3.8.2.2. Expressão das proteínas de fusão B12 e B13

As células hospedeiras contendo o vetor recombinante foram cultivadas e lisadas como descrito (itens 2.16.2.3 e 2.16.2.4). As amostras de lisados obtidos em pequena escala foram submetidas a uma separação eletroforética em gel de poliacrilamida com SDS. O gel foi corado e os resultados demonstraram uma alta expressão das proteínas de fusão dos clones B12 e B13. Estimativas indicam uma produção da ordem de 30 a 50 mg de proteína de fusão por litro de cultura. Bandas com peso molecular de 132 kDa (B12) e 140 kDa (B13) foram localizadas, mas uma banda de 116 kDa também apareceu bem corada em ambas as amostras, indicando ser possivelmente um produto de degradação parcial (resultados não mostrados).

3.8.2.3. Determinação da solubilidade das proteínas de fusão

Proteínas eucarióticas recombinantes, quando expressas em *E. coli*, podem se acumular no citoplasma das bactérias. Frequentemente, no entanto, essas proteínas formam agregados insolúveis denominados corpúsculos de inclusão. O sistema de expressão empregado, a natureza do polipeptídeo recombinante e a taxa de expressão podem determinar se o produto formará agregados, contudo o mecanismo envolvido na sua geração não é totalmente conhecido. Os corpúsculos de inclusão podem ser observados em microscopia de contraste de fase devido ao seu alto índice de refração. Pelo fato de eles representarem agregados protéicos insolúveis, sua purificação é mais complicada. Foram desenvolvidas técnicas pelas quais esses agregados são sedimentados e a proteína, sob ação de agentes desnaturantes, é gradativamente solubilizada. Finalmente, a proteína semi-purificada é renaturada, assumindo sua conformação nativa (Marston, 1986; 1987).

Com a finalidade de verificar se as proteínas de fusão dos clones B12 e B13 em pMSgt11 podiam ser isoladas na forma de um sedimento insolúvel, procedeu-se à técnica descrita no item 2.16.2.5. O lisado bacteriano foi centrifugado e o sedimento tratado com diferentes concentrações de detergente e uréia. As amostras coletadas de cada etapa do experimento foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. Foi verificado que as proteínas de fusão dos clones B12 e B13 permaneceram essencialmente no sobrenadante inicial, indicando que não houve formação de corpúsculos de inclusão. Esses resultados estão de acordo com os obtidos para a maior parte das proteínas clonadas em pMSgt11 (Scherf *et al.*, 1990). Sabendo-se então que as proteínas de fusão dos clones B12 e B13 eram solúveis, partiu-se para a sua purificação por cromatografia de afinidade.

3.8.2.4. Purificação das proteínas de fusão

As proteínas de fusão de B12 e B13 foram purificadas a partir do lisado bacteriano em colunas de pAPTG-agarose. O pAPTG, sendo um galactosídio, tem afinidade pela β -galactosidase. Essa afinidade pode ser diminuída pelo emprego de um tampão com pH alcalino. Com base nessas características, procedeu-se a uma cromatografia de afinidade em colunas de pAPTG-agarose, como descrito no item 2.16.2.6. As frações de 1 mL, eluídas com tampão tetraborato, tiveram sua atividade enzimática determinada, utilizando ONPG como substrato (ver item 2.16.2.7). O produto da hidrólise catalisada pela β -galactosidase é o *o*-nitrofenol, que tem coloração amarela. As frações de números 2 a 6 demonstraram reprodutivelmente a maior atividade e foram reunidas e utilizadas para os experimentos posteriores.

As proteínas de fusão purificadas foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. Na Figura 5A podem ser vistas as proteínas de fusão dos clones B12 (canal a) e B13 (canal b). Além das bandas de 132 kDa e 140 kDa existem outras de peso molecular inferior, principalmente de 116 kDa, que são produtos de degradação parcial. A análise por Western blot (Figura 5B) revelou que as bandas correspondentes às proteínas de fusão, assim como a banda de 116 kDa e algumas bandas de menor peso molecular são reconhecidas por uma mistura de soros humanos chagásicos. O mesmo ensaio foi feito com o soro de coelho anti-tct, obtendo-se resultados idênticos (dados não mostrados). Uma amostra controle, contendo β -galactosidase não recombinante, não foi reconhecida pelos soros (dados não mostrados), indicando que tanto a proteína de 116 kDa, como as bandas de mais baixo peso molecular são produtos de degradação parcial que contém ainda fragmentos do antígeno clonado.

Figura 5 - Proteínas de fusão dos clones B12 (a) e B13 (b), produzidas no sistema DH5 α /pMSgt11 e purificadas por afinidade em colunas de pAPTG. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com azul de Coomassie; (B) Western blot incubado com uma mistura de soros humanos chagásicos pré-absorvida contra antígenos de *E. coli*. Marcadores de peso molecular em quilodaltons são apresentados.

Foram tentados diferentes tempos de incubação no cultivo da bactéria produtora com o intuito de verificar se esta degradação não poderia ser reduzida. Foi verificado (dados não mostrados) que as proteínas de fusão começam a ser visualizadas em gel após 4 horas de incubação e que sua concentração não aumenta depois de 7 horas. A banda de 116 kDa aparece simultaneamente à proteína de fusão íntegra. Também foram testadas duas hospedeiras diferentes (RRIΔM15 e CAG456), que contêm o gene *lacI*^q. Contudo, mesmo nesses sistemas indutivos, não foi observada melhora da expressão e nem diminuição da degradação protéica.

3.9. Caracterização dos antígenos de *T. cruzi* clonados

3.9.1. Uso de soros policlonais obtidos por imunização de coelhos com as proteínas de fusão

As proteínas de fusão foram utilizadas em imunizações de coelhos. Os animais foram inoculados por via subcutânea ou por múltiplas inoculações intradérmicas (ver itens 2.7.2.1 a 2.7.2.3). Contudo, a resposta imune obtida foi muito baixa, especialmente para o antígeno B12. Uma vez que os animais inoculados intradermicamente haviam demonstrado o desenvolvimento de certa resposta imune, decidiu-se utilizá-los para uma tentativa final de aumento do título de anticorpos. Os animais foram inoculados por via intravenosa com duas doses de 300 µg do antígeno, intercaladas por 2 semanas. Os animais foram sangrados 1 mês após a última dose. O nível de anticorpos, estimado por dot-blot e Western-blot, apresentou um pequeno incremento.

Como o objetivo de identificar os antígenos de *T. cruzi*, correspondentes a B12 e B13 e reconhecidos por esses soros, procedeu-se a um ensaio de Western blot (ver itens 2.20.1 a 2.20.3). Visando obter uma melhor resolução dos antígenos detectados, realizaram-se os ensaios em duplicata, com géis de 5% e 8% de poliacrilamida. O soro anti-β-gal-B12 reconheceu bandas de 200 kDa em epimastigotas (Figura 6A, tira c) e 230 kDa em tripomastigotas (Figura 6C, tira c). O soro anti-β-gal-B13 reconheceu duas bandas principais de 135 e 116 kDa em epimastigotas (Figuras 6A, tira d) e de 140 e 116 kDa em tripomastigotas (Figuras 6B e 6C, tiras d). O soro anti-β-gal-B13 também reconheceu bandas de 70 a 90 kDa em epimastigotas (Figura 6A, tira d) e de 72 e 82 kDa em tripomastigotas (Figura 6B, tira d). Essas bandas de menor peso molecular podem ser produtos de degradação parcial da proteína, uma vez que não são visualizadas reprodutivelmente em experimentos feitos com diferentes lisados (comparar as tiras d nas Figuras 6A e 6B com a tira d da Figura 6C). Outra alternativa é que essas bandas representam antígenos que

compartilham epítopos em comum. O soro anti- β -galactosidase reagiu com uma banda de cerca de 39 kDa em epimastigotas (Figura 6A, tira *b*) e 60 kDa em tripomastigotas (Figura 6B, tira *b*). Um soro normal controle não apresentou reatividade (Figuras 6A, 6B e 6C, tira *a*).

3.9.2. Uso de anticorpos humanos imuno-selecionados

O peso molecular dos antígenos clonados foi confirmado por outra técnica. No item 3.8.2.4. foi relatado que uma mistura de soros humanos chagásicos reconhece as proteínas de fusão (ver Figura 5). Decidiu-se então proceder a um ensaio de imuno-seleção de anticorpos chagásicos e utilizá-los posteriormente em Western blot de *T. cruzi*. Esse ensaio foi realizado com a participação de Paulo Germano Marmorato, estagiário de iniciação científica. Para isso, a fração de IgG foi isolada a partir de uma mistura de soros chagásicos (ver item 2.18.2). Colunas de Sepharose foram acopladas às proteínas β -gal-B12, β -gal-B13 e, como controle, à β -galactosidase (ver item 2.18.1). A eficiência de acoplamento foi de 66% para a β -gal, 58% para β -gal-B12 e 54% para β -gal-B13. As imunoglobulinas purificadas foram submetidas, seqüencialmente, a uma cromatografia de afinidade nas colunas de β -gal, β -gal-B12 e β -gal-B13, visando obter anticorpos específicos a epítopos de β -gal, B12 e B13, respectivamente (ver item 2.18.3). Os anticorpos eluídos com pH ácido foram utilizados em ensaios de Western blot. Na Figura 6D estão apresentados os resultados obtidos frente a um lisado de tripomastigotas. O eluato anti- β -gal-B13 reconheceu bandas de 140, 120 e 35 kDa (tira *d*). Anticorpos purificados de soros chagásicos, mas não submetidos à imuno-seleção, também reconheceram essas bandas (dados não mostrados). O eluato anti- β -gal não demonstrou reatividade (tira *b*), assim como a IgG humana purificada de indivíduos normais e utilizada como controle (tira *a*). Esse resultado também foi encontrado para formas epimastigotas (dados não mostrados). O eluato anti- β -gal-B12, embora utilizado em várias condições, não apresentou reatividade (tira *c*).

3.10. Determinação da localização celular em *T. cruzi* dos antígenos clonados

Tendo sido elucidado o peso molecular dos antígenos clonados, decidiu-se investigar se eles estão presentes na superfície do parasita. Para isso, parasitas vivos tiveram as suas proteínas de superfície marcadas com Na^{131}I , utilizando Iodogen[®] como catalisador, conforme descrito no item 2.21.1. Formas epimastigotas e tripomastigotas radioiodadas foram lisadas e submetidas a ensaios de imunoprecipitação, como relatado no item 2.21.2. Nesse caso também, visando reduzir o nível de anticorpos anti- β -gal gerados por todos os animais, realizaram-se imunoprecipitações seqüenciais dos lisados de parasitas com os soros de coelhos anti- β -gal, anti- β -gal-B12 e anti- β -gal-B13, respectivamente. Os resultados

Figura 6 - Western blot de lisados de epimastigotas (A) e tripomastigotas (B, C, D) separados por SDS-PAGE em géis com 8% (A, B, D) ou 5% (C) de acrilamida. Os filtros de nitrocelulose foram incubados com soros de coelho (A, B, C) ou com anticorpos humanos obtidos por imuno-seleção (D). Anticorpos: (a) normal; (b) anti- β -galactosidase; (c) anti- β -gal-B12; (d) anti- β -gal-B13. Marcadores de peso molecular em quilodaltons estão indicados.

da imunoprecipitação de tripomastigotas são visualizados na Figura 7. Podemos verificar que os soros normal e anti- β -gal não reconheceram nenhum antígeno de superfície (canais N e β). O soro anti-tct precipitou um grande número de bandas, na faixa de 66 a 180 kDa (canal TCT). O soro anti- β -gal-B13 precipitou um antígeno de 140 kDa (canal B13), gerando uma banda muito bem definida. Esse resultado foi confirmado em mais de um ensaio. Com relação à localização celular de B12, o resultado da imunoprecipitação é inconclusivo. Na Figura 7 (canal B12) podem ser visualizadas algumas bandas de intensidade fraca, na faixa de 150 a 170 kDa. Contudo, esse resultado não demonstrou reprodutibilidade. Em um ensaio de imunoprecipitação de formas epimastigotas, realizado com os soros anti- β -gal-B12 e anti- β -gal-B13, não se obteve a precipitação de nenhum antígeno de superfície (dados não mostrados).

3.11. Avaliação dos antígenos B12 e B13 no diagnóstico sorológico da doença de Chagas

3.11.1. Padronização do radioimunoensaio

O fato de as proteínas recombinantes serem reconhecidas por uma mistura de soros de pacientes chagásicos (ver Figura 5B) abriu a possibilidade de sua utilização para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Nesse sentido buscou-se padronizar um método destinado à avaliação desses antígenos frente a um painel de soros humanos chagásicos e não chagásicos. Essa padronização foi realizada com a participação de Camila Bálsamo Ramalho, estagiária de iniciação científica. A escolha do RIA para a medição da resposta sorológica foi feita em função de facilidades do laboratório para essa técnica. Contudo, como será visto adiante, o método pode ser adaptado para um ensaio de ELISA.

As proteínas de fusão, produzidas no sistema pMSgt11/DH5 α e purificadas por afinidade, foram utilizadas para a padronização de um radioimunoensaio para diagnóstico da doença de Chagas. O RIA foi feito de acordo com o protocolo descrito no item 2.17.1. Inicialmente padronizou-se a quantidade de antígeno que deveria ser colocada em cada poço da microplaca. Para essa determinação, foram utilizados soros-padrão de indivíduos chagásicos e normais em ensaios onde se variou simultaneamente a quantidade de antígeno e a diluição dos soros. Em todas as etapas de padronização, os soros foram incubados em poços separados com a β -gal não recombinante para se ter uma avaliação da resposta imune a essa proteína. As curvas de calibração demonstraram que massas de 20 a 30 ng de antígeno por poço e diluições de 1:100 dos soros permitiam uma discriminação eficiente entre os soros normais e os chagásicos. Também se verificou que os soros normais e chagásicos apresentaram uma reatividade muito baixa frente à β -galactosidase.

Figura 7 - Imunoprecipitação de tripomastigotas radioiodados na superfície com (N) soro normal de coelho; (β) soro anti- β -gal; (B12) soro anti- β -gal-B12; (B13) soro anti- β -gal-B13; (TCT) soro anti-tct. Marcadores de peso molecular em quilodaltons estão indicados.

3.11.2. Análise de reatividade de soros humanos por RIA

Tendo padronizado o método do RIA, decidiu-se fazer um levantamento com 128 soros, sendo 70 de pacientes chagásicos, 38 de pacientes com outras parasitoses e 20 de indivíduos normais. Nessas amostras, estão incluídos 50 soros fornecidos pela OMS (Organização Mundial da Saúde) para um estudo multicêntrico para a avaliação de antígenos recombinantes com fins diagnósticos (Luquetti, 1990). A análise estatística dos dados foi feita de acordo com o método adotado pela OMS para esse estudo (Moncayo & Luquetti, 1990), empregando-se o índice κ (Kappa), como descrito no item 2.17.3. Como podemos ver na Tabela I, o antígeno B12 obteve um índice Kappa de 0,61, enquanto B13 obteve $\kappa=0,94$. Analisando a mesma tabela, podemos observar que B12 apresenta um desempenho menos eficiente em relação a B13. O antígeno B12 obteve uma sensibilidade de 83% e uma especificidade de 78%, enquanto que B13 apresentou 97% de sensibilidade e especificidade.

Em outros estudos realizados (Zingales *et al.*, 1990; Gruber & Zingales, 1993), foi observado que alguns soros chagásicos reconheciam um dos antígenos mas não o outro (indistintamente do antígeno ser B12 ou B13). Isso poderia indicar que o reconhecimento de determinantes antigênicos pudesse estar relacionado com a forma de manifestação clínica da doença de Chagas. Para testar essa hipótese, foram utilizados 37 soros de pacientes com diagnóstico clínico bem definido (13 cardiopatas, 13 assintomáticos e 11 com a forma digestiva). Não foi evidenciada nenhuma correlação entre a forma clínica e a reação preferencial com cada antígeno (dados não mostrados).

Em vista dos resultados descritos acima, decidiu-se investigar se a reatividade preferencial aos antígenos B12 e B13 poderia estar relacionada com o zimodema da cepa infectante de cada paciente. Utilizaram-se 12 soros da região de Bambuí MG, classificados de acordo com o zimodema da cepa de *T. cruzi* isolada do respectivo paciente (Romanha *et al.*, 1979) e a manifestação clínica da doença de Chagas. Os resultados não indicaram correlação entre a resposta a B12 e B13 e um zimodema particular (Gruber & Zingales, 1993).

Finalmente, investigou-se a estabilidade do antígeno B13. A proteína de fusão, na concentração de 1 mg/mL em PBS, foi mantida à temperatura ambiente por até 2 semanas e a -20°C até um período de 12 meses. Alíquotas, tomadas em diferentes tempos, foram utilizadas em testes de RIA com soros-padrão positivos e negativos. Os resultados demonstraram que o antígeno reteve sua sensibilidade e especificidade originais ao longo dos períodos testados.

Tabela I - Reatividade das proteínas recombinantes B12 e B13 a soros de indivíduos normais, pacientes chagásicos e pacientes com outras parasitoses em radioimunoensaio.

Soros humanos ^a	Nº de amostras	Reatividade ^b	
		B12	B13
Positivos			
Doença de Chagas	70	58	68
Negativos			
Normal	20	7	1
Leishmaniose	13	3	1
Malária	12	1	0
Toxoplasmose	8	1	0
Esquistossomose	5	1	0
Sensibilidade		0,83	0,97
Especificidade		0,78	0,97
Índice Kappa		0,61	0,94

^a Classificados como positivos e negativos de acordo com a sorologia convencional para doença de Chagas.

^b Número de soros.

3.11.3. Análise de reatividade de soros humanos por ELISA

Em função dos resultados promissores de B13, a empresa Polychaco S.A.I.C. (Argentina) propôs testar o antígeno em ELISA, uma técnica rotineiramente empregada em laboratórios clínicos. As condições de utilização foram padronizadas visando maximizar a eficácia natural de B13 em discriminar populações humanas infectadas ou não por *T. cruzi*. Nesse estudo foram analisados 209 soros de indivíduos encaminhados por clínicos para um Centro de Referência (Instituto Nacional de Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas - Fátala Chaben, Buenos Aires, Argentina). Os resultados apresentados a seguir foram gentilmente cedidos pelo Dr. Jorge Yanovski e obtidos com reagentes da Polychaco e antígeno B13 produzido e purificado em nosso laboratório.

Esses soros foram analisados por hemaglutinação, aglutinação direta, imunofluorescência direta e ELISA, todos empregando um lisado total de epimastigotas; e por ELISA com a proteína B13. Um total de 124 amostras foram negativas para os testes convencionais e para B13. Em testes de ELISA, empregando 50 ng de B13, essas amostras negativas apresentaram uma densidade ótica (D.O.) média de 0,107. A média de 99% dos valores das amostras negativas, somada a três desvios padrão, permitiu definir um valor de corte ("cutoff") de 0,150. Um total de 85 soros foram considerados positivos para a doença de Chagas por sorologia clássica e por ELISA com B13. Para esse antígeno, 70% das amostras positivas apresentaram valores de D.O. superiores a 0,550, com uma média de 0,587. Apenas 2 amostras (2,3%) apresentaram uma D.O. de 0,160, pouco superior ao valor de corte.

3.12. Isolamento de clones a partir de uma biblioteca genômica em λ EMBL3

Com o intuito de se isolar clones genômicos correspondentes aos clones B12 e B13, utilizou-se uma biblioteca genômica de *T. cruzi* em λ EMBL3 (construída por Monika Vieira de Arruda). A biblioteca foi plaqueada e clones positivos foram selecionados utilizando-se como sondas os insertos B12 e B13 marcados com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$. Conforme descrito no item 2.11, foram utilizados dois filtros de nitrocelulose por placa, de forma que um deles era a réplica do outro. Cada um dos filtros foi hibridizado com uma das duas sondas. Foram obtidos 4 sinais positivos com a sonda B12 e 3 sinais com a sonda B13. Quando a localização desses sinais nas placas foi comparada, verificou-se que havia uma coincidência em 3 deles. Foram feitos replaqueamentos dos 4 sinais, visando a purificação dos recombinantes. Uma vez puros, a hibridização de 3 desses clones genômicos com ambas as sondas, derivadas de B12 e B13 respectivamente, foi confirmada. Esses clones foram denominados BGE2, BGE7 e BGE14. O clone que hibridizou apenas com a sonda B12 foi denominado BGE9.

3.13. Determinação do mapa de restrição de uma região de 32 kb

As amostras de DNA dos clones genômicos de λ EMBL3 foram digeridas conforme o item 2.15.1. Para a elaboração do mapa de restrição, foram escolhidas as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Nco*I, *Sal*I e *Stu*I. Essa escolha se deveu ao fato de elas apresentarem poucos sítios de clivagem no vetor, sendo alguns deles próximos do sítio de policlonagem (Frischauf *et al.*, 1987), o que facilita a dedução do mapa de restrição. Essas enzimas foram utilizadas isoladamente, ou em digestões duplas e triplas. As amostras de DNA digeridas com as endonucleases de restrição foram submetidas a um ensaio de Southern blot (ver itens 2.23.1 e 2.23.2). Para a hibridização, foram utilizadas sondas de fita simples, preparadas como descrito no item 2.12.2. Conforme pode ser visto na Figura 8, confirmou-se o fato de os clones BGE 2, BGE 7 e BGE 14 apresentarem regiões homólogas aos clones B12 e B13. O clone BGE 9 somente apresentou hibridização com a sonda derivada do clone B12. A sobreposição dos mapas dos quatro clones genômicos permitiu elucidar o mapa de uma região de 32 kb que contém os genes completos correspondentes aos clones B12 e B13. Por convenção, designou-se uma numeração para os sítios de restrição em ordem crescente, da esquerda para a direita do mapa. Os dois genes estão muito próximos e a distância entre os fragmentos homólogos a B12 e B13 é de cerca de 3 kb. A interpretação final dos mapas de restrição dos clones de λ EMBL3 mostra que houve deleções em grau variável nos clones BGE 7 e BGE 14 (Figura 8, linhas pontilhadas). Cultivos seriados do fago BGE7 e posteriores preparações de seu DNA resultaram em deleções progressivas da região que contém as repetições seriadas homólogas a B13 (dados não mostrados). Esse resultado sugere que as deleções foram provocadas por um artefato de recombinação do sistema empregado e não devido a variações presentes em diferentes células de uma população de *T. cruzi*. Esses aspectos serão melhor discutidos no item 4.5.

Algumas regiões do mapa de 32 kb tiveram que ser elucidadas com abordagens específicas. O fragmento de 5,35 kb, compreendido entre os sítios S2 e S3 de *Sal*I (consulte Figura 8), foi subclonado em pUC18 com o objetivo de determinar o posicionamento relativo dos sítios internos de *Hind*III. Para isso, deduziu-se um mapa de restrição mais completo do fragmento S2S3, em que o posicionamento dos sítios de *Hind*III foi obtido por comparação com as posições de outros sítios de restrição (dados não mostrados). Para a elucidação dos sítios internos de *Sal*I, compreendidos entre os sítios H4 e E2, subclonou-se o fragmento H4E2 do clone BGE7 (consulte Figura 8) no vetor pUC18. O DNA foi então digerido completamente com *Eco*RI ou com *Hind*III e parcialmente com *Sal*I. Em função do tamanho dos fragmentos gerados pela digestão parcial foi possível estabelecer as posições relativas dos sítios S3, S4 e S5 (dados não mostrados). O sítio S1 (ver Figura 8) está

Figura 8 - Mapas de restrição dos clones genômicos BGE2, BGE7, BGE9 e BGE14 que contêm as seqüências de repetições seriadas homólogas aos clones B12 (quadro branco) e B13 (quadro hachurado). Também está mostrada a região de 32 kb do genoma de *T. cruzi* coberta por esses clones. As letras e números no mapa indicam a posição dos sítios de restrição citados no texto. As linhas pontilhadas referem-se a regiões de deleções nos clones. As flechas indicam o sentido de transcrição dos genes B11, B12 e B13 (ver texto). O fragmento SE1, discutido no texto, está assinalado com asteriscos (clone BGE7). Enzimas: B = *Bam*HI; E = *Eco*RI; H = *Hind*III; N = *Nco*I; S = *Sal*I; St = *Stu*I.

localizado a uma distância de cerca de 200 pares de bases do sítio S2. O fragmento S1S2 nunca chegou a ser visto em digestões dos clones genômicos devido à sua massa reduzida em comparação ao resto do DNA do clone. Sua dedução se deve ao fato de a soma dos tamanhos dos fragmentos N1S1 e S2H1 ser 200 pb menor do que o fragmento N1H1. Para a confirmação de sua existência procedeu-se à subclonagem do fragmento E1H1 em pUC18. Quando uma massa de 3 µg de DNA desse clone foi digerida com *SaII*, foi possível visualizar um fragmento de tamanho compatível com o fragmento S1S2 (dados não mostrados).

Em virtude de os clones genômicos terem apresentado deleções, decidiu-se confirmar a proximidade física entre os genes B12 e B13 por meio de uma análise de Southern blot genômico de *T. cruzi* (ver Figura 9). Para isso, o DNA de *T. cruzi* foi digerido com *SaII* e hibridizado com B12, B13 e uma sonda feita a partir do fragmento E2B4 da região intergênica (consultar Figura 8). Conforme pode ser visto na Figura 9, as sondas B12 (canal a), B13 (canal h) e E2B4 (canal b) hibridizaram com uma banda comum de 9,4 kb. Esse resultado confirma que os genes B12 e B13 estão fisicamente próximos no genoma do parasita. Além disso, a sonda intergênica E2B4 também foi hibridizada com os DNAs de *T. cruzi* (canal c) e dos clones genômicos BGE2 (canal d), BGE7 (canal e), BGE9 (canal e) e BGE14 (canal g), digeridos com *EcoRI* e *BamHI*. Verifica-se que a sonda hibridiza com a mesma banda de 1,05 kb, correspondente ao fragmento E2B4 em todos os eventos. Esse resultado prova que a banda da região intergênica é comum a todos os clones genômicos e está presente no genoma do parasita.

3.14. Expressão e purificação da proteína GST-S3S4

3.14.1. Construção do clone pGEX3X-S3S4

A proteína de fusão B12 demonstrou uma eficiência bastante inferior à proteína B13 nos testes de RIA para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas (vide item 3.11.2). Além disso, sua utilização como agente imunizante em coelhos induziu uma resposta humoral baixa (item 3.9.1). O clone pGEX3X-S3S4 foi construído com a finalidade de obter-se a produção de uma proteína com maior quantidade de epitopos de B12 em relação àqueles presentes na proteína β-gal-B12. Decidiu-se subclonar o fragmento S3S4 (Figura 8), devido ao seu tamanho (1,85 kb) e por hibridizar com a sonda B12, no vetor de expressão pGEX3X (Smith & Johnson, 1988), que expressa a proteína em fusão com a GST (glutathione S-transferase) de *Schistosoma japonicum* (uma proteína de 27,5 kDa).

Para esse propósito, utilizou-se um clone de S3S4 no vetor pBluescript[®], previamente construído a partir do DNA de BGE7. Conforme relatado no item 2.16.3.1, o DNA de pBluescript[®] foi digerido por *HincII*. Essa enzima reconhece sítios de clivagem na

Figura 9 - (A) Padrão de digestão de DNA em gel de agarose 1,0%. Amostras: (a, b, h) DNA de *T. cruzi* digerido com *SaII*; (c) DNA de *T. cruzi* digerido com *Bam*HI e *Eco*RI; DNA dos clones (d) BGE2, (e) BGE7, (f) BGE9 e (g) BGE14 digerido com *Bam*HI e *Eco*RI. (B) Southern blot hibridizado com as sondas (a) B12, (h) B13 e (b-g) E2B4 (ver Figura 8). Marcadores de peso molecular, em quilobases, são indicados.

seqüência GTPyPuAC e, portanto, é capaz de clivar o mesmo sítio de restrição de *Sall* (GTCGAC). Como *HincII* gera extremidades cegas, o fragmento pôde ser ligado aos adaptadores diretamente. A construção foi feita com três diferentes adaptadores para garantir a obtenção de um clone com o passo de leitura correto. O DNA do inserto foi ligado ao vetor pGEX3X e, após a transformação na hospedeira DH5 α e seleção por imunoenensaio de colônias (vide item 2.16.2.2), foram obtidos vários clones positivos.

3.14.2. Expressão da proteína de fusão GST-S3S4

As células bacterianas foram cultivadas e induzidas como descrito no item 2.16.3.3.1. Experimentos de cinética demonstraram que o pico de produção ocorre 3,5 horas após a indução. Conforme pode ser visto na Figura 10, as bactérias induzidas (canal b) produziram uma proteína de cerca de 90 kDa, ausente nas bactérias controle não induzidas (canal a). Um ensaio de Western blot demonstrou que a proteína de fusão é reconhecida pelo soro anti-tct, assim como pelo soro anti- β -gal-B12, provando que ela compartilha os mesmo epítomos de B12 (dados não mostrados). Esse ensaio também demonstrou que a proteína GST-S3S4 apresenta-se muito pouco degradada. O peso molecular de 90 kDa é compatível com o tamanho esperado da proteína de fusão.

3.14.3. Purificação da proteína GST-S3S4

Uma vez padronizadas as condições de expressão máxima de GST-S3S4, partiu-se para a purificação por cromatografia de afinidade. Obteve-se um lisado das bactérias conforme descrito no item 2.16.2.4. Como pode ser visto na Figura 10, a proteína GST-S3S4 está presente no lisado total (canal c), entretanto cerca de 50% está na fração solúvel (canal d) e 50% na fração insolúvel do lisado (canal e). Quando esse sedimento foi tratado com uréia (vide item 2.16.2.5) foi possível ressolubilizar a proteína. Entretanto, após diálises contra soluções de concentração decrescente de uréia, a proteína reprecipitou. Além disso, quando o lisado contendo a fração solúvel de GST-S3S4 foi congelado e depois degelado para utilização, ocorreu precipitação de uma fração significativa da proteína GST-S3S4. Esse fenômeno não ocorreu com a GST não recombinante, sugerindo que esse comportamento seja devido ao componente S3S4.

3.14.3.1. Cromatografia de afinidade em resina GSH-agarose

Os lisados contendo as proteínas na forma solúvel foram submetidos a uma cromatografia em glutathiona-agarose em lote, conforme descrito no item 2.16.3.4.1.1. Para avaliar a porcentagem de proteína ligada à resina, foram feitas dosagens enzimáticas da

atividade enzimática de GST do lisado antes e após a cromatografia (ver item 2.16.3.4.1.2). Tanto a GST-S3S4 como a GST não recombinante demonstraram atividade enzimática frente ao substrato CDNB, embora a última fosse nitidamente mais ativa. Essa abordagem prática permitiu monitorar facilmente o nível de purificação, bem como o rendimento obtido.

No caso da GST, obtiveram-se até 2,5 mg de proteína pura a partir de um lisado derivado de 100 mL de cultura, sugerindo uma produção de cerca de 25 mg de proteína por litro de cultura. Houve pouca ligação inespecífica de outras proteínas bacterianas à resina (dados não mostrados). No caso da proteína GST-S3S4, o rendimento máximo de ligação obtido foi de 1,25 mg por mL de resina, o que está muito abaixo da capacidade teórica de ligação (8 mg/mL). No lisado total ainda restou cerca de 50% da proteína recombinante. Quando o lisado foi recromatografado houve recuperação adicional de GST-S3S4, porém com a contaminação de outras proteínas bacterianas. Concluiu-se que a afinidade da proteína recombinante pela GSH é muito inferior à GST original. A proteína GST-S3S4 pura, assim como observado no lisado total, precipitou após um ciclo de congelamento e degelamento. Para estocar a proteína sem ocorrer precipitação, adicionou-se 50% de glicerol à amostra, e guardou-se a -20°C.

3.14.3.2. Purificação da proteína GST-S3S4 por precipitação seletiva

A proteína GST-S3S4 é produzida em grandes quantidades na bactéria DH5 α , mas a sua baixa solubilidade dificulta seu uso em aplicações como o radioimunoensaio destinado ao sorodiagnóstico. Decidiu-se portanto testar nos lisados bacterianos diferentes condições experimentais para verificar se ocorria aumento da solubilidade da proteína. Os resultados descrito abaixo foram obtidos por Cyntria Pereira, estagiária e bolsista de iniciação científica da FAPESP. Foram adicionados dois detergentes (SDS e Triton[®] X-100) e um agente redutor (DTT) aos lisados bacterianos, conforme descrito no item 2.16.3.4.2.1. Se houvesse um aumento da solubilidade, seria esperada uma diminuição da proporção de proteína de fusão nos corpúsculos de inclusão. Os resultados obtidos foram, de certa forma, surpreendentes. Os sobrenadantes dos lisados tratados com SDS com SDS/DTT foram depletados da proteína de fusão. Paralelamente, os sedimentos dos lisados tratados com os mesmos agentes removeram grande quantidade da proteína de fusão. Lisados tratados com Triton[®] X-100 e DTT não apresentaram alterações (dados não mostrados). Concluiu-se, portanto, que o SDS, na concentração de 0,03% ocasionava a precipitação quase total das proteínas de fusão a partir da fração solúvel do lisado bacteriano.

Decidiu-se utilizar essa característica como estratégia de purificação da proteína. O lisado bacteriano foi previamente centrifugado e somente ao sobrenadante foi adicionado 0,03% SDS. A seguir esta fração foi novamente centrifugada e os respectivos sedimento e

sobrenadante analisados. Na Figura 10 (canal f) observa-se depleção da proteína GST-S3S4 no sobrenadante e um sedimento contendo a proteína de fusão praticamente pura (canal g). A identidade da proteína purificada pelo método descrito acima foi confirmada por meio de um ensaio de Western blot com o soro de coelho anti-tct, que reconhecidamente apresenta reatividade com os epítomos homólogos a B12, mas não àqueles da GST (dados não mostrados).

Para a posterior ressolubilização da proteína foram testados tampões com diferentes pHs, como descrito no item 2.16.3.4.2.2. Sedimentos da proteína insolúvel (correspondentes ao canal g da Figura 10) foram ressuspensos nos diferentes tampões e incubados a 37°C. A melhor ressolubilização, comprovada em géis de poliacrilamida (dados não mostrados), foi obtida com o tampão dietilamina pH 11,5. Resolveu-se então utilizar o tampão trietilamina (pH 11,5), que apresenta um ponto de ebulição menor do que o da dietilamina e pode ser removido mais facilmente. A lavagem do sedimento protéico por 3 vezes com tampão trietilamina pH 11,5, resultou em solubilização de cerca de 70% da massa total da proteína. Quando a proteína ressolubilizada foi dialisada contra um tampão de pH neutro, ocorreu nova precipitação. Decidiu-se então manter a proteína sempre em pH alcalino. Para a estocagem, foi verificado que soluções da proteína contendo 50% de glicerol e armazenadas a -20°C mantiveram a solubilidade. Entretanto, soluções da proteína estocadas por alguns meses apresentaram elevado índice de degradação, conforme observado por SDS-PAGE.

3.15. Avaliação do antígeno GST-S3S4 no diagnóstico sorológico da doença de Chagas

A proteína B12 apresentou um desempenho muito inferior ao antígeno B13 no diagnóstico sorológico da doença de Chagas (ver item 3.11.2). Em vista disso, decidiu-se avaliar o desempenho da proteína GST-S3S4, que apresenta uma quantidade muito maior de epítomos de B12 em relação àqueles presentes na proteína B12 (ver Figura 8). Utilizou-se a proteína purificada por precipitação seletiva (ver item 3.14.3.2). A solução da proteína em trietilamina foi diluída em PBS até atingir a concentração adequada para adsorção nos poços das microplacas (geralmente uma diluição superior a 1:100). Assim como já havia sido feito com os antígenos B12 e B13, procedeu-se a uma curva de calibração variando-se a massa de GST-S3S4 entre 50 a 200 ng e a diluição dos soros entre 1:50 e 1:200.

Utilizando alguns soros chagásicos e normais foi observada uma alta reatividade com a proteína. Entretanto, o ruído de fundo verificado com soros normais também foi bastante elevado. Ensaio realizado com uma GST não recombinante, purificada por cromatografia de afinidade, demonstraram que essa alta reatividade não era devida ao reconhecimento dessa proteína pelos soros normais. A utilização de uma GST-S3S4

Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% com SDS da bactéria DH5 α contendo o clone pGEX3X-S3S4. Amostras: (a) bactérias não induzidas; (b) bactérias induzidas; (c) lisado total de bactérias induzidas; (d) precipitado (fração insolúvel) do lisado bacteriano; (e) sobrenadante (fração solúvel) do lisado; (f) sobrenadante do sobrenadante tratado com 0.03% SDS; (g) precipitado do sobrenadante tratado com 0.03% SDS. Marcadores de peso molecular em quilodaltons.

purificada por cromatografia de afinidade (item 3.14.3.1) também resultou em uma alta resposta inespecífica dos soros, indicando que esta era independente da forma de purificação da proteína. Decidiu-se então diluir os soros a serem testados em uma solução de lisado bacteriano (0,9 mg/mL) e repetir os ensaios. Foi verificada uma grande queda na resposta inespecífica, sem alteração da reatividade específica ao antígeno B12. Ensaios preliminares, realizados com 20 soros de pacientes chagásicos, demonstraram que a proteína GST-S3S4 apresenta menor atividade discriminatória do que a β -gal-B12. De fato, dos 20 soros com sorologia chagásica positiva, 16 foram considerados positivos com a proteína β -gal-B12 e somente 10 com a GST-S3S4.

O conjunto de resultados desses ensaios preliminares, aliado à baixa solubilidade e estabilidade da proteína, parece indicar que a proteína GST-S3S4 não oferece nenhuma vantagem, em relação à β -gal-B12, quanto à utilização para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas.

3.16. Utilização do soro anti-GST-S3S4 em Western blot de lisados de *T. cruzi*

Como foi relatado no item 3.9.1, a imunização com a proteína β -gal-B12 resultou em soros com baixa reatividade ao antígeno em lisados de *T. cruzi* (ver item 3.9.1). Decidiu-se então imunizar coelhos (ver itens 2.7.2.2 e 2.7.2.3), em duplicata, com a proteína GST-S3S4 e, como controle, com a GST não recombinante. Os soros obtidos foram testados em Western blot com lisados de formas epimastigotas e tripomastigotas. Os soros anti-GST-S3S4 reconheceram um antígeno de peso molecular superior a 200 kDa (dados não mostrados), como já havia sido observado com soros anti- β -gal-B12 (ver Figuras 6A e 6C, tira c). Esses soros reagiram fracamente com o Western blot de lisados de *T. cruzi* mas reconheceram intensamente a proteína β -gal-B12 (dados não mostrados). Esse fato parece indicar que os soros anti-GST-S3S4 apresentam um bom título de anticorpos e a fraca reatividade observada diante dos lisados de *T. cruzi* pode ser devida à instabilidade e/ou baixa concentração do antígeno na célula do parasita.

Um dado interessante é que os soros anti-GST reconheceram especificamente antígenos de 52 a 59 kDa em epimastigotas e tripomastigotas (dados não mostrados). Esses soros reconheceram os mesmos antígenos em Western blots contendo proteínas de *T. cruzi* purificadas por afinidade em resina de GSH-agarose (dados não mostrados). Esses resultados, no seu conjunto, sugerem que as GSTs de *T. cruzi* e *S. japonicum* devem apresentar homologia e compartilhar alguns epítopos.

3.17. Seqüenciamento dos genes B12 e B13

O seqüenciamento de DNA foi realizado com a participação de Cynthia Pereira, estagiária e bolsista em nível de iniciação científica pela FAPESP.

3.17.1 Subclonagem de fragmentos dos clones genômicos

Visando seqüenciar o gene B12 e a região intergênica entre B12 e B13, subclonaram-se os fragmentos H4S3, S3S4, S4S5, S5B4, E2E3 e B4H5 (consultar mapa de restrição da Figura 8) no vetor pBluescript®. Para isso, o DNA do clone BGE7 foi digerido com *HindIII* e *Sall* e submetido à eletroforese em gel de LMP agarose. As bandas de H4S3, S3S4 e S4S5 foram purificadas conforme descrito no item 2.15.3 e o DNA foi ligado ao vetor pBluescript®. Os fragmentos S5B4, E2E3 e B4H5 foram obtidos, pelo mesmo método, a partir do clone BGE14 digerido, respectivamente, com *Sall/BamHI*, *EcoRI* e *BamHI/HindIII*.

3.17.2. Determinação do número e posição das repetições seriadas

Os fragmentos H4S3, S3S4, S4S5 e S5B4 (consultar Figura 8) apresentam, em géis de agarose, 0,85, 1,85, 0,65 e 4,05 kb, respectivamente. O gene B12 apresenta na sua seqüência uma quantidade indeterminada de repetições seriadas de 60 pares de bases (ver Figuras 1 e 8). Essas repetições estão presentes nesses fragmentos, conforme foi confirmado previamente por hibridização. Com a finalidade de seqüenciar o gene B12, decidiu-se inicialmente determinar o posicionamento relativo das regiões com repetições, bem como estimar seu provável número. A partir dos dados de seqüência obtidos originalmente no inserto do clone B12, foi verificado que há um sítio de *SacII* (CCGCGG - consultar Figura 1) em cada repetição. Como o vetor pBluescript® somente apresenta um sítio de *SacII* no "polylinker", decidiu-se realizar digestões simples e múltiplas com *SacII* e enzimas do "polylinker". Isso permitiria determinar as distâncias entre as extremidades do inserto e as repetições seriadas, bem como a possível existência de regiões internas não repetitivas, mas flanqueadas por repetições. As amostras de DNA digeridas foram separadas paralelamente em géis de acrilamida 6% e agarose 0,8%, com a finalidade obter-se um bom nível de resolução em diferentes faixas de tamanho (dados não mostrados). Além disso, foram feitos Southern blots desses géis e posterior hibridização com uma sonda B12 (composta somente de repetições seriadas), objetivando identificar as bandas que contém as repetições (dados não mostrados). Conhecendo-se o tamanho dos insertos e das regiões não repetitivas, foi possível calcular por, subtração, o tamanho da região repetitiva e, conseqüentemente, o número aproximado de repetições seriadas. Esse dado é muito importante, pois a existência de repetições seriadas impede a localização exata do ponto de leitura em um dado subclone deletado por digestão unidirecional com Exonuclease III (ver a seguir).

Conforme pode ser visto na Figura 11 o fragmento H4S3 (de 0,85 kb) apresenta uma região 5' terminal de cerca de 500 pb, seguida de 3 repetições seriadas e uma região 3' terminal de cerca de 150 pb. O fragmento S3S4 (de 1,85 kb) apresenta uma região 5' terminal de cerca de 380 pb, aproximadamente 22 repetições seriadas e uma região 3' terminal de 150 pb. No caso do fragmento S3S4 foi observado que nem todas as repetições seriadas apresentam o sítio de *SacII*, indicando que há um certo grau de heterogeneidade entre elas. Em digestões de *SacII* foi verificada a presença de fragmentos multímeros, contendo 120 e 180 pb (dados não mostrados). O fragmento S4S5 possui a mesma estrutura de S3S4, com exceção de somente possuir 2 repetições seriadas. S5B4 contém a mesma região 5' terminal de 380 pb encontrada em S3S4 e S4S5 e um total de 40 repetições. A região 3' do clone S5B4 apresenta um tamanho de 1,3 kb e contém sítios internos de *HincII* e *EcoRI* (sítio E2 do mapa da Figura 8). A estrutura dos fragmentos H4S3, S3S4, S4S5 e S5B4 parece, portanto, ser muito semelhante e variar quanto ao número de repetições seriadas. De fato, como será mostrado no seqüenciamento (Figura 12), os fragmentos compartilham regiões em comum.

3.17.3. Seqüenciamento do gene B12

A seqüência do gene B12 foi deduzida a partir dos fragmentos H4S3, S3S4, S4S5 e S5B4 (consulte Figuras 8 e 11). Visando a digestão unidirecional com Exonuclease III (item 2.25.1), o DNA dos respectivos clones foi digerido com as enzimas *XhoI* e *KpnI*, ou com *BamHI* e *SacI* para a orientação oposta. Após deleção, o DNA foi utilizado para transformar células competentes da cepa JM109 (ver item 2.15.5). As colônias foram então cultivadas e obtiveram-se preparações rápidas de DNA ("speed-preps" - ver item 2.14.2). As amostras obtidas tiveram a seqüência de somente uma base determinada (T ou A, conforme a orientação), como descrito no item 2.25.3.2. Subclones contendo sobreposições de seqüência foram selecionados e utilizados para a obtenção de DNA por midipreparações (item 2.14.3) ou em larga escala por gradiente de cloreto de cério (2.14.4). Finalmente, procedeu-se ao seqüenciamento completo nas quatro bases (ver itens 2.25.3.2) e com uma etapa adicional, utilizando a enzima TdT (item 2.25.3.3). A corrida eletroforética foi feita em um gel com gradiente de espessura (item 2.25.4.2).

No caso do clone S5B4 foram rastreados cerca de 70 subclones deletados em cada orientação, mas somente 4 deles continham regiões de interesse para o seqüenciamento. Os demais clones estavam deletados além do inserto, apresentando seqüências próprias do vetor. As reações de digestão unidirecional foram repetidas, mas obteve-se o mesmo resultado. Possivelmente o DNA original do clone S5B4 apresentava muitas quebras ("nicks"), o que por sua vez permitia a hidrólise por parte das enzimas Exonuclease III e nuclease S1, em diferentes pontos. Em função do problema acima e, a

Figura 11 - Mapas de restrição dos fragmentos H4S3, S3S4, S4S5 e S5B4 do gene B12 (consultar Figura 8). As regiões que contém as repetições seriadas estão delimitadas pelos quadros brancos. Os quadros negros nas extremidades do clone S5B4 referem-se ao sítio de policlonagem do vetor pBluescript[®]. Os fragmentos S5Sc, S5E2, ScB4Sc e HcB4, citados no texto e derivados do clone S5B4, estão apresentados. Enzimas: B = *Bam*HI; Bs = *Bsp*1286I; E = *Eco*RI; H = *Hind*III; Hc = *Hinc*II; S = *Sal*I; Sc = *Sac*II.

partir dos dados do mapa de restrição do fragmento S5B4 (Figura 11), decidiu-se fazer construções derivadas desse clone. O DNA foi digerido com *Sall/EcoRI*, *SacII* e *HincII* e os respectivos fragmentos liberados, S5E2 e ScB4Sc (consulte Figura 11), foram purificados e subclonados no vetor pBluescript[®]. O DNA do clone S5B4 digerido com *HincII*, livre do fragmento S5Hc, foi religado de forma a gerar o subclone HcB4. Abordagem similar, utilizando digestão com *SacII*, foi empregada para obter o clone S5Sc. A partir desses clones foi possível determinar a sequência nucleotídica do fragmento S5E2, sem a necessidade de se promover deleções seriadas pelo método de Henikoff (1987). A sobreposição dos dados permitiu elucidar a sequência, nas duas fitas, da região 3' terminal do clone S5E2. A região 5' terminal do clone S5E2 foi determinada, nas duas fitas, a partir do sequenciamento do subclone S5Sc nas duas orientações. Além disso, também foram utilizados na conclusão da sequência os 4 subclones deletados de S5B4, mencionados anteriormente. O DNA do clone HcB4 (ver , Figura 11) foi digerido com as enzimas *XhoI/KpnI* e *BamHI/SacI* e, posteriormente, submetido à digestão unidirecional com Exonuclease III. Subclones deletados foram obtidos como descrito acima e sequenciados. A sobreposição dos dados permitiu elucidar a sequência completa do fragmento, concluindo assim a região 3' do fragmento original S5B4.

Página seguinte:

Figura 12 - Sequência nucleotídica da região compreendida entre os sítios H4 e B4 (consultar Figura 8), que inclui o gene B12 e parte da região intergênica. Os sítios de restrição H4, S3, S4, S5, E2 e B4 estão indicados em **negrito**, assim como os supostos códons de iniciação (ATG - posição 372) e terminação (TGA - posição 6.714) do gene B12. Três códons de terminação (TGA - posição 252, TAA - posição 282 e TAG - posição 288) na região "upstream" do códon de iniciação também estão assinalados em **negrito** (ver texto). As flechas indicam prováveis sítios de "*trans*-splicing". As regiões demarcadas por quadros cheios referem-se às repetições seriadas de 60 pb. Os quadros tracejados indicam repetições incompletas ou degeneradas. A tradução protéica da ORF do gene B12 também está apresentada. A continuação dessa sequência, a partir do sítio B4, está apresentada na Figura 14.

		Hind III (H4)																				
1	AA	GCT	TGA	AAA	AAC	AAT	AGA	AGA	TAT	AGG	AAA	CTC	ACC	GTT	GTA	CTC	GAA	CGA	TTT	CCT	59	
60	GTT	ACT	TTC	TTA	TCA	CAT	TAA	CAA	GGA	AAT	AAA	TGA	CCT	TCA	AAA	GCG	CGT	GAG	AGT	GGC	119	
120	CAA	AGA	AAG	AGA	AAA	AGT	GGC	CCG	AGA	AAA	CTT	TGA	GAA	CAC	CCT	GAA	AAA	AAT	CGG	TTA	179	
180	GCA	ACA	CTT	ACG	TAA	ATG	AAG	ATG	ATT	AAT	TAT	TCA	AAT	TAG	CTA	TTT	GTA	CTA	TTT	ACA	239	
240	AAA	ATT	ACC	TCA	TGA	AAG	TCA	AAA	ACA	TGC	CGA	ATA	TTG	ACA	TAA	TCA	TAG	ATC	AAT	AAT	299	
300	TTC	TTT	TCC	AAA	CAA	CAG	TCT	TCT	CAA	TTA	GAT	ACA	ATT	ATA	AAA	ATT	AAA	AAC	ACA	TAC	359	
360	CCA	AGG	TTA	GTA	ATG	CGA	CCT	TAT	ACA	AGC	ATC	AAC	GAT	GAA	GAT	CAA	CGC	AAT	GCT	GCA	419	
1					Met	Arg	Pro	Tyr	Thr	Ser	Ile	Asn	Asp	Glu	Asp	Gln	Arg	Asn	Ala	Ala	16	
420	TCC	AGA	AAA	AAA	CAC	GAA	ACT	AAC	ATT	ACA	TTC	AGC	AAT	ACA	GTA	AAC	CCA	AAA	AAA	ACC	479	
17	Ser	Arg	Lys	Lys	His	Glu	Thr	Asn	Ile	Thr	Phe	Ser	Asn	Thr	Val	Asn	Pro	Lys	Lys	Thr	36	
480	TCT	TCA	GAT	AAT	GAG	AAA	CCG	CCC	GCG	GAG	TCT	CCT	TTC	AAG	AGC	GTG	TTT	GGA	GCA	CCG	539	
37	Ser	Ser	Asp	Asn	Glu	Lys	Pro	Pro	Ala	Glu	Ser	Pro	Phe	Lys	Ser	Val	Phe	Gly	Ala	Pro	56	
540	TCT	TCG	ACT	GCT	GCG	AAG	CCA	CCC	GCG	GAG	TCT	CCT	TTC	AAG	AGC	GTG	TTT	GGA	GCA	CCG	599	
57	Ser	Ser	Thr	Ala	Ala	Lys	Pro	Pro	Ala	Glu	Ser	Pro	Phe	Lys	Ser	Val	Phe	Gly	Ala	Pro	74	
600	TCT	TCG	ACT	GAT	GCA	AAG	CCA	CCC	GCG	GAG	TCT	CCT	TTC	AAG	AGC	GTG	TTT	GGA	GCA	CCG	659	
77	Ser	Ser	Thr	Asp	Ala	Lys	Pro	Pro	Ala	Glu	Ser	Pro	Phe	Lys	Ser	Val	Phe	Gly	Ala	Pro	96	
660	TCT	TCG	ACT	GAT	GCA	AAG	CCA	CCC	GCG	GAG	TTA	GCT	GTG	AAG	GAG	TTG	GGA	GCG	ACC	TCC	719	
97	Ser	Ser	Thr	Asp	Ala	Lys	Pro	Pro	Ala	Glu	Leu	Ala	Val	Lys	Glu	Leu	Gly	Gly	Thr	Ser	116	
720	TGT	GGC	AAA	AAT	GGA	GTG	TGG	AAA	TGT	TCC	CGT	TGT	GGT	AAG	GCA	AAG	GAT	CTT	TCT	GGA	779	
117	Cys	Gly	Lys	Asn	Gly	Val	Trp	Lys	Cys	Ser	Arg	Cys	Gly	Lys	Ala	Lys	Asp	Leu	Ser	Gly	136	
Sal I (S3)																						
780	GAA	CAT	TTA	AAA	AAT	AAG	ACT	GAA	GTA	CGC	TCC	GAC	TGT	TGG	CCG	TGC	GCG	AGG	AAG	TCG	839	
137	Glu	His	Leu	Lys	Asn	Lys	Thr	Glu	Val	Arg	Ser	Asp	Cys	Trp	Pro	Cys	Ala	Arg	Lys	Ser	156	
840	ACA	TTC	ATA	CTG	GAA	AGG	GAA	AAA	TTG	TCG	GTA	TGT	GGA	AAA	CAG	GAT	GTG	GAT	GAA	GAT	899	
157	Thr	Phe	Ile	Leu	Glu	Arg	Glu	Lys	Leu	Ser	Val	Cys	Gly	Lys	Gln	Asp	Val	Asp	Glu	Asp	176	
900	GAT	AAC	AGA	AAG	CCC	GTG	ATC	AAT	TTA	TCT	TCA	ACG	TCA	GGG	GGT	GTG	AAA	GCC	GTA	GTG	959	
177	Asp	Asn	Arg	Lys	Pro	Val	Ile	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Val	Lys	Ala	Val	Val	196	
960	GCG	TTT	GAG	CCT	CCA	CGT	ATT	CCG	GTA	GAA	GCG	GAG	GAG	CAT	CTA	TTT	CTT	TTC	CCT	AAT	1019	
197	Ala	Phe	Glu	Pro	Pro	Arg	Ile	Pro	Val	Glu	Ala	Glu	Glu	His	Leu	Phe	Leu	Phe	Pro	Asn	1216	
1020	GTT	GGG	GAC	AAA	AAG	GAG	ACA	AAG	GAA	TCC	GAG	AGC	AGT	TCC	TCT	TAT	ATC	TGG	AGG	TGT	1079	
217	Val	Gly	Asp	Lys	Lys	Glu	Thr	Lys	Glu	Ser	Glu	Ser	Ser	Ser	Ser	Tyr	Ile	Trp	Arg	Cys	236	
1080	CGC	GTT	TGT	GAC	AAG	GTA	AAG	CCA	CTA	GCC	GGA	CAA	CAC	CTG	AGC	GGA	AAG	ACG	GAA	GTT	1139	
237	Arg	Val	Cys	Asp	Lys	Val	Lys	Pro	Leu	Ala	Gly	Gln	His	Leu	Ser	Gly	Lys	Thr	Glu	Val	256	
1140	AGA	AGC	GAC	TGT	TGG	CCA	TGT	GCA	GCA	AAG	CGT	ACC	TTC	TAC	CGA	ACG	GCA	ACT	CAA	AAC	1199	
257	Arg	Ser	Asp	Cys	Trp	Pro	Cys	Ala	Ala	Lys	Arg	Thr	Phe	Tyr	Arg	Thr	Ala	Thr	Gln	Asn	1276	
1200	ACA	TTC	ACT	GCG	AAG	CCA	CAC	GCG	GAG	TCT	CCT	CTC	AAG	AAC	GTG	TTT	GGA	GCA	CCG	TCT	1259	
277	Thr	Phe	Thr	Ala	Lys	Pro	His	Ala	Glu	Ser	Pro	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Gly	Ala	Pro	Ser	296	
1260	TCG	ACT	GCT	GCG	AAG	CCA	CCC	GCG	GAG	TCT	CCT	TTC	AGG	AGC	GTG	TTT	GGA	GCA	CCG	TCT	1319	
297	Ser	Thr	Ala	Ala	Lys	Pro	Pro	Ala	Glu	Ser	Pro	Phe	Arg	Ser	Val	Phe	Gly	Ala	Pro	Ser	316	
16 REPETIÇÕES																						
2280	GCG	AAG	CCA	CAC	GCG	GAG	TCT	CCT	TTC	AAG	AAC	GTG	TTT	GGA	GCA	CCG	TCT	TCG	ACT	GAT	2339	
637	Ala	Lys	Pro	His	Ala	Glu	Ser	Pro	Phe	Lys	Asn	Val	Phe	Gly	Ala	Pro	Ser	Ser	Thr	Asp	656	
2340	GCG	AAG	CCA	CCC	GCG	GAG	TCT	CCT	CTC	AAG	AGC	GTG	TTT	GGA	GCA	CCG	TCT	TCG	ACT	GCT	2399	
657	Ala	Lys	Pro	Pro	Ala	Glu	Ser	Pro	Leu	Lys	Ser	Val	Phe	Gly	Ala	Pro	Ser	Ser	Thr	Ala	676	
2400	GCG	AAG	CCA	CAC	GCG	GAG	TCT	CCT	TTC	AAG	AAC	GTG	TTT	GGA	GCA	CCG	TCT	TCG	ACT	GCT	2459	
677	Ala	Lys	Pro	His	Ala	Glu	Ser	Pro	Phe	Lys	Asn	Val	Phe	Gly	Ala	Pro	Ser	Ser	Thr	Ala	696	
2460	GCG	AAG	CCA	CCC	GCG	GAG	TCT	CCT	CTC	AAG	AGC	GTG	TTT	GGA	GCA	CCG	TCT	TCG	ACT	GAT	2519	
697	Ala	Lys	Pro	Pro	Ala	Glu	Ser	Pro	Leu	Lys	Ser	Val	Phe	Gly	Ala	Pro	Ser	Ser	Thr	Asp	716	

2520	GCA AAG	CCA CCC	GCG GAG	TTA GCT	GTG AAG	GAG TTG	GGA GGC	ACC TCC	TGT GGC	AAA AAT	2579
717	Ala Lys	Pro Pro	Ala Glu	Leu Ala	Val Lys	Glu Leu	Gly Gly	Thr Ser	Cys Gly	Lys Asn	736
2580	GGA GTG	TGG AAA	TGT TCC	CGT TGT	GGT AAG	GCA AAG	GAT CTT	TCT GGA	GAA CAT	TTA AAA	2639
737	Gly Val	Trp Lys	Cys Ser	Arg Cys	Gly Lys	Ala Lys	Asp Leu	Ser Gly	Glu His	Leu Lys	756
Sal I (S4)											
2640	AAT AAG	ACT GAA	GTA CGC	TCC GAC	TGT TGG	CCG TGC	GCG AGG	AAG TCG	ACA TTC	ATA CTG	2699
757	Asn Lys	Thr Glu	Val Arg	Ser Asp	Cys Trp	Pro Cys	Ala Arg	Lys Ser	Thr Phe	Ile Leu	776
2700	GAA AGG	GAA AAA	TTG TCG	GTA TGT	GGA AAA	CAG GAT	GTG GAT	GAA GAT	GAT AAC	AGA AAG	2759
777	Glu Arg	Glu Lys	Leu Ser	Val Cys	Gly Lys	Gln Asp	Val Asp	Glu Asp	Asp Asn	Arg Lys	796
2760	CCC GTG	ATC AAT	TTA TCT	TCA ACG	TCA GGG	GGT GTG	AAA GCC	GTA GTG	GCG TTT	GAG CCT	2819
797	Pro Val	Ile Asn	Leu Ser	Ser Thr	Ser Gly	Gly Val	Lys Ala	Val Val	Ala Phe	Glu Pro	816
2820	CCA CGT	ATT CCG	GTA GAA	GCG GAG	GAG CAT	CTA TTT	CTT TTC	CCT AAT	GTT GGG	GAC AAA	2879
817	Pro Arg	Ile Pro	Val Glu	Ala Glu	Glu His	Leu Phe	Leu Phe	Pro Asn	Val Gly	Asp Lys	836
2880	AAG GAG	ACA AAG	GAA TCC	GAG AGC	AGT TCC	TCT TAT	ATC TGG	AGG TGT	CGT GTT	TGT GAC	2939
837	Lys Glu	Thr Lys	Glu Ser	Glu Ser	Ser Ser	Ser Tyr	Ile Trp	Arg Cys	Arg Val	Cys Asp	856
2940	AAG GTA	AAG CCA	CTA GCC	GGA CAA	CAC CTG	AGC GGA	AAG ACG	GAA GTT	AGA AGC	GAC TGT	2999
857	Lys Val	Lys Pro	Leu Ala	Gly Gln	His Leu	Ser Gly	Lys Thr	Glu Val	Arg Ser	Asp Cys	876
3000	TGG CCA	TGT GCA	GCA AAG	CGT ACC	TTC TAC	CGA ACG	GCA ACT	CAA AAC	ACA TTC	ACT GCG	3059
877	Trp Pro	Cys Ala	Ala Lys	Arg Thr	Phe Tyr	Arg Thr	Ala Thr	Gln Asn	Thr Phe	Thr Ala	896
3060	AAG CCA	CAC GCG	GAG TCT	CCT CTC	AAG AAC	GTG TTT	GGA GCA	CCG TCT	TCG ACT	GCT GCG	3119
897	Lys Pro	His Ala	Glu Ser	Pro Leu	Lys Asn	Val Phe	Gly Ala	Pro Ser	Ser Thr	Ala Ala	916
3120	AAG CCA	CCC GCG	GAG TCT	CCT TTC	AAG AGC	GTG TTT	GGA GCA	CCG TCT	TCG ACT	GAT GCA	3179
917	Lys Pro	Pro Ala	Glu Ser	Pro Phe	Lys Ser	Val Phe	Gly Ala	Pro Ser	Ser Thr	Asp Ala	936
3180	AAG CCA	CCC GCG	GAG TTA	GCT GTG	AAG GAG	TTG GGA	GGC ACC	TCC TGT	GGC AAA	AAT GGA	3239
937	Lys Pro	Pro Ala	Glu Leu	Ala Val	Lys Glu	Leu Gly	Gly Thr	Ser Cys	Gly Lys	Asn Gly	956
3240	GTG TGG	AAA TGT	TCC CGT	TGT GGT	AAG GCA	AAG GAT	CTT TCT	GGA GAA	CAT TTA	AAA AAT	3299
957	Val Trp	Lys Cys	Ser Arg	Cys Gly	Lys Ala	Lys Asp	Leu Ser	Gly Glu	His Leu	Lys Asn	976
Sal I (S5)											
3300	AAG ACT	GAA GTA	CGC TCC	GAC TGT	TGG CCG	TGC GCG	AGG AAG	TCG ACA	TTC ATA	CTG GAA	3359
977	Lys Thr	Glu Val	Arg Ser	Asp Cys	Trp Pro	Cys Ala	Arg Lys	Ser Thr	Phe Ile	Leu Glu	996
3360	AGG GAA	AAA TTG	TCG GTA	TGT GGA	AAA CAG	GAT GTG	GAT GAA	GAT GAT	AAC AGA	AAG CCC	3419
997	Arg Glu	Lys Leu	Ser Val	Cys Gly	Lys Gln	Asp Val	Asp Glu	Asp Asp	Asn Arg	Lys Pro	1016
3420	GTG ATC	AAT TTA	TCT TCA	ACG TCA	GGG GGT	GTG AAA	GCC GTA	GTG GCG	TTT GAG	CCT CCA	3479
1017	Val Ile	Asn Leu	Ser Ser	Thr Ser	Gly Gly	Val Lys	Ala Val	Val Val	Ala Phe	Glu Pro	1036
3480	CGT ATT	CCG GTA	GAA GCG	GAG GAG	CAT CTA	TTT CTT	TTC CCT	AAT GTT	GGG GAC	AAA AAG	3539
1037	Arg Ile	Pro Val	Glu Ala	Glu Glu	His Leu	Phe Leu	Phe Pro	Asn Val	Gly Asp	Lys Lys	1056
3540	GAG ACA	AAG GAA	TCC GAG	AGC AGT	TCC TCT	TAT ATC	TGG AGG	TGT CGC	GTT TGT	GAC AAG	3599
1057	Glu Thr	Lys Glu	Ser Glu	Ser Ser	Ser Ser	Tyr Ile	Trp Arg	Cys Arg	Val Cys	Asp Lys	1076
3600	GTA AAG	CCA CTA	GCC GGA	CAA CAC	CTG AGC	GGA AAG	ACG GAA	GTT AGA	AGC GAC	TGT TGG	3659
1077	Val Lys	Pro Leu	Ala Glu	Gln His	Leu Ser	Gly Lys	Thr Glu	Val Arg	Ser Asp	Cys Trp	1096
3660	CCA TGT	GCA GCA	AAG CGT	ACC TTC	TAC CGA	ACG GCA	ACT CAA	AAC ACA	TTC ACT	GCG AAG	3719
1097	Pro Cys	Ala Ala	Lys Arg	Thr Phe	Tyr Arg	Thr Ala	Thr Gln	Asn Thr	Phe Thr	Ala Lys	1116
3720	CCA CCC	GCG GAG	TCT CCT	CTC AAG	AGC GTG	TTT GGA	GCA CCG	TCT TCG	ACT GCT	GCG AAG	3779
1117	Pro Pro	Ala Glu	Ser Pro	Leu Lys	Ser Val	Phe Gly	Ala Pro	Ser Ser	Thr Ala	Ala Lys	1136
3780	CCA CCA	GCG GAG	TCT CCT	TTC AAG	AAC GTG	TTT GGA	GCA CCG	TCT TCG	ACT GCT	GCG AAG	3839
1137	Pro Pro	Ala Glu	Ser Pro	Phe Lys	Asn Val	Phe Gly	Ala Pro	Ser Ser	Thr Ala	Ala Lys	1156
3840	CCA CCC	GCG GAG	TCT CCT	TTC AAG	AGC GTG	TTT GGA	GCA CCG	TCT TCG	ACT GAT	GCA AAG	3899
1157	Pro Pro	Ala Glu	Ser Pro	Phe Lys	Ser Val	Phe Gly	Ala Pro	Ser Ser	Thr Asp	Ala Lys	1176
3900	CCA CCC	GCG GAG	TCT CCT	TTC AAG	AAC GTG	TTT GGA	GCA CCG	TCT TCG	ACT GCT	GCG AAG	3959
1177	Pro Pro	Ala Glu	Ser Pro	Phe Lys	Asn Val	Phe Gly	Ala Pro	Ser Ser	Thr Ala	Ala Lys	1196
31 REPETIÇÕES											
5820	CCA CCC	GCG GAG	TCT CCT	TTC AAG	AAC GTG	TTT GGA	GCA CCG	TCT TCG	ACT GCT	GCG AAG	5879
1817	Pro Pro	Ala Glu	Ser Pro	Phe Lys	Asn Val	Phe Gly	Ala Pro	Ser Ser	Thr Ala	Ala Lys	1836

5880	CCA CCC GCG GAG TCT CCT CTC AAG AGC GTG TTT GGA GCA CCG TCT TCG ACT GCT GCG AAG	5939
1837	Pro Pro Ala Glu Ser Pro Leu Lys Ser Val Phe Gly Ala Pro Ser Ser Thr Ala Ala Lys	1856
5940	CCA CCC GCG GAG TCT CCT TTC AAG AAA GTG TTT GGA GCA CCG TCT TCG ACT GAT GCA AAG	5999
1857	Pro Pro Ala Glu Ser Pro Phe Lys Lys Val Phe Gly Ala Pro Ser Ser Thr Asp Ala Lys	1876
6000	CCA CAC GCG GAG TCT CCT CTC AAG AGC GTG TTT GGA GCA CCG TCT TCG ACT GCT GCG AAG	6059
1877	Pro His Ala Glu Ser Pro Leu Lys Ser Val Phe Gly Ala Pro Ser Ser Thr Ala Ala Lys	1896
6060	CCA CCC GCG GAG TCT CCT TTC AAG AAC GTC TTT GGA GCA CCG TCT TCG AAT GCT GCG AGG	6119
1897	Pro Pro Ala Glu Ser Pro Phe Lys Asn Val Phe Gly Ala Pro Ser Ser Asn Ala Ala Arg	1916
6120	GTC TCG GAA GAT TCT TCA TTA AGT GTT GTT TCT CAC TTG ATG CCA TTT GGT GTC GGT GAT	6179
1917	Val Ser Glu Asp Ser Ser Leu Ser Val Val Ser His Leu Met Pro Phe Gly Val Gly Asp	1936
6180	GGC GGG GCT GTC GCT TTG ATT CCT TCA GAG GGT TCA TTT GCA GGG CGC TCT GAA GTT AGT	6239
1937	Gly Gly Ala Val Ala Leu Ile Pro Ser Glu Gly Ser Phe Ala Gly Arg Ser Glu Val Ser	1956
6240	TCG GAT GCA AGT GCT TTT GTT GAC CCT ATG ATT CCT TCT GAC GAC GAT GTT AAT GGG TGT	6299
1957	Ser Asp Ala Ser Ala Phe Val Asp Pro Met Ile Pro Ser Asp Asp Val Asn Gly Cys	1976
EcoRI (E2)		
6300	AAT AGT TTG GTT TAT AAA GAA GCT ATG GGA GAA ATG AAT TCC GGT TTT ATG TTT CCT CTT	6359
1977	Asn Ser Leu Val Tyr Lys Glu Ala Met Gly Glu Met Asn Ser Gly Phe Met Phe Pro Leu	1996
6360	ATT TCT CCG CGC GAT GAT GAT AAG CAA AAT GTG ATA AAG CGT TTG AAG GAG GGT GTT GAG	6419
1997	Ile Ser Pro Arg Asp Asp Asp Lys Gln Asn Val Ile Lys Arg Leu Lys Glu Gly Val Glu	2016
6420	AAA ATA TCT TTT GAT GGA GTG AGA AAT GAG CCT TTA GTT GTG GGC GAT GCC TGC GTT ACG	6479
2017	Lys Ile Ser Phe Asp Gly Val Arg Asn Glu Pro Leu Val Val Gly Asp Ala Cys Val Thr	2036
6480	TTG AAA AAT TTT GAA CAA ATG TTG GTG GCG TTT CGA AGC GAC CTT GTT GGT GTC ATT AGA	6539
2037	Leu Lys Asn Phe Glu Gln Met Leu Val Ala Phe Arg Ser Asp Leu Val Gly Val Ile Arg	2056
6540	AGT GAG ATT GAG GGA ATT TTT TTT GCT CCT CAA AAT ACA GAG GGA GAC AAT CAC GCT GCA	6599
2057	Ser Glu Ile Glu Gly Ile Phe Phe Ala Pro Gln Asn Thr Glu Gly Asp Asn His Ala Ala	2076
6600	TTG CCA AAA ACC ACT AGA GAT GAA ATG ACT TCT TCA GGT AAA AAG GGA AGT GAG GTT GTG	6659
2077	Leu Pro Lys Thr Thr Arg Asp Glu Met Thr Ser Ser Gly Lys Lys Gly Ser Glu Val Val	2096
6660	GGG TTC TCT CAA GCG TTG AGG GCG CAT CTT TCT AAT GCG TTT CGC AAG TAT TAT TGA CCT	6719
2097	Gly Phe Ser Gln Ala Leu Arg Ala His Leu Ser Asn Ala Phe Arg Lys Tyr Tyr	2114
6720	TTG GGT TGT GAG GTT GAT AAC TGG ATA TGG TGG GCA AAC GCC CGC CAC CCT TTC CCT ATA	6779
6780	TAT ATT TAA TAT ATG TTT CAT GGG AGA GTT TAA AGA TGA TTT TTT GTT TGT TTG TTT TCC	6839
6840	TAG GAT GTG TGA GAG GAA CGA GAG TGT CTG TAT GGC ATT GAA TTG CAT TTT ATT TTT AAT	6899
6900	GAT AAT TTT GTT ATT TTT TTC ACT TTT TCG TGC GCT AGT TTT AGA TAT GCA ATA GTG AAA	6959
6960	CAA AAA CGT ATC TTT ATT AAT AAA TAT ATA TAT ATA TGG ATT TAG TTT TGT GCT TGG AGC	7019
7020	CTG AGT GGG ATT AAA TTA TTG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGC AGA TTT GGT GCA	7079
7080	TTG ACG GTG AGG GGA GGC ACA AGC GAT TAC GTC TTT ACG TTT TCT TCA ATT ATA TTA CTG	7139
7140	GTG GGC GCG TTG CAA GGC TTT TTG GGT TTT TTT CAT TTT TTT CCT GCG TGT CTT TGT GCG	7199
7200	ACA CGT TTA TAT CAG CTT TCT GCC CCC CGC TGG AGG GAA TTT GTG GCA TGC TCG TTT ATA	7259
7260	GGC GAA TTG GAA ATG TTT ATG GTG GGG GCA TTG ACA GAC ATA GCA TAT TGC CAG CTC TCA	7319
7320	AGC TGG GTC CGC GGT GCT GAC ATG GAG ATG TTT TTA CTG GGC AGC TCG TTG CTT CTT AGC	7379
BamBI (B4)		
7380	TGG TCC GGG GAT CC	7393

Na Figura 12 está apresentada a sequência nucleotídica (cerca de 7,4 kb) da região genômica que contém o gene B12. O passo de leitura e orientação da tradução foram deduzidos a partir das ORFs possíveis e da sequência das repetições do clone B12 (Figura 1), originalmente isolado no vetor de expressão λ gt11. As regiões das repetições seriadas, homólogas a B12, não foram inteiramente seqüenciadas. Somente a sequência das primeiras repetições de cada extremidade foi determinada, sendo que o número total de repetições foi previamente estabelecido pelo mapa de restrição (ver item 3.17.2 e Figura 11). É possível verificar na Figura 12 que os fragmentos S3S4, S4S5 e S5B4 compartilham uma região 5' terminal comum. Além disso, os fragmentos H4S3, S3S4 e S4S5 apresentam a mesma região 3' terminal. Embora a orientação mútua dos fragmentos apresentada na Figura 12 respeite o passo de leitura das repetições homólogas a B12, não havia dados experimentais que a comprovassem. Como os fragmentos H4S3, S3S4, S4S5 e S5B4 foram obtidos por digestões seguidas de subclonagens, é possível que existisse um pequeno fragmento delimitado por sítios de *Sall*, intercalado entre esses fragmentos e não visível em um gel de agarose. Para provar que as seqüências 3' de um fragmento e 5' do seguinte estão de fato localizadas contiguamente, e na orientação prevista pela provável codificação protéica, realizou-se mais uma etapa de subclonagem e seqüenciamento.

Cada repetição seriada de 60 pb apresenta um sítio de *SacII*, ao passo que as seqüências terminais 3' e 5' não possuem nenhum sítio para essa enzima. A clivagem com *SacII* de um clone maior, que contém os fragmentos H4S3, S3S4, S4S5 e S5E2 (ver Figura 8), liberaria então fragmentos de cerca de 0,6 kb, que teriam as seqüências 5' e 3' terminais unidas. Daqui em diante esses fragmentos serão denominados genericamente de ScSc-0,6. Escolheu-se o clone H4E2, derivado de BGE7 (ver Figura 8), para esse experimento. Embora esse clone apresente uma deleção artefactual na região entre os sítios S5 e E2, os demais fragmentos estão integralmente conservados. O DNA do clone foi digerido com *SacII* e submetido a uma eletroforese em LMP agarose. O fragmento ScSc-0,6 foi purificado a partir do gel, subclonado em pBluescript® e seqüenciado nas duas fitas. Os resultados (não mostrados) comprovaram que a orientação prevista estava correta e que não há nenhuma seqüência interposta entre as regiões 5' e 3' terminais. A região compreendida entre os blocos de repetições de 60 pb se repete, por sua vez, três vezes ao longo do gene B12 (Figura 12) e o fragmento ScSc-0,6 representa somente um dos eventos. Contudo, não parece provável que os outros dois eventos sejam diferentes. Para corroborar essa idéia cita-se o experimento da digestão de H4E2 com *SacII*, no qual não se observaram bandas de tamanhos diferentes daqueles previstos (dados não mostrados).

Analisando a seqüência do gene B12, apresentada na Figura 12, foi possível identificar um possível códon de iniciação ATG na posição 372 e um códon de terminação TGA na posição 6714. Na região "upstream" do códon de iniciação, e no mesmo passo de leitura, estão assinalados três códons de terminação nas posições 252, 282 e 288. A

Figura 13 - Esquema da estrutura da proteína B12, deduzido a partir do seqüenciamento de DNA dos fragmentos H4S3, S3S4, S4S5 e S5E2 do gene B12. Os quadros brancos representam as regiões que contém as repetições seriadas de 20 aminoácidos e seu respectivo número de unidades repetitivas. Também estão indicados os domínios amino- e carboxi-terminais e as repetições de 173 aminoácidos. O esquema não está apresentado em escala.

dedução da sequência protéica codificada pelo gene B12 mostra que a proteína é composta por 4 quatro domínios diferentes. Na Figura 13 pode-se ver que, além dos domínios amino e carboxi terminais de 36 e 198 aminoácidos, respectivamente, a proteína apresenta 3 repetições de 173 aminoácidos, intercaladas por 4 blocos contendo um número variável de repetições seriadas de 20 aminoácidos. Maiores detalhes das características dessa sequência serão considerados no item 4.7.1 da Discussão.

3.17.4. Análise computacional da sequência de B12

As sequências protéicas dos 4 domínios da proteína B12 foram enviadas para uma busca de homologia no GenBank, utilizando o programa BLAST do servidor do NCBI, conforme descrito nos itens 2.26.2.1 e 2.26.2.2. A análise individualizada de cada um dos domínios foi feita com o objetivo de se evitar que regiões de repetições seriadas, muito mais abundantes, pudessem influenciar tendenciosamente (introduzindo "bias") na busca de homologia. A proteína B12 é muito longa (2.114 aminoácidos) e é composta de domínios repetitivos que por sua vez também são constituídos de repetições (ver Figura 13), o que dificulta a análise computacional da sequência. Para levar em consideração as regiões limítrofes entre os diferentes domínios e facilitar a análise da proteína B12, construiu-se uma quinta sequência que será chamada de "B12 curta". Essa sequência apresenta respectivamente um domínio amino-terminal, um domínio com 4 repetições de 20 aa, uma repetição de 173 aa, um segundo domínio com 4 repetições de 20 aa e, finalmente, o domínio carboxi-terminal de 198 aa. Essa sequência apresenta a conveniência de ser curta e, por outro lado, contém toda a informação presente na proteína B12 completa. Como será visto adiante, a sequência de B12 "curta" também foi utilizada para a análise da estrutura secundária.

A busca de homologia não revelou nenhuma proteína com homologia significativa a B12. O que se obteve foram pequenos blocos de alinhamento com várias proteínas, principalmente de citoesqueleto. O domínio amino-terminal apresentou um bloco de homologia com quinesina. A repetição de 173 aa apresentou pequenos blocos de homologia com proteínas ligantes de DNA e com a subunidade pesada da proteína triplet de neurofilamento (NF-H). A região de repetições seriadas demonstrou blocos de homologia com proteínas ricas em prolina, incluindo a de neurofilamento e um antígeno de 85 kDa de *Babesia bovis*. Finalmente, o domínio carboxi-terminal apresentou uma pequena homologia com filamina. A proteína de neurofilamento triplet H foi a única a apresentar blocos de homologia com mais de um domínio de B12. As regiões de homologia entre neurofilamento e os domínios das repetições seriadas e da repetição de 173 aminoácidos estão apresentadas na Figura 14. Essas homologias foram observadas em proteínas de neurofilamento de diferentes espécies, incluindo o homem, rato e camundongo.

1 x

nfh EKPKMOAKAKEEDKGLPOEPSPKPKTEKAEKSSS

nfh HIKVKSEKIKVVEKSEKETVIVEEOTEETIOVTEEVTEEDKE

|x|

nfh KSPA~~E~~AKSPA~~E~~AKSPA~~E~~AKSPA~~E~~AKSPVEVKSP~~E~~KA~~K~~SPVKEGA~~K~~SLA~~E~~AKSP~~E~~KA~~K~~SPV

nfh KEEIKPPAEVKSPEKAKSPMK

nEh PAEAKSPA EAKSPA EVKSPA EVKSPA EAKSPA EAKSPA EVKSPA TVKSPA EAKSPA EAKSPA

nfh	PAEVKSPATVKSPGEAKSPAFAKSP
-----	---------------------------

Figura 14 - Alinhamento de blocos de homologia entre os domínios das repetições menores (60 pb) e da repetição maior (173 aa) do gene B12 e a proteína de neurofilamento triplet H de rato (NF-H). As seqüências foram alinhadas com o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). As substituições favorecidas evolutivamente (Dayhoff *et al.*, 1983) estão assinaladas (+).

A predição da estrutura de B12 foi feita com a sequência "B12 curta" para facilitar a visualização. Utilizou-se o programa PEPTIDESTRUCTURE do pacote de análise GCG (Devereux *et al.*, 1984). A hidrofiliçidade da proteína foi calculada segundo o algoritmo de Kyte & Doolittle (1982) e a estrutura secundária por Chou-Fasman (1978). Na Figura 15 podem ser observados os esquemas em uma (A) e duas dimensões (B) dessas predições, visualizando-se as regiões de α -hélice, folha β -pregueada e dobras, bem como os possíveis sítios de glicosilação e a hidrofiliçidade da proteína. Os respectivos domínios da proteína "B12 curta" estão assinalados na Figura 15A. A análise dos dados dessas predições será feita no item 4.7.1 da Discussão.

Página seguinte:

Figura 15 - (A) Predição da estrutura secundária da proteína "B12 curta" (ver texto) em esquema de uma dimensão. CF e KD referem-se, respectivamente, aos algoritmos de Chou-Fasman (1978) e Kyte & Doolittle (1982). Estão assinalados os respectivos domínios da proteína B12, assim como as regiões de α -hélice, folha β -pregueada, dobras e sítios de glicosilação. (B) Predição apresentada em esquema de duas dimensões. Em função de a proteína B12 apresentar vários domínios repetidos, a análise foi feita com uma hipotética proteína contendo, além dos domínios amino e carboxi terminais, apenas um domínio da repetição maior e 2 domínios com 4 repetições menores. Dados calculados e plotados pelos programas PEPTIDESTRUCUTRE e PLOTSTRUCTURE, do pacote de análise de seqüências GCG (Devereux *et al.*, 1984).

A

B

3.17.5. Seqüenciamento da região intergênica e 5' terminal do gene B13 (fragmento B4H5)

O fragmento B4H5, imediatamente contíguo à seqüência do gene B12 (ver Figura 12), é constituído pela região intergênica entre B12 e B13 e pela região 5' do gene B13 (consultar Figura 8). Para se obter subclones deletados nas duas orientações, digeriu-se o DNA com as enzimas *Bam*HI/*Bst*XI e *Hind*III/*Kpn*I, respectivamente. Em seguida as amostras foram submetidas à digestão unidirecional com Exonuclease III (vide item 2.25.1). Clones deletados nas duas orientações, contendo sobreposições, foram utilizados para o seqüenciamento do DNA. A junção física entre os fragmentos S5B4 e B4H5 foi confirmada pelo seqüenciamento do fragmento E2E3 (consultar Figura 8). A seqüência do fragmento B4H5, apresentada na Figura 14, contém em sua porção 5' terminal uma parte da região intergênica entre B12 e B13 e, na outra extremidade, o início do gene B13. Nas posições 553, 556, 610, 613 e 829 estão apresentados possíveis códons de iniciação do gene B13. Como a região compreendida entre os códons 553 e 829 apresenta uma baixa probabilidade de codificação (ver discussão no item 4.7.2), a tradução protéica está apresentada somente a partir do ATG da posição 829. A direção da transcrição da ORF é a mesma do gene B12 (ver Figura 8), abrindo a possibilidade de os dois genes compartilharem um transcrito policistrônico (ver Discussão - item 4.6).

3.17.6. Análise computacional da seqüência do fragmento B4H5

A seqüência do fragmento B4H5, que codifica a extremidade amino-terminal do gene B13 foi submetida a uma busca de homologia com o programa BLAST do NCBI. Foi verificada uma alta homologia com o clone TcCA-2 (Buschiazzo *et al.*, 1992), que é homólogo a B13. As duas seqüências foram então alinhadas com o programa BESTFIT, que permite estabelecer a região de homologia mais significativa, incluindo lacunas. Conforme pode ser visto na Figura 17, o alinhamento de B4H5 e TcCa-2, apesar de conter 7 lacunas, apresenta uma identidade superior a 95,5%.

Página seguinte:

Figura 16 - Seqüência nucleotídica da região compreendida entre os sítios B4 e H5 (consultar Figura 8), que inclui parte de região intergênica e a extremidade 5' terminal do gene B13. Os sítios de restrição B4, E3, N2 e H5 estão indicados em negrito, assim como os possíveis códons de iniciação do gene B13 (posições 553, 556, 610, 613 e 829). Um códon de terminação (TAG - posição 544) na região "upstream" do códon de iniciação está sublinhado. A tradução protéica da ORF está apresentada a partir do ATG da posição 829 (ver texto). As flechas indicam prováveis sítios de "trans-splicing".

BamBI (B4)		
1	GGA TCC AAA AGC GGA ACA AGT TTA TTC CAA TCG TGC GAC ACG TTA AAT ATT AAT TTC TGG	60
61	TCA TTG ACG TGT TTT ATG GGA TTC GGT TTT TGC CAG GGA AAA AAA AAG TGA GTT TTT	120
121	TTG ATC CCC ACC GTG GCT CAA CGA AGT GCT GTT TTT TTT TTT TCT GCT CTT ACC	180
EcoRI (E3)		
181	AGT CGT AGT AAC TAC ACC TCA ATT GTG CAG CTC TGG TAA GCG TAC GAT GGA ATT CAG CAG	240
241	CAA GGA TAA CCT TAC TCC GCG GGC AGC CAT TAT AGA ATG GCT CCA ACA TCT GCC CTT CCG	300
301	GCC CGT AAA ACT AAG TAA CAA CTA CTC ATC GGG TTT GAA GCA TGA ACA GCA GGC GCT TAG	360
361	CTT CCT CTC TAG CAA AGA GTA CTA GAC CCT GGC ACC ACG TTG AGG TGG CCG GCT GAG CCA	420
421	GGG ACG AAG TGC TGT CAT GTA AGG TCT GCT CAT CTC TGC GAG ATT TTT TTT TTT TTT	480
481	TCG TGA TCG TAG ATT CCA AAA GAA CAA TTT TTG GGA AGA AAG GCT GCA GAG GTC AGG TGT	540
541	TTC TAG GCT TCC ATG ATG CAA AAA GAA ACA AAA GAA ATA CTG CCT ATT TGT AAG TTG TAC	600
NcoI (N2)		
601	TGC CGT GTT ATG ATG CTG GTT TGC CGA TAT GCG CCA TGG GCA CAA TTG AGG CCG TTA AAT	660
661	TGT AAT GTT TGC TTG GGG TAT AAT TTC TAC CTC TTT TTC TGC CTT TTT TTT TTT TTT	720
721	TTT TTT TTT GTT TTT TTG TTT TTT GTT TTT ATT GAG CAC AGA ATT ATA TAT TTT TTA TTT	780
781	TTT GTT TTT CTG TTG TTG ATT GTT GTG GGG TCC CGT GAT TTA ATA AAT ATG GCC TTA CGT	840
1		4
841	CCC ACG AAA CTA GAT GCG GTC TGT GAA GAG GTT CAT GGT GAA TTT GCA TCG TGT GGA CTT	900
5	Pro Thr Lys Leu Asp Ala Val Cys Glu Glu Val His Gly Glu Phe Ala Ser Cys Gly Leu	24
901	GCA AGT TTA CAG GAG CTC TGC CAG CAG GTG AGG CTG CTG CCG GCA AAT GTA CAA CGC CTT	960
25	Ala Ser Leu Gln Glu Leu Cys Gln Gln Val Arg Leu Leu Arg Ala Asn Val Gln Arg Leu	44
961	GCA TCC GAA CAA ATA CCG TCG CTC AGT CTG GAC ATA ACA GCG CTT CAG GAG CCT CAC CTG	1020
45	Ala Ser Glu Gln Ile Pro Ser Leu Ser Leu Asp Ile Thr Ala Leu Gln Glu Pro His Leu	64
1021	CAC CTG CCG TTG CAT ACT AAT TTT CAT GTG GGC ATG CAG GAG AAG AAA CCG ACA CCA GGA	1080
65	His Leu Pro Leu His Thr Asn Phe His Val Gly Met Gln Glu Lys Lys Pro Thr Pro Gly	84
1081	AGT GTC ATC TTT GGT GCT GAG TCG CTC CTT TCA CAC TGC AAA AGG CTC ACT GCG GAC TGC	1140
85	Ser Val Ile Phe Gly Ala Glu Ser Leu Leu Ser His Cys Lys Arg Leu Thr Ala Asp Cys	104
1141	ACA CGT GGG TCG CAC AGG CTG CCC GAG AAG GAA GCG CCC ACA CAC ATG ATG TAC GCG GTG	1200
105	Thr Arg Gly Ser His Arg Leu Pro Glu Lys Glu Arg Pro Thr His Met Met Tyr Ala Val	124
1201	GGT TAT ACC CCT AAT TAT CCC AAC AGA AAA ATG CCT TTG TAC AAT TCA ACC AAA TAC ACT	1260
125	Gly Tyr Thr Pro Asn Tyr Pro Asn Arg Lys Met Pro Leu Tyr Asn Ser Thr Lys Tyr Thr	144
1261	GAA AGA GAA AAA ATA GAA GAA AAA AAA GAT ACA ACA CCG TAC GCT CCC AGC AAC CCG TCC	1320
145	Glu Arg Glu Lys Ile Glu Glu Lys Lys Asp Thr Thr Pro Tyr Ala Pro Ser Asn Pro Ser	164
HindIII (H5)		
1321	CAC GCC GAC GCC CAA AAA AGC TT	1343
165	His Ala Asp Ala Gln Lys Ser	171

Página seguinte:

Figura 17 - Alinhamento entre as seqüências nucleotídicas do fragmento B4H5 e do gene TcCA-2 de *T. cruzi* (Buschiazzo *et al.*, 1992; código de acesso M92049). Os pontos representam identidades entre as bases comparadas. Os hífen representam regiões de lacunas entre as seqüências alinhadas. Um suposto códon de iniciação na posição 829 do fragmento B4H5 está marcado em negrito. Alinhamento feito com o programa BESTFIT do pacote de programas GCG. Parâmetros e resultados do programa: Gap Weight 5.000; Average Match 1.000; Length Weight 0.300; Average Mismatch 0.000; Quality: 972.0; Length 3191; Ratio: 0.724; Gaps 7; Percent Similarity 95.591; Percent Identity: 95.591.

B4H5	252	TTACTCCGCGGGCAGCCATTATAGAATGGCTCCAACATCTGCCCTTCCGG	301
TcCA-2	1	C.....	50
B4H5	302	CCCGTAAAACTAAGTAACAACTACTCATCGGGTTTGAAGCATGAACAGCA	351
TcCA-2	51	T.....	99
B4H5	352	GGCGCTTAGCTTCCTCTCTAGCAAAGAGTACTAGACCCTGGCACCACGTT	401
TcCA-2	100	G.....TG.....	149
B4H5	402	GAGGTGGCCGGCTGAGCCAGGG-ACGAAGTGCTGTCATGTAAGGTCTGCT	450
TcCA-2	150	A.....A.....T.....	199
B4H5	451	CATCTCTGCG-AGATTTTTTTTTTTTTTTT-----CGTGAT	487
TcCA-2	200	C.....G.....G.....G.....TTTTTGTGTGTGT.....	249
B4H5	488	CGTAGATTCCAAAAGAACAATTTTTGGGAAGAAAGGCTGCAGAGGTCAGG	537
TcCA-2	250	G.....A.....	299
B4H5	538	TGTTTCTAGGCTTCCATGATGCAAAAAGAAACAAAAGAAATACTGCCTAT	587
TcCA-2	300	C.....C.....-.....	348
B4H5	588	TTGTAAGTTGTACTGCCGTGTTATGATGCTGGTTTGCCGATATGCGCCAT	637
TcCA-2	349	T.....	398
B4H5	638	GGGCACAATTGAGGCCGTAAATTGTAATGTTTGCTTGGGGTATAATTTTC	687
TcCA-2	399	A..-.....A..C.C.....	447
B4H5	688	TACCTCTTTTTCTGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTTTTT	737
TcCA-2	448	T.....T.....T.....G.....-.....	483
B4H5	738	GTTTTTTGTTTTTATTGAGCACAGAATTATATATTTTTTATTTTTTGTTT	787
TcCA-2	484	-----G...G.....-.....	521
B4H5	788	TTCTGTTGTTGATTGTTGTGGGTCCCGTGATTTAATAAAATATGGCCTTA	837
TcCA-2	525	G.....	574
B4H5	838	CGTCCCACGAAACTAGATGCGGTCTGTGAAGAGGTTTCAGGTGAATTTGC	887
TcCA-2	575		624
B4H5	888	ATCGTGTGGACTTGCAAGTTTACAGGAGCTCTCCAGCAGGTGAGGCTGC	937
TcCA-2	625	A.....	674
B4H5	938	TGCGCGCAAATGTACAACGCCTTGCAATCCGAACAAATACCGTCCGCTCAGT	987
TcCA-2	675	C.....	724
B4H5	988	CTGGACATAACAGCGCTTCAGGAGCCTCACCTGCACCTGCCGTTGCATAC	103
TcCA-2	725		774
B4H5	1038	TAATTTTCATGTGGGCATGCAGGAGAAGAAACCGACACCAGGAAGTGTCA	108
TcCA-2	775	T.....G.....	824
B4H5	1088	TCTTTGGTGCTGAGTCGCTCCTTTTCACACTGCAAAAGGCTCACTGCGGAC	113
TcCA-2	825	A.....	874
B4H5	1138	TGCACACGTGGGTGCGACAGGCTGCCCCGAGAAGGAACGCCCCACACACAT	118
TcCA-2	875		924
B4H5	1188	GATGTACGCGGTGGGTTATACCCCTAATTATCCCAACAGAAAAATGCCTT	123
TcCA-2	925	G.....CC.....	974
B4H5	1238	TGTACAATTCAACCAAAATACACTGAAAGAGAAAAAATAGAAGAAAAAAA	128
TcCA-2	975	A.....G.....	102
B4H5	1288	GATACAACACCGTACGCTCCAGCAACCCGTCCACGCGGACGCCCAAAA	133
TcCA-2	1025	T.....A.A.....C.....AC..A.....	107
B4H5	1338	AAGCTT	1343
TcCA-2	1075		1080

3.18. Determinação do mapa de transcrição da região de 32 kb

3.18.1. Caracterização dos transcritos reconhecidos pelos clones genômicos

Com a finalidade de determinar o mapa de transcrição da região de 32 kb, foi realizado um ensaio de Northern blot, utilizando como sondas os DNAs totais dos clones BGE 2, 7, 9 e 14. Conforme podemos ver na Figura 18 (consultar também a Figura 8), os clones BGE2 (canal a), BGE7 (canal b) e BGE14 (canal d) reconheceram os transcritos de 7,2 e 8,8 kb correspondentes a B12, bem como os transcritos de 4,2 e 3,5 kb, homólogos a B13 (comparar com os resultados da Figura 4). O clone BGE9 (canal c) reconheceu os transcritos de B12, mas não os de B13, confirmando os dados do mapa de restrição. Um aspecto interessante é que os clones BGE7 (canal b) e BGE9 (canal c) também reconheceram um transcrito adicional, de cerca de 5,5 kb. Essa banda de hibridização adicional pode ser devida à existência de um terceiro gene, contíguo a B12 e B13, e representado nos clones BGE7 e BGE9 (ver a seguir).

3.18.2. Identificação de um terceiro gene denominado B11

Visando localizar a região homóloga à banda de 5,5 kb, hibridizou-se um Northern blot com sondas feitas a partir dos fragmentos S253 e E1H1 (ver Figura 8). Nenhuma banda de hibridização foi visualizada (dados não mostrados). Concluiu-se que o único fragmento que poderia ter homologia com o RNA de 5,5 kb seria o SE1 (ver fragmento marcado com asteriscos na Figura 8), delimitado pelo sítios *Sa*II do "polylinker" do vetor λ EMBL3, e o primeiro sítio de *Eco*RI da região mapeada. Com o objetivo de verificar essa hipótese, o fragmento SE1, derivado do clone BGE7, foi subclonado em pBluescript[®]. O inserto purificado foi utilizado como sonda em um ensaio de Northern blot. Como pode ser observado na Figura 18 (canal e), a sonda SE1 hibridizou com a banda de 5,5 kb. Esse resultado confirma a existência de um terceiro cistron, vizinho de B12 e B13, e que foi denominado B11 (ver Figura 8). Além dessa banda, podem ser visualizadas bandas fracas de peso molecular maior, também reconhecidas pelas sondas dos clones BGE7 (canal b) e BGE9 (canal c), as quais contêm o próprio fragmento SE1 (ver Figura 8). Essas bandas podem representar transcritos com certo grau de homologia a B11 ou ainda espécies policistrônicas presentes em baixa concentração.

A análise da Figura 18 indica que o padrão de hibridização da banda de 5,5 kb é muito mais intenso do que o dos transcritos de B12 e B13. A tira do canal e, hibridizada com o fragmento SE1 foi, inclusive, exposta por muito menos tempo, a fim de permitir a

Figura 18 - Northern blot de RNA total de epimastigotas em gel de agarose 0,7%, hibridizado com sondas dos clones BGE 2 (a), BGE 7 (b), BGE 9 (c), BGE 14 (d) e SE1 (e). Consultar Figura 8 para a identificação das respectivas regiões abrangidas por cada sonda. A exposição da tira de nylon hibridizada com a sonda SE1 foi mais curta para permitir a composição da figura. Marcadores de peso molecular de RNA ribossomal (rRNA de *T. cruzi* e de células LLC-MK2), em quilobases, estão indicados.

composição da foto. Esse resultado sugere que a concentração do transcrito de B11 é muito mais elevada do que a dos transcritos dos genes B12 e B13. A banda de 5,5 kb também foi reconhecida pela sonda SE1 em Northern blot com mRNA poli (A)⁺, apesar que com menor intensidade (dados não mostrados). Não foi analisado o padrão de hibridização de RNA de formas tripomastigotas com a sonda SE1.

3.19. Caracterização do gene B11

3.19.1. Estudo do arranjo genômico do clone SE1

Uma vez demonstrado que o fragmento SE1 hibridiza com um transcrito de 5,5 kb, decidiu-se investigar o arranjo genômico do respectivo gene. Para essa finalidade procedeu-se a um ensaio de Southern blot, conforme descrito (itens 2.23.1 e 2.23.2). O padrão de hibridização da sonda SE1 com DNA de *T. cruzi*, digerido com várias enzimas de restrição, evidencia um grande número de bandas em algumas digestões, sendo compatível com o de um gene de múltiplas cópias (Figura 19). Na digestão com *SacII* verifica-se uma banda forte de hibridização, de cerca de 1,0 kb, e a ausência total de bandas de maior peso. Isso sugere que as cópias do gene B11 não devem ser polimórficas para os sítios de *SacII*.

3.19.2. Seqüenciamento do fragmento SE1

Visando obter a seqüência nucleotídica completa do clone SE1, procedeu-se à digestão do DNA do clone pBluescript[®]-SE1 com as enzimas *XhoI* e *KpnI* e, posteriormente, à reação de digestão unidirecional com Exonuclease III, conforme descrito no item 2.25.1. Para o seqüenciamento da fita oposta foi empregada a dupla de enzimas *BamHI* e *SacI*. A seqüência nucleotídica final foi obtida a partir da confrontação dos dados de seqüência das duas fitas. Conforme pode ser visto na Figura 20, o inserto SE1 apresenta 759 pb e um passo de leitura aberto na orientação *EcoRI* — *SalI*, ao longo de todo o inserto. A seqüência protéica, traduzida a partir da ORF, também está apresentada na Figura 20. A direção da transcrição dessa hipotética ORF seria portanto oposta à dos genes B12 e B13 (ver Figura 8).

As seqüências nucleotídica e protéica do fragmento SE1 foram submetidas à busca de homologia no programa BLAST do NCBI. A seqüência protéica apresentou homologia com a proteína da ORF-1 de TRS-1, um elemento com características de retrotransposon, isolado de *T. brucei* (Murphy *et al.*, 1987). Quando as seqüências das duas proteínas foram alinhadas pelo programa BESTFIT (Figura 21) observou-se uma homologia de 48% e uma identidade de 30%. Utilizando o mesmo programa para o alinhamento das seqüências nucleotídicas, observou-se uma identidade de 43% (Figura 22). Esses dados serão melhor discutidos adiante (item 4.8).

Figura 19 - Southern blot com DNA de formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y), digerido com enzimas de restrição e hibridizado com a sonda SE1. Marcadores de peso molecular, em quilobases, estão indicados.

EcoRI (E1)																
1	G AAT TCC	ATC	GGC	GCT	TAT	CAG	CCG	TAT	ACA	TAC	TGT	TTG	CGT	GCC	46	
1	Asn Ser Ile	Gly Ala Tyr	Gln Pro Tyr	Thr Tyr Cys	Leu Arg Ala										15	
47	TTA TGT GAC GCG CAA CGA CAA AAG CTA CTG CTA ATC GGA GAC ATT GAG	94														
16	Leu Cys Asp Ala Gln Arg Gln Lys Leu Leu Leu Ile Gly Asp Ile Glu	31														
95	CAG AAC CCA GGC CCC ATA GCA GTA CTC CAG ATG AAC GTT TCT TGC CTC	142														
32	Gln Asn Pro Gly Pro Ile Ala Val Leu Gln Met Asn Val Ser Cys Leu	47														
143	ACG CCG TCA AAA CTC GCA ACA TTA ATG GCG CAA GGA GCA GAC ATA ATA	190														
48	Thr Pro Ser Lys Leu Ala Thr Leu Met Ala Gln Gly Ala Asp Ile Ile	63														
191	GCC ATC CAG GAG ACT TGG AAG TCG TCG GAG CAG ATC GCC AGC ATG CAT	238														
64	Ala Ile Gln Glu Thr Trp Lys Ser Ser Glu Gln Ile Ala Ser Met His	79														
239	ACT GGA GAT TAT GTG CTC TAT GCA CAG TCG CGC ATC GGC AAG GGA GGC	286														
80	Thr Gly Asp Tyr Val Leu Tyr Ala Gln Ser Arg Ile Gly Lys Gly Gly	95														
287	GGT GTG GCG GTG CTG GTG GAG AAA ACT CTC CGC TCC AAG CGT ATA CCC	334														
96	Gly Val Ala Val Leu Val Glu Lys Thr Leu Arg Ser Lys Arg Ile Pro	111														
335	CTC ACC ATC CCC CAG CAT GAC ACC AGC CTT GAA GTG GTG GTG GTC CAG	382														
112	Leu Thr Ile Pro Gln His Asp Thr Ser Leu Glu Val Val Val Val Gln	127														
383	GTT GCT CTG GAC CAG AAC CGT GAT CTT ATC GTA GCG AGT GCC TAT ATG	430														
128	Val Ala Leu Asp Gln Asn Arg Asp Leu Ile Val Ala Ser Ala Tyr Met	143														
431	AGA CCA CCA CCG CAA GTA ACG CAA TCC TTC AGG CGG TTA GTA AAC TGC	478														
144	Arg Pro Pro Pro Gln Val Thr Gln Ser Phe Arg Arg Leu Val Asn Cys	159														
479	CTT CCA GCC TCG TCG CCG CTC CTG CTG TGC GGG GAT TTC AAC ATG CAT	526														
160	Leu Pro Ala Ser Ser Pro Leu Leu Leu Cys Gly Asp Phe Asn Met His	175														
527	CAC CCA CAG TGG GAG CCA TTC TTG GAG TCT TCT CCA AGC GAG GTT GCC	574														
176	His Pro Gln Trp Glu Pro Phe Leu Glu Ser Ser Pro Ser Glu Val Ala	191														
575	GCA GAA TTT TTA GAA CTG TGC ACG GAT GCG GGA CTC ACC TTG GTT AAC	622														
192	Ala Glu Phe Leu Glu Leu Cys Thr Asp Ala Gly Leu Thr Leu Val Asn	207														
623	ACC CCT GGT GAG ATC ACG TAT GCT CGT GGC ACA AGA GAA CGA TCC TGT	670														
208	Thr Pro Gly Glu Ile Thr Tyr Ala Arg Gly Thr Arg Glu Arg Ser Cys	223														
671	ATC GAT CTG ACA TGG TCA AAT GCT TTG ACT GTG CCA GAT TGG TCA GCT	718														
224	Ile Asp Leu Thr Trp Ser Asn Ala Leu Thr Val Pro Asp Trp Ser Ala	239														
SalI																
719	TCT GTG TCG CCG CTT AGT GAT CCG TTG ACC TGC AGG TCG AC	759														
240	Ser Val Ser Pro Leu Ser Asp Pro Leu Thr Cys Arg Ser	252														

Figura 20 - Sequência nucleotídica completa do fragmento SE1 na orientação *EcoRI* – *SalI*. Os sítios de restrição *EcoRI* e *SalI*, que delimitam esse inserto, estão assinalados em negrito. A tradução da sequência protéica está apresentada.

SE1	1	NSIGAYQPYTYCLRALCDAQKLLLLIGDIEQNPGP-IAVLQMNVSCLTP	49
		..: :... :: :: :: : : 	
TRS-1	55	TPFFICRSLGTCKRAISSIIRTKMLVSGDVEENPGPSLHGMQWNCAGLSQ	104
SE1	50	SK-LA---TLMAQGAOI IAIQETWKSSEQIASMHTGDYVLYAQSRIGKGG	95
		: ::: : : ::: : :: : : : :	
TRS-1	105	GKRLALHKT LVDERIAVCLLSETRMTPGEAACFSVAGYQHHGIARNCKGG	154
SE1	96	GVAVLVEKTLRSKRIPLTIPOHDTSLVVVVQVALDQNRDLIVASAYMRP	145
		:: : : : : ::: : : ...	
TRS-1	155	GVSI LVREDLPVE-TGMTVVGRS---EQVHAT IHLARGQALTVTSAI T P	200
SE1	146	PPQVTQSFRRLVNCLPASSPLLLCGDENMHHQPWEPPLESSPSEVAAEFL	195
		.. : : : : : : : :: : : : : : :	
TRS-1	201	KHTFTAT--DLDTLLTDGAQLIGADANAHALAWDR--ASPPNTKGETLT	246
SE1	196	ELCTDAGLTLVNTPEITYARGTRERSCIDLTWSNALTVPDWSASVSPLS	245
		: : : : : : : : : : : :	
TRS-1	247	QWCIDNQF-LVYDTGECTWYARHYGESTPOVTLNRNCTVYTWTSLYSPDS	295
SE1	246	DP	247
		.	
TRS-1	296	DH	297

Figura 21 - Alinhamento entre as seqüências protéicas do fragmento SE1 e da ORF-1 de TRS-1 de *T. brucei*. Os hífens representam regiões de lacunas entre as seqüências alinhadas. Os símbolos entre as seqüências representam resíduos idênticos (|), resíduos pertencentes ao mesmo grupo (:) com substituições favorecidas evolutivamente (Dayhoff *et al.*, 1983), e outras substituições (.). Alinhamento feito com o programa BESTFIT, do pacote de análise de seqüências GCG. Parâmetros e resultados do programa: Gap Weight 3.000; Average Match 0.540; Length Weight 0.100; Average Mismatch -0.396; Quality: 124.6; Length 252; Ratio: 0.513; Gaps 8; Percent Similarity 47.899; Percent Identity: 29.832.

SE1	1	GAATTCATCGGCGCTTATCAGCCGTATACATA	33
TRS-1	851	CAGCAGCGTCTTGCTGGGACACCGTTTTTCATTTGTGGTCCCTGGGCAC	900
SE1	34	CTGTTTGCCTGCCTTATGTGACGCGCAACGACAAAAGCTACTGCTAATCG	83
TRS-1	901	GTGCAAGCGTGCCATCAGCAGTATCATCCGCACTAAGATGCTGGTGTCCG	950
SE1	84	GAGACATTGAGCAGAACCCAGGCC...CCATAGCAGTACTCCAGATGAAC	130
TRS-1	951	GTGATGTGGAAGAGAATCCCGACCGTCGTTGCACGGGATGCAGTGGAAC	1000
SE1	131	GTTTCTTGCTCAGCCCGTCAAA.....ACTCGCAACATTAAT	168
TRS-1	1001	TGCGCCGGGCTATCTCAAGGAAAGAGATTAGCACTCCACAAAACCTTGT	1050
SE1	169	GGCGCAAGGAGCAGACATAATAGCCATCCAGGAGACTTGAAGTCGTCGG	218
TRS-1	1051	TGATGAGCGGATCGCCGTTTGTCTGTTGAGCGAGACAAGGATGACGCCTG	1100
SE1	219	AGCAGATCGCCAGCATGCATACTGGAGATTATGTGCTCTATGCACAGTCG	268
TRS-1	1101	GAGAGGCGGCTTGCTTTAGCGTTGCTGGCTACCAACATCACGGAATAGCT	1150
SE1	269	CGCATCGGCAAGGGAGGCGGTGTGGCGGTGCTGGTGGAGAAAACCTCTCG	318
TRS-1	1151	CGTAAGTCAAAGGAGGTGGTGTATCAATACTAGTGAGGGAGGACCTGCC	1200
SE1	319	CTCCAAGCGTATACCCCTCACCATCCCCAGCATGACACCAGCCTTGAAG	368
TRS-1	1201	AGTCGAG.....ACCGGTATGACCGTTGTTGGTGCAGTGAAC	1238
SE1	369	TGGTGGTGGTCCAGGTTGCTCTGGACCAGAACCGTGATCTTATCGTAGCG	418
TRS-1	1239	AAGTGCATGCAACAATTCACCTTGACGTGGACAGCCGCTGACTGTCACG	1288
SE1	419	AGTGCCTATATGAGACCACCACGCAAGTAACGCAATCCTTCAGGCGGTT	468
TRS-1	1289	TCGGCTATCATCCACCAAAACACACCTTCACGGCAACTGAC.....	1330
SE1	469	AGTAAACTGCCTTCCAGCCTCGTCGCCGCTCTGCTGTGCGGGATTTC	518
TRS-1	1331	.CTAGATACGCTTCTGACGACTGACGGTGCCAGCTCATCGGTGCAGAC.	1378
SE1	519	ACATGCATCACCCACAGTGGGAGCCATTCTTGGAGTCTTCTCCAAGCGAG	568
TRS-1	1379	GCTAACGCACACGCGTTGGCATGGGATCGCGGAGCCCAACAAAT	1423
SE1	569	GTTGCCGAGAAATTTTAGAACTGTGCACGGATGCGGGACTCACCTTGGT	618
TRS-1	1424	ACCAAGGGTGAAACCTCACACAGTGGTGCATTGACAACAGTTTCTGGT	1473
SE1	619	TAACACCCCTGGTGAATCAGTATGCTCGTGCCACAAAGAGAACGATCCT	668
TRS-1	1474	CTACGACACTGGTGAATGACCTGGTACGCGCGCCACTACGGGGAGTCCA	1523
SE1	669	GTATCGATCTGACATGGTCAAATGCTTTGACTGTGCCAGATTGGTCAGCT	718
TRS-1	1524	CCCTGATGTGACACTGTCAAGGAATTGCACAGTGTACACGTGGACATCG	1573
SE1	719	TCTGTGTCGCCGCTTAGTGATC.CGTTGACCTGCAGGTCGAC.....	759
TRS-1	1574	CTGTATTCTCCGATAGCGATCACCATCACATATTTTCGACGTTATCGT	1623

Figura 22 - Alinhamento das seqüências nucleotídicas do fragmento SE1 com a de TRS-1 de *T. brucei*. Os pontos representam regiões de lacunas entre as seqüências alinhadas. Alinhamento feito com o programa GAP, do pacote de análise de seqüências GCG. Parâmetros e resultados do programa: Gap Weight 5.000; Average Match 1.000; Length Weight 0.300; Average Mismatch 0.000; Quality: 271.1; Length 6853; Ratio: 0.357; Gaps 6; Percent Similarity 42.896; Percent Identity: 42.896.

A proteína codificada pelo fragmento SE1 foi analisada quanto à sua possível estrutura secundária, utilizando o programa PEPTIDESTRUCTURE. As predições de hidrofiliidade e de estrutura secundária foram feitas a partir dos algoritmos de Kyte & Doolittle (1982) e Chou & Fasman (1978), respectivamente. Conforme pode ser visualizado na Figura 23, as regiões de estrutura definida são muito curtas e a proteína alterna pequenas regiões de alta e baixa hidrofiliidade.

3.20. Estudo do arranjo cromossômico dos genes B11, B12 e B13

Os resultados apresentados até o momento demonstram que uma região de 32 kb do genoma de *T. cruzi* foi mapeada (Figura 8) e contém 3 cistrons denominados B11, B12 e B13, respectivamente. Os genes B12 e B13 apresentam um padrão de hibridização compatível com uma única cópia por genoma haplóide (Figura 2), enquanto B11 parece ser um gene de múltiplas cópias (Figura 16). Com o objetivo de verificar a distribuição cromossômica desses genes, realizou-se um ensaio de Southern blot a partir de um gel de separação de cromossomos de *T. cruzi*. Amostras de DNA de formas epimastigotas das cepas CL, Y e G foram preparadas e separadas em eletroforese de campo pulsado por Maria Isabel Cano (Escola Paulista de Medicina), utilizando o sistema Gene Navigator[®] (ver item 2.27). O gel foi transferido para um filtro de nylon e hibridizado com sondas feitas a partir do fragmento SE1 (representando o gene B11 - ver Figura 8) e dos clones B12 e B13.

Conforme pode ser visto na Figura 24, as sondas B12 e B13 hibridizaram com um único cromossomo de 1,26 Mb na cepa CL, 1,41 Mb na cepa Y e 0,98 Mb na cepa G. Esse resultado confirma a proximidade física dos genes B12 e B13. A sonda SE1 hibridizou com praticamente todos os cromossomos, confirmando que o gene B11 está presente em múltiplas cópias distribuídas em cromossomos, que variam de 3,1 a 0,58 Mb na cepa CL; 2,4 a 0,58 Mb na cepa Y e 3,8 a 0,51 Mb na cepa G. Conclui-se ainda que os genes B11, B12 e B13 estão presentes em diferentes cepas de *T. cruzi*.

Figura 23 - Esquema em duas dimensões da predição da estrutura secundária da sequência protéica codificada pelo fragmento SE1, segundo o algoritmo de Chou-Fasman (1978). Estão assinalados no esquema as regiões de α -hélice, folha β -pregueada, dobras, molas e os locais de maior hidrofiliidade e hidrofobicidade, conforme o método de Kyte & Doolittle (1982). Dados calculados pelo programa PEPTIDESTRUCTURE e plotados pelo PLOTSTRUCTURE do pacote de análise de seqüências GCG (Devereux *et al.*, 1984).

Figura 24 - Cromossomos de formas epimastigotas de *T. cruzi*, das cepas CL, Y e G, separados por eletroforese de campo pulsado (Gene Navigator[®] System). O primeiro e o quarto painéis representam o gel corado com brometo de etídio. O gel foi transferido para um filtro de nylon e hibridizado com as sondas B11 (fragmento SE1), B12 e B13. Marcadores de peso molecular, em megabases, estão indicados.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho descrevemos o isolamento e caracterização de dois genes que codificam antígenos de *T. cruzi*. Esses genes foram inicialmente identificados a partir de uma biblioteca de expressão construída em λ gt11 e triada com um soro policlonal de coelho contra a forma tripomastigota. A seguir, os genes completos foram isolados a partir de uma biblioteca genômica em λ EMBL3 e caracterizados quanto a seus produtos de transcrição e de tradução no parasita. Verificou-se que as proteínas recombinantes podem ser utilizadas no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Além disto, o arranjo genômico dos genes foi analisado em Southern blots de DNA digerido com enzimas de restrição e de cromossomos do parasita separados por eletroforese de campo pulsado. Finalmente a sequência nucleotídica completa de um desses genes foi determinada. Nesse item discutiremos os resultados e conclusões obtidas no trabalho, comparando-os com dados da literatura.

4.1. Um novo método de absorção de soros

Na literatura, existem várias técnicas de absorção de soros destinados à varredura de bibliotecas de expressão, entretanto cada uma delas apresenta algumas desvantagens. O método mais comumente empregado consiste em se plaquear fagos não recombinantes em uma densidade de placas suficiente para a obtenção de lise confluenta. Filtros de nitrocelulose são então colocados sobre o tapete bacteriano lisado e os antígenos são adsorvidos. Esses filtros são bloqueados e incubados com o soro a ser absorvido, mimetizando uma varredura de clones (Ozaki *et al.*, 1986; Snyder *et al.*, 1987). Como a massa de antígeno imobilizado é pequena, são necessários muitos ciclos de incubação. Há várias desvantagens nesse método. Em primeiro lugar utiliza-se uma quantidade muito grande de filtros, o que o torna bastante dispendioso. Apesar de os filtros serem bloqueados a cada ciclo, quanto maior for o número de ciclos, maior será também a perda de anticorpos imobilizados na nitrocelulose. Além disso, a excessiva manipulação do soro ao longo dos ciclos pode levar a consideráveis perdas de seu título. Um outro método envolve a obtenção de um lisado bacteriano, seu acoplamento em resina de agarose ativada e posterior remoção dos anticorpos por cromatografia de afinidade (Sambrook *et al.*, 1989). Além de envolver a utilização de uma resina cara, é bastante trabalhoso, pois exige etapas de cultivo, lise, acoplamento e cromatografia. Uma variação desse método é a diluição do soro no próprio lisado bacteriano. Esse método é simples e barato, porém implica na adição irreversível de componentes exógenos ao soro, entre os quais podem estar proteases bacterianas, que podem reduzir a vida útil dos anticorpos. Além disso, a adição do lisado

não remove efetivamente os anticorpos anti-*E. coli*, mas simplesmente funciona como um competidor pela sua ligação.

O método proposto nesse trabalho (ver item 2.10.1) tem sido utilizado há muitos anos para a absorção de anticorpos de soros destinados à sorotipagem de bactérias (Ørskov & Ørskov, 1984). Entretanto, seu emprego em soros destinados à utilização em técnicas de biologia molecular é inédita na literatura. A utilização de bactérias íntegras formolizadas garante a absorção de anticorpos contra antígenos de superfície que são, geralmente, os mais imunodominantes. A autoclavação das bactérias visa a exposição de antígenos mais internos. Como o processo de absorção somente utiliza a fração insolúvel, não há a adição de componentes exógenos ao soro. Em cada etapa de centrifugação há a efetiva remoção dos anticorpos anti-*E. coli*. Além disso, não há risco de contaminação bacteriana, pois nas duas alíquotas utilizadas as bactérias já estão mortas. Testes de cultivo, realizados com a fração formolizada, comprovaram a total esterilidade da preparação. Finalmente, o processo é extremamente barato, fácil de ser executado e bastante rápido. O soro é relativamente pouco manipulado e o grau de absorção pode ser controlado pelo número de ciclos de absorção.

4.2. Diagnóstico sorológico da doença de Chagas

A partir da metade da década de 80 alguns grupos clonaram e expressaram antígenos de *T. cruzi* em *E. coli*. Vários desses antígenos demonstraram reatividade frente a soros de pacientes chagásicos em fase aguda e crônica (cf. Frasch *et al.*, 1991). Esses resultados levaram à idéia de que antígenos recombinantes de *T. cruzi* poderiam constituir uma alternativa aos métodos atuais de diagnóstico sorológico da doença de Chagas (cf. Frasch & Reyes, 1990). Pensando nessa possibilidade, decidiu-se investigar o grau de eficiência dos antígenos B12 e B13 na discriminação de soros de pacientes chagásicos.

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram que a proteína recombinante B13 é potencialmente aplicável no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. O desempenho de B13, tanto em termos de sensibilidade como de especificidade, é superior a de B12. No estudo multicêntrico promovido pela OMS, o antígeno B12 apresentou um índice κ de 0,50, enquanto que B13 obteve o segundo melhor desempenho em relação a 21 antígenos recombinantes provenientes de 9 laboratórios diferentes (Moncayo & Luquetti, 1990). Entre 50 soros testados, compreendendo soros de indivíduos normais, pacientes chagásicos e portadores de outras parasitoses, o antígeno B13 não detectou apenas um indivíduo chagásico, discriminando todos os soros negativos (Zingales *et al.*, 1990). O antígeno 2 de Ibañez *et al.* (1987), homólogo a B13, também participou do estudo, obtendo um índice κ de 0,84, contra 0,96 de B13. Esse resultado indica que a metodologia empregada tanto na purificação da proteína, como no teste sorológico é muito importante

para o diagnóstico correto. Quando os testes foram estendidos para um painel de 128 soros, B13 apresentou uma sensibilidade e especificidade de 97% e o índice κ baixou para 0,94, sendo ainda assim bastante satisfatório para seu emprego no sorodiagnóstico da doença de Chagas. Com relação a B12, testado frente ao mesmo painel de soros, observou-se sensibilidade de 83% e especificidade de 78%, com um índice κ de 0,61. Uma explicação para um desempenho menos eficiente de B12 em relação a B13 poderia ser a menor representatividade do peptídeo de B12 em relação ao tamanho total da proteína de fusão. Enquanto B13 representa cerca de 16% da proteína de fusão, B12 constitui apenas 11%. Em função da conformação conferida pela β -galactosidase, os epitopos de B12 poderiam estar crípticos, diminuindo sua reatividade perante os soros. Outra alternativa é a de que, de fato, o antígeno do parasita correspondente a B12 é menos antigênico que B13 ou menos expresso em distintas cepas de *T. cruzi*.

Com o objetivo de verificar a primeira hipótese e obter um antígeno recombinante mais eficiente, foi construído o clone pGEX-S3S4. O fragmento S3S4 (consulte Figuras 8, 11 e 12) codifica 22 repetições seriadas de 20 aminoácidos, ao passo que a proteína de fusão β -gal-B12 contém somente 6 repetições. O vetor pGEX expressou a proteína recombinante em grandes quantidades (até cerca de 25 mg/L) na hospedeira DH5 α . Entretanto, conforme foi mostrado (comparar canais *d* e *e* da Figura 10), cerca da metade da proteína de fusão apresentou-se em corpúsculos de inclusão. A fração solúvel da proteína apresentou uma baixa afinidade pela resina GSH-agarose, reduzindo a eficiência desse método de purificação. O domínio representado pelo fragmento S3S4 deve, possivelmente, levar a uma conformação inadequada para a ligação da proteína de fusão à GSH. A precipitação seletiva da proteína pela adição de SDS à solução passou a ser empregada devido à sua facilidade de execução. Não está clara a ação do SDS no processo. O SDS, sendo um detergente de carga negativa, poderia neutralizar as cargas positivas presentes especialmente nas repetições seriadas, onde há a ocorrência de duas lisinas contra um ácido glutâmico, conferindo uma carga líquida positiva à proteína. Ao neutralizar essas cargas, o detergente poderia reduzir a repulsão intermolecular e, assim, permitir a agregação das moléculas e sua insolubilização. É importante lembrar, no entanto, que esta abordagem recupera apenas metade da proteína, já que o restante permanece na fração insolúvel do lisado. Por outro lado, a proteína presente nos corpúsculos de inclusão não pode ser utilizada diretamente, uma vez que contém uma grande massa de proteínas contaminantes (consulte Figura 10, canal *d*).

A proteína de fusão purificada GST-S3S4, seja por afinidade ou por precipitação seletiva, apresentou baixa solubilidade. Isso se refletia especialmente na estocagem onde, após congelamento, a proteína precipitava totalmente. A ressolubilização somente foi possível em tampão trietanolamina com um pH superior a 10. Grieco *et al.* (1992) relataram um método semelhante para ressolubilizar proteínas fundidas à GST presentes em

corpúsculos de inclusão. Desta forma, os corpúsculos foram ressuspensos em uma solução contendo 1,5 % Sarkosyl®/25 mM trietanolamina/1 mM EDTA, pH 8,0. A proteína ressolubilizada foi adicionada de Triton® X-100 e, mesmo após centrifugação, se manteve no sobrenadante. Segundo os autores, o Sarkosyl® romperia as interações responsáveis pela formação de coagregados insolúveis de proteínas de fusão e componentes externos da membrana da bactéria. Este método não foi testado por nós na solubilização da proteína GST-S3S4 a partir da fração insolúvel.

Um segundo problema na manipulação de GST-S3S4 se refere à estabilidade da proteína. Mesmo quando estocada a -20°C, a proteína apresenta elevado grau de degradação após alguns meses. À temperatura ambiente, a proteína se mantém estável somente por algumas horas, dificultando sua manipulação bem como tornando inviável qualquer tentativa de digestão por Fator Xa para remoção da GST.

Apesar das dificuldades discutidas acima, a proteína GST-S3S4 foi testada em RIA, visando avaliar sua potencialidade de uso no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Resultados ainda preliminares mostraram um desempenho sensivelmente inferior ao obtido pela proteína β -gal-B12. Esse fato é surpreendente na medida em que, conforme discutido acima, β -gal-B12 contém cerca de 6 repetições seriadas, ao passo que GST-S3S4 não somente é composta de 22 repetições seriadas, como também do domínio da repetição de 173 aminoácidos (ver Figuras 11 e 12). Uma possível explicação é que a de que a proteína precipitada com SDS e ressolubilizada em tampão alcalino pudesse ainda estar contaminada com o detergente. Esse fato poderia diminuir sua eficiência de adsorção nos poços da microplaca ou ainda dificultar o reconhecimento do antígeno pelos anticorpos. Futuramente serão feitos ensaios para a medição do grau de adsorção à placa, bem como pretende-se submeter a solução da proteína a uma cromatografia em resina AG 11 A8 (BioRad) , a fim de remover o SDS. Entretanto, alguns ensaios feitos com a GST-S3S4, purificada por cromatografia de afinidade em GSH-agarose e livre de SDS, também revelaram uma eficiência inferior a β -gal-B12.

Os ensaios realizados com GST-S3S4 resultaram em um alto ruído de fundo. Soros normais testados frente à proteína apresentaram uma alta reatividade, fazendo com que a diferença de sinal em relação a soros chagásicos fosse pequena. As baixas sensibilidade e especificidade parece ser uma característica desse antígeno, e não uma consequência do tipo de proteína de fusão empregada ou de sua forma de purificação. Nesse caso, o antígeno B12 não poderia ser indicado como reagente para testes de sorodiagnóstico da doença de Chagas.

Apesar da menor sensibilidade do antígeno β -gal-B12, foi observado que alguns soros chagásicos provenientes da região de Bambuí (MG), que não apresentaram reatividade a B13, eram positivos para B12 (Zingales *et al.*, 1990). Essa observação sugere a existência de uma variabilidade na população de anticorpos gerada durante o curso da doença de

Chagas, resultante das cepas infectantes de *T. cruzi*, e/ou das características genéticas do hospedeiro. Há tempos atrás, foi cedido ao Dr. Jerry Manning (UC Irvine) o mesmo painel de soros de Bambuí utilizado no presente estudo, a fim de avaliar a resposta de anticorpos ao antígeno de 90 kDa clonado por esse grupo (Beard *et al.*, 1988). Os autores concluíram que somente 60% dos soros testados reconheceram o antígeno de 90kDa. Para fins diagnósticos e visando reduzir o efeito da variação da resposta imunológica em distintos pacientes, surge a possibilidade de utilizar dois ou mais antígenos recombinantes em cada teste sorológico.

Conforme relatado (Zingales *et al.*, 1990), a mistura dos antígenos B12 e B13 no mesmo poço do RIA permitiu corrigir, para os soros de Bambuí, os resultados falsos-negativos encontrados para cada um dos antígenos utilizados em separado. Entretanto, essa abordagem somente parece interessante nos casos em que se deseja o máximo de sensibilidade. Uma vez que B12 apresenta menor especificidade do que B13, sua presença poderia levar concomitantemente a um aumento do número de falsos-positivos. A utilização de mais de um antígeno recombinante, de forma simultânea, foi feita com sucesso com as proteínas CRA e FRA (Krieger *et al.*, 1990). Quando esses antígenos foram utilizados conjuntamente em ELISA (Krieger *et al.*, 1992), houve uma distinção mais clara entre soros negativos e aqueles próximos da linha de corte ("borderline"). Os autores atribuem esse resultado ao fato de esse procedimento favorecer as respostas de alta afinidade dos soros, independentemente do título de anticorpos. Contrariamente ao observado com o uso de B12 + B13, o uso conjunto de CRA + FRA não levou a um incremento no número de falsos-positivos, embora o número de soros de pacientes com outras parasitoses tenha sido muito pequeno para permitir uma conclusão definitiva. No caso de B12 e B13 foram testados 38 soros de pacientes com outras parasitoses, numa amostragem global de 128 soros (ver Tabela I). Apesar desse número ainda ser relativamente pequeno, foi possível verificar que o antígeno B13 não mostrou reatividade cruzada com anticorpos de outras parasitoses, com a exceção de um soro de um paciente com leishmaniose. O antígeno B12, por sua vez, apresentou um elevado grau de reações cruzadas indesejáveis. Uma análise mais rigorosa, feita com um número mais elevado de soros, poderia comprovar melhor a especificidade de B13.

Frente aos dados obtidos, sugere-se que a diferença de reatividade para o antígeno B12 ou B13 parece ser um reflexo da característica genética do paciente no que tange ao tipo de anticorpos produzidos tanto a nível quantitativo (massa, afinidade e especificidade) quanto qualitativo. Essa observação abre perspectivas interessantes como, por exemplo, o estudo da persistência ou não da resposta a um determinado antígeno ao longo de um tratamento quimioterápico. Se considerarmos que essa diferença de reatividade também poderia ser atribuída à variação da constituição antigênica das diferentes cepas de *T. cruzi*, então esse antígeno marcador, para ser eficiente, teria que ser ubíquo nas cepas do parasita.

Em outras palavras, a pergunta que se formula é: é possível utilizar a resposta imunológica a determinado antígeno como critério de cura ou melhoria da patologia?

Nessa direção, foi relatada a existência de duas classes de anticorpos contra *T. cruzi* em infecções experimentais em camundongos (Krettli & Brener, 1982). Animais infectados, assim como aqueles imunizados com parasitas mortos ou com frações celulares, produzem anticorpos detectados por testes sorológicos convencionais como imunofluorescência indireta de parasitas fixados e fixação do complemento. Por outro lado, foi verificado que somente os animais infectados apresentam anticorpos chamados "protetores" ou "líticos", que podem ser detectados por testes de lise de tripomastigotas mediada por complemento e imunofluorescência indireta de parasitas vivos. Foi ainda observado que pacientes chagásicos crônicos apresentam as duas classes de anticorpos. Quando submetidos a quimioterapia, alguns pacientes podem tornar-se soronegativos para os testes convencionais e para a lise mediada por complemento. Outra fração de indivíduos tratados torna-se negativa para a lise mediada por complemento, mas mantém-se soropositiva para os demais testes (Krettli *et al.*, 1982). Esse último grupo de pacientes foi denominado "dissociado". Baseados no fato de que a produção de anticorpos "líticos" somente seria induzida por parasitas vivos, os autores sugeriram que o desaparecimento de anticorpos "líticos" poderia ser utilizado como critério de cura dos pacientes.

Recentemente foi observado que a maior parte da reatividade dos soros do grupo "dissociado", frente aos testes sorológicos convencionais, se deve à presença de anticorpos contra o epitopo galactosil α (1-3) galactose presente em antígenos de *T. cruzi* e em muitos microrganismos da flora gastrointestinal e pulmonar (Gazzinelli *et al.*, 1993). Por outro lado, foi observada uma correlação de 70% entre a reatividade de anticorpos ao antígeno de *T. cruzi* GP57/51 e a lise mediada por complemento em pacientes chagásicos crônicos. Uma vez que a glicoproteína GP57/51 não possui o epitopo Gal α (1-3) Gal, os autores propuseram seu uso como marcador molecular relacionado à cura de pacientes, substituindo o teste de lise mediada por complemento. Esses autores também verificaram que antígenos liberados por tripomastigotas para o meio de cultura apresentam uma boa correlação com a presença de anticorpos líticos. De fato, foi demonstrado por Umezawa *et al.* (1993) que esse antígenos induzem a produção de anticorpos líticos em coelhos e camundongos. Esses anticorpos líticos reconhecem uma variedade de antígenos (Umezawa *et al.*, 1993). Ensaio de imuno-seleção de anticorpos líticos demonstraram que frações de anticorpos dirigidos contra antígenos proteicos das faixas de 70-90 kDa e 100-120 kDa promoviam a mais alta taxa de lise mediada por complemento (50%), comparável àquela obtida por anticorpos contra antígenos totais de tripomastigotas (58%). Por outro lado, anticorpos dirigidos contra a faixa de 50-60 kDa somente promoveram 20% de lise. O conjunto desses resultados sugere que outros antígenos além da GP57/51 podem estar correlacionados com a presença de anticorpos líticos e, inclusive, em maior grau. Portanto, a

busca de outros antígenos com reatividade correlacionada à lise mediada por complemento deveria ser incrementada, visando obter marcadores mais eficientes. A proteína B13, por ser amplamente reconhecida por soros de pacientes crônicos e ter um peso molecular compatível com os antígenos majoritariamente reconhecidos por anticorpos líticos, poderia ser uma boa candidata e deverá ser testada futuramente.

Em nossa avaliação, a utilização do teste de lise mediada por complemento como parâmetro de cura está embasada em um conjunto sólido de dados do grupo da Dra. A. Krettli (UFMG), especialmente se considerarmos os estudos de acompanhamento de pacientes ao longo de vários anos. Entretanto, não há uma análise conclusiva quanto à efetiva cura parasitológica dos indivíduos dos grupos curado e "dissociado". Dados de acompanhamento clínico, parasitológico e sorológico parecem sugerir que pacientes com lise negativa estariam de fato curados (Krettli *et al.*, 1982). Entretanto, está amplamente demonstrado na literatura que os testes de xenodiagnóstico, exame direto e hemocultura apresentam uma baixa sensibilidade na detecção do parasita. Neste sentido, a utilização de sondas de DNA, que demonstram direta e sensivelmente a presença do parasita no paciente, seria fundamental na confirmação das conclusões acima. Dados recentes do grupo do Dr. Carlos Morel (FIOCRUZ - RJ) indicam que sondas dirigidas para o DNA do cinetoplasto de *T. cruzi* são capazes de diagnosticar uma infecção ativa (Wincker *et al.*, 1994). A questão fundamental, que ainda está por ser respondida, é se a ausência de anticorpos líticos reflete um determinado nível de equilíbrio na relação parasita-hospedeiro, ou a eliminação total dos parasitas do paciente. Pacientes chagásicos considerados curados, mas apresentando deficiências imunológicas (imunossuprimidos), seriam especialmente interessantes para esse propósito, pois poderiam revelar alterações nesse equilíbrio.

Com relação à fase aguda da doença de Chagas foi relatado que pacientes desenvolvem um nível elevado de anticorpos da classe IgM, que desaparece com a cronificação da doença (Brenner, 1980). Realizamos alguns testes nos quais se investigou a reatividade de anticorpos da classe IgM para B13 em soros chagásicos agudos. Numa amostra de 20 indivíduos em fase aguda o antígeno B13 foi reconhecido por 70% dos pacientes, sendo 70% por anticorpos da classe IgM e 65% por anticorpos do tipo IgG (Umezawa *et al.*, 1994). O grupo do Dr. Carlos Frasch (Frasch & Reyes, 1990; Reyes *et al.*, 1990), analisando 10 soros de recém-nascidos com Chagas congênito, verificou que o antígeno 2 reagiu com 2 soros, ao passo que o antígeno SAPA (Affranchino *et al.*, 1989) reagiu com 7 soros, sendo reconhecido por anticorpos das classes IgG e IgM. Quanto à proteína B12, verificamos que foi reconhecida por alguns dos soros agudos e, nesses casos, o reconhecimento também foi por IgM.

Nossos resultados sobre o desempenho de B13 no diagnóstico de pacientes chagásicos crônicos, levaram a empresa argentina Polychaco® S.A.I.C. a propor a padronização de um teste de ELISA com esse antígeno. O teste de ELISA permite processar

múltiplas amostras em sistemas automatizados e se tornou uma técnica rotineiramente empregada em laboratórios clínicos. Além disso, não faz uso de radioisótopos e pode facilmente ser adaptada para uso em bancos de sangue. Os resultados, obtidos a partir de um total de 209 soros, mostraram que B13 pode ser eficientemente empregado em testes de ELISA. Seu desempenho, em termos de sensibilidade, é tão bom quanto o das técnicas sorológicas convencionais. Além disso, a utilização de B13 é mais segura porque não requer o cultivo do parasita, mas somente da bactéria produtora. Finalmente, seu desempenho em termos de especificidade tende a ser melhor, uma vez que as técnicas convencionais utilizam o conjunto dos antígenos de *T. cruzi*, os quais apresentam reatividade cruzada com outros parasitas, especialmente *Leishmania* (Camargo & Rebonato, 1969) e *T. rangeli*. De fato, relata-se que *T. cruzi* compartilha cerca de 30% de seus antígenos com *Leishmania* e 60% com *T. rangeli*, um tripanossomatídeo não patogênico (Afchain *et al.*, 1979).

Devemos salientar que a proteína recombinante B13 utilizada nos testes está ligada à β -galactosidase. Embora tenhamos observado uma baixa reatividade dos soros de chagásicos frente a essa última proteína, esta poderia contribuir para certa inespecificidade do antígeno recombinante. A clivagem das proteínas de fusão com fator Xa poderia permitir a eliminação da β -galactosidase do restante da proteína. Esta abordagem, no entanto, apresenta dois problemas. Em primeiro lugar, um método de diagnóstico deve ser barato. A clivagem por fator Xa aumentaria muito o custo de produção do antígeno. Por outro lado, a eficiência de digestão por essa protease pode ser variável. De fato, em nossas condições experimentais, sempre tivemos uma baixa eficiência, mesmo utilizando diferentes lotes da protease. Dos grupos que expressaram suas proteínas no vetor pMSgt11, somente um relatou sucesso na digestão com fator Xa e posterior uso em diagnóstico (Almeida *et al.*, 1990). Uma alternativa barata para solucionar esse problema seria a expressão desses antígenos na forma de proteínas não fundidas com antígenos bacterianos. No entanto isto implica na padronização de técnicas eficientes de purificação.

Uma alternativa à utilização dos antígenos recombinantes, produzidos por bactérias, é o emprego de peptídeos sintéticos. Uma parcela muito significativa dos antígenos de *T. cruzi*, clonados até o momento, apresenta regiões imunodominantes compostas de repetições seriadas de aminoácidos. Peptídeos sintéticos, compostos de uma ou mais unidades repetitivas, poderiam conter os determinantes antigênicos presentes na proteína nativa e serem utilizados em ensaios de ELISA. O primeiro teste de utilização de peptídeos sintéticos foi realizado com peptídeos derivados dos antígenos 1, 2, 13, 36 e SAPA (Vergara *et al.*, 1991), clonados previamente pelo grupo do Dr. Carlos Frasch (Ibañez *et al.*, 1987; Ibañez *et al.*, 1988; Pollevick *et al.*, 1991). Os autores utilizaram um ensaio imunoradiométrico (IRMA) e testaram um total de 34 amostras de soros coletadas no Chile. Foi observada uma ótima correlação entre a reatividade ao conjunto dos peptídeos e os testes de imunofluorescência indireta e ELISA com extrato solúvel de epimastigotas.

Individualmente o peptídio com o melhor desempenho foi aquele derivado do antígeno 2 (homólogo ao antígeno B13 descrito neste trabalho), que apresentou uma sensibilidade de 91%. Os peptídios derivados dos clones 1 e 13 apresentaram uma sensibilidade de 44%, enquanto os peptídios derivados de 36 e SAPA tiveram 65% e 36%, respectivamente. Posteriormente os peptídios 1, 2, 30, 36 e SAPA foram testados em ensaios de ELISA (Vergara *et al.*, 1992) com um total de 60 soros. Foi observada uma correlação entre os resultados de IRMA e ELISA e, novamente, o peptídio 2 apresentou o melhor desempenho, com uma sensibilidade 93%.

A eficiência de um ou outro peptídio para o diagnóstico sorológico pode refletir a presença de epitopos estimuladores de linfócitos B. Esse aspecto específico foi estudado quando se comparou a resposta imune à proteína do clone TcD (Burns *et al.*, 1992), homólogo ao antígeno 13 (Ibañez *et al.*, 1988). O clone TcD apresenta repetições seriadas de 10 aminoácidos, enquanto o antígeno 13 contém repetições de 5 aminoácidos. Um peptídio sintético derivado do clone TcD foi reconhecido por 96,7% de um total de 120 soros de pacientes chagásicos em testes de ELISA (Burns *et al.*, 1992). Esse resultado difere muito daquele observado para o antígeno 13, que obteve uma sensibilidade de apenas 44% (Vergara *et al.*, 1991). Segundo os autores (Burns *et al.*, 1992), o mapeamento do epitopo de TcD demonstrou que peptídios contendo somente a repetição de 5 resíduos não apresentam uma porção essencial do epitopo dominante para a célula B. Na verdade, a diferença entre as duas seqüências se resume à substituição de uma prolina a cada repetição do TcD (KSAEPKPAEP) por uma serina no antígeno 13 (KSAEPKSAEP). Em outro estudo, os peptídios derivados de TcD e do clone 2 (Ibañez *et al.*, 1987; 1988 - homólogo a B13) foram comparados frente a 260 soros positivos e negativos em ELISA (Peralta *et al.*, 1994). Os resultados demonstraram uma sensibilidade de 93% e 91% respectivamente, em ensaios individuais. Quando uma mistura dos dois peptídios foi utilizada nos testes, a sensibilidade foi maior do que 99%. A especificidade da mistura de antígenos foi de 99%, comparável à obtida por hemaglutinação e superior às especificidades da imunofluorescência indireta (94%) e do ELISA com extrato total de *T. cruzi* (95%).

O conjunto dos resultados discutidos acima abre a possibilidade da utilização de peptídios sintéticos em ensaios de ELISA. O emprego de mais de um peptídio sintético poderia atingir teoricamente uma sensibilidade tão alta quanto aquela obtida pelo conjunto de técnicas sorológicas convencionais, aliada a uma especificidade superior.

Em resumo, dentre os antígenos de *T. cruzi* caracterizados e testados, B13 se revelou um dos mais promissores para a composição de um novo teste sorológico para a doença de Chagas. Conforme foi evidenciado por nosso grupo e por outros, esse antígeno obteve um bom desempenho tanto em testes de RIA como por ELISA. Além disso, pode ser utilizado na forma de proteína recombinante ou como peptídio sintético. Essa versatilidade poderia

permitir seu emprego em diferentes formatos de teste, na dependência dos recursos e equipamentos disponíveis em cada região.

4.3. Identificação e caracterização dos antígenos clonados

A identificação das proteínas nativas, correspondentes aos antígenos clonados B12 e B13, foi feita por Western blot. Os anticorpos foram obtidos pela imunização de coelhos e por imuno-seleção a partir de soros de humanos chagásicos. Verifica-se para B13 uma concordância entre os resultados obtidos com anticorpos de chagásicos imunoselecionados e com o soro de coelho anti- β -gal-B13 (Figuras 6A e 6D tiras *e*). Os resultados encontrados com o clone B13 são diferentes daqueles obtidos por Hoft *et al.* (1989) com o clone TCR39 (homólogo a B13). Enquanto obtivemos reatividade com bandas de 140 e 116 kDa nos diferentes ensaios, esses autores, utilizando anticorpos de chagásicos imuno-selecionados, obtiveram reatividade com bandas de 75 a 105 kDa. Ibañez *et al.* (1987), com o clone 2 (também homólogo a B13) detectaram por imuno-seleção uma banda de 85 kDa. A discrepância entre nossos resultados com aqueles obtidos por esses autores pode ser creditada a diversos fatores.

A primeira possibilidade é de que haja variações antigênicas entre as diferentes cepas empregadas pelos pesquisadores. Essa hipótese estaria de acordo com os resultados encontrados por Macina *et al.* (1989), que demonstraram a existência de polimorfismo nos genes homólogos aos clones 7 e 30 de Ibañez *et al.* (1987). Foi verificado que genes homólogos, em diferentes cepas, apresentam grandes variações do número de repetições seriadas. Nosso grupo também observou esse polimorfismo para o clone B13 entre as cepas Y e CL (ver Figura 3). Uma objeção a essa hipótese é o fato de que o tamanho encontrado para os mRNA homólogos a B13 (clone 2 e TCR39) ter sido semelhante entre os três grupos. Quando analisamos esses mRNAs, verificamos a existência de duas espécies de 3,5 e 4,2 kb (Figura 4). Considerando um peso molecular médio de 110 por aminoácido, esse mRNAs codificariam proteínas de 128 e 154 kDa, que são valores próximos àqueles encontrados por nosso grupo para os antígenos do parasita. Obviamente esse cálculo não leva em conta possíveis glicosilações e outros processamentos pós-traducionais.

A segunda hipótese para explicar essas discrepâncias é de que o processamento pós-traducional ocorreria por vias distintas em diferentes cepas. Contudo, como as diferenças encontradas chegam a ser maiores que 70 kDa, essa hipótese parece pouco provável. Finalmente, é possível que as bandas observadas por Ibañez *et al.* (1987) e Hoft *et al.* (1989) sejam produtos da degradação parcial da proteína nativa. Em nossos Western blots também foram visualizadas bandas de menor peso molecular (ver Figura 3A, tira *d*). Acreditamos que essas bandas sejam produtos de degradação intracelular do antígeno ou resultantes de degradação proteolítica após a lise das células. Vale ressaltar que a todos os lisados

empregados nos ensaios de Western blot e imunoprecipitação foram adicionados inibidores de proteases. Com relação ao reconhecimento de antígenos de 140 e 116 kDa, o fato de anticorpos humanos e de coelhos apresentarem reatividade semelhante, garante uma boa confiabilidade ao resultado. Além disso, os ensaios foram repetidos várias vezes, com diferentes lisados, demonstrando sempre alta reprodutibilidade.

Resultados mais esclarecedores surgiram quando o grupo do Dr. Carlos Frasch apresentou a seqüência completa de um gene homólogo a B13, isolado da cepa CA-1 (Buschiazzi *et al.* 1992). Foi verificado que o produto protéico teria cerca de 155 kDa e, portanto, em contradição com os resultados previamente obtidos por aquele grupo (Ibañez *et al.*, 1987). Quando esses autores passaram a congelar os parasitas a -70°C e descongelá-los imediatamente no tampão de amostra seguindo-se uma fervura, foram detectadas bandas de 140 e 160 kDa. Esses resultados são muito próximos daqueles obtidos por nosso grupo e parecem indicar que, de fato, a proteína nativa é bastante lábil.

Um outro resultado discrepante entre os grupos é a expressão do gene B13 nas diferentes formas evolutivas do parasita. Nossos resultados mostram que as espécies de mRNAs, homólogas a B13, são encontradas em formas epimastigotas e tripomastigotas (Figura 4). Além disso, os antígenos de 140 e 116 kDa também foram detectados nas duas formas evolutivas (ver figura 3A e 3B, tiras *d*). Hoft *et al.* (1989) detectaram as espécies de mRNAs, bem como os antígenos em formas epimastigotas ao passo que Ibañez *et al.* (1987) relataram que tanto os mRNAs como os antígenos seriam tripomastigota-específicos. A hipótese de que nossa cultura de epimastigotas pudesse conter uma grande população de tripomastigotas metacíclicos não procede, uma vez que contagens demonstraram que a taxa de diferenciação dos parasitas era inferior a 5%. Não sabemos explicar a razão da discrepância de resultados com o grupo de Carlos Frasch.

Com relação à proteína B12, os anticorpos humanos imuno-selecionados não detectaram nenhuma banda em Western blot (Figura 3D, tira *c*). Os anticorpos de coelhos imunizados com β -gal-B12 reagiram com bandas de 200 kDa e 230 kDa em epimastigotas e tripomastigotas, respectivamente. A proteína nativa, a exemplo de B13, parece ser bastante lábil, uma vez que Western blots feitos a partir de diferentes lisados freqüentemente levavam à detecção de bandas de peso molecular inferior. A baixa reatividade do soro anti- β -gal-B12 frente ao lisado de *T. cruzi* poderia ser atribuída à relação entre o tamanho da proteína codificada por B12 (13 kDa) e o tamanho da β -galactosidase (116 kDa), o que determinaria que epitopos importantes de B12 poderiam estar em conformação desfavorável (crípticos) na proteína de fusão e não gerarem anticorpos. A subclonagem do fragmento S3S4 (ver Figura 8) teve como objetivo a produção de uma proteína com cerca de 95 kDa (68 kDa de S3S4 e 27 kDa da GST), que poderia ter uma exposição favorável dos epitopos homólogos a B12. Além disso, o fragmento S3S4 também apresenta a seqüência da repetição de 173 aminoácidos (ver Figura 12), a qual poderia aumentar a variedade de

anticorpos produzidos. O soro anti-GST-S3S4 obtido reconheceu um antígeno de peso molecular superior a 200 kDa (dados não mostrados) em lisados de epimastigotas, confirmando os dados obtidos com o soro anti- β -gal-B12. Entretanto, a reatividade observada não foi superior, embora o soro anti-GST-S3S4 reconhecesse fortemente a proteína β -gal-B12 e vice-versa. Esse fato sugere que a fraca reatividade observada pode não ser devida aos soros empregados, mas sim à baixa estabilidade e/ou expressão da proteína nativa no parasita. Isso explicaria ainda os dados de um baixo desempenho da proteína B12 no diagnóstico sorológico.

Um dado interessante é que o soro anti-GST controle reconheceu intensamente por Western blot antígenos com um peso molecular de 54 a 59 kDa, tanto em formas epimastigotas como tripomastigotas (dados não mostrados). Esse resultado sugere que a GSTs de *Schistosoma japonicum* e *T. cruzi* podem ter uma homologia significativa e compartilhar epitopos. A presença de GST em *T. cruzi* foi descrita pela primeira vez por Yawetz & Agosin (1981). Esses autores purificaram a enzima a partir de frações citossólicas de formas epimastigotas. O peso molecular da enzima nativa foi estimado em 37.000, apresentando duas subunidades de 20.000 e 17.000, respectivamente. Mais recentemente foram descritas proteínas de *T. cruzi*, com um peso molecular de 45, 30 e 26 kDa, purificadas por cromatografia de afinidade em resina de glutationa reduzida (Plumas-Marthy *et al.*, 1992). O mesmo grupo também relatou a clonagem de uma proteína de 52 kDa com homologia a GSTs e proteínas relacionadas a "stress" (Schöneck *et al.*, 1994). A GST tem um papel muito importante em processos de detoxificação. Sua função consiste em catalisar reações de formação de conjugados entre a glutationa e compostos eletrofílicos (*cf.* Morello, 1988). Essas reações de detoxificações são especialmente importantes na resistência dos parasitas às drogas nifurtimox e benzonidazol (Moncada *et al.*, 1989). O desenvolvimento de agentes quimioterápicos mais eficientes e menos tóxicos é um importante ramo da pesquisa em doença de Chagas. A ampliação do conhecimento dos mecanismos moleculares de defesa do parasita contra a ação de drogas pode levar ao desenvolvimento de quimioterápicos muito mais eficientes, dirigidos contra alvos específicos. Pelo fato de o *T. cruzi* não possuir catalase, ser deficiente em peroxidase e apresentar um baixo nível de superóxido dismutase, torna-se vulnerável à ação de drogas como o nifurtimox e benzonidazol. No entanto, essas drogas formam radicais livres intermediários, os quais podem ser metabolizados via ação da GST, levando à neutralização ou redução de seu efeito tóxico (*cf.* Morello, 1988). O conhecimento da estrutura e mecanismo de catálise da GST de *T. cruzi* poderá gerar subsídios para o desenho de drogas específicas, visando a inibição dessa enzima e, conseqüentemente, o aumento da eficácia dos quimioterápicos já disponíveis.

Com relação à distribuição celular dos antígenos B12 e B13, foi demonstrado por imunoprecipitação de parasitas radioiodados que as proteínas B12 e B13 não estão

presentes na superfície de formas epimastigotas. Entretanto, em tripomastigotas, a espécie de 140 kDa de B13 foi precipitada, indicando que esta proteína está localizada na superfície do parasita. Esse resultado está de acordo com a observação de Ibañez *et al.* (1988) em ensaios de imunofluorescência indireta. Contudo, apesar de dois outros grupos terem clonado esse antígeno (Ibañez *et al.*, 1987; Hoft *et al.*, 1989), sua localização celular por imunoprecipitação, não tinha sido estabelecida até o momento. Quanto a B12, os resultados da imunoprecipitação, realizada com o soro anti- β -gal-B12, são inconclusivos. Houve uma fraca precipitação de proteínas na faixa de 150 a 170 kDa. Embora vários ensaios tenham sido feitos, não houve reprodutibilidade. Pretende-se no futuro repetir esse ensaio com o soro anti-GST-S3S4, embora resultados preliminares em Western blot sugiram que esse soro também apresenta fraca reatividade decorrente da baixa representatividade e/ou estabilidade da proteína nativa no parasita. Admitindo que a proteína B12 esteja localizada na superfície do parasita, as bandas de 150-170 kDa observadas seriam produtos de degradação parcial. Ensaio de imunofluorescência indireta, utilizando os soros anti-B12 e anti-B13, também não foram conclusivos (dados não mostrados). Mesmo utilizando várias diluições dos soros, somente foi possível observar uma reatividade fraca espalhada ao longo de toda a célula do parasita.

Ao analisarmos o conjunto desses resultados verificamos que, no caso de B13, duas espécies antigênicas de 140 e 116 kDa são detectadas por Western blot nas formas epimastigotas e tripomastigotas. Entretanto somente a espécie de 140 kDa está localizada na superfície de tripomastigotas. O significado biológico desse evento ainda não é conhecido. É possível que esse antígeno esteja relacionado com algum processo necessário para a adesão e/ou interiorização do parasita na célula do hospedeiro ou com mecanismos de evasão ao sistema imune do hospedeiro, especialmente importantes na forma tripomastigota. É possível que os antígenos de 140 e 116 kDa derivem da tradução concomitante dos mRNAs de 3,5 e 4,2 kb, que também são transcritos nas duas formas evolutivas (ver Figura 4). Levando em conta que o gene B13 está localizado em dois alelos (Henriksson *et al.*, 1990), uma hipótese alternativa é a de que cada um dos transcritos derive de cada alelo. O antígeno de 140 kDa, codificado por um dos mensageiros, poderia conter sinais para seu direcionamento para a superfície do parasita. No entanto, esse direcionamento poderia requerer um processamento pós-traducional tripomastigota-específico. A verificação desta hipótese é bastante complexa, envolvendo, numa primeira etapa o isolamento e seqüenciamento de clones contendo cada um dos alelos do gene B13. Ensaio de pulso e caça em formas epimastigotas e tripomastigotas, utilizando [³⁵S] metionina, poderiam ajudar a evidenciar um possível processamento, bem como demonstrar a possível existência de moléculas precursoras. É interessante salientar que dados de seqüência obtidos pelo grupo de Carlos Frasch para um gene homólogo a B13 não mostraram a presença de seqüência sinal amino-terminal ou de uma região hidrofóbica

carboxi-terminal compatível com adição de âncoras via glicosil-fosfatidilinositol (Buschiazzo *et al.*, 1992).

4.4. Caracterização dos transcritos dos genes B12 e B13

Os resultados obtidos em Northern blot (Figura 3) indicam que os transcritos dos genes B12 e B13 estão presentes nas formas epimastigotas e tripomastigotas do parasita. Não foram detectadas variações do tamanho dos transcritos entre as duas formas evolutivas. No caso de B12 foram identificados dois transcritos de 7,2 e 8,8 kb (ver também Figura 18). Os dados do seqüenciamento completo do gene B12 (Figura 12) demonstraram a existência de uma ORF de 6.342 pb, codificando uma proteína de 2.114 aminoácidos. Considerando-se a seqüência primária dessa proteína, pode-se estimar um peso molecular de 223 kDa. Esse valor é bem próximo dos pesos moleculares encontrados em Western blots para epimastigotas (200 kDa) e tripomastigotas (230 kDa), respectivamente (Figuras 6A e 6C, tiras c). A diferença de tamanho entre a ORF de B12 e as espécies de mRNA detectadas por Northern blot pode ser atribuída a erros de cálculo do tamanho das bandas de mRNA (admitem-se erros de até 10-15%) e/ou à existência de extensas regiões não codificantes nos mRNAs. O fato de somente uma classe de antígeno ter sido detectada pode significar que somente uma das espécies de mRNA é traduzida. Outra alternativa é que em cada forma evolutiva ocorre a tradução de um dos transcritos.

No caso do clone B13, existem dois transcritos de respectivamente 3,5 e 4,2 Kb. Esses valores são compatíveis com o tamanho estimado do gene em seus dois alelos (Henriksson *et al.*, 1990; Buschiazzo *et al.*, 1992), bem como com os tamanhos observados por Hoft *et al.* (1989) e Ibañez *et al.* (1987) para os transcritos de genes homólogos a B13. Não sabemos se ambos os transcritos são traduzidos, ou se uma das espécies é um produto de processamento da outra. Admitindo-se um peso molecular médio de 110 Da para cada aminoácido, estes transcritos codificariam proteínas de 128 kDa e 154 kDa. Esses valores não consideram possíveis regiões não codificadoras, mas mesmo assim são bastante semelhantes aos encontrados em Western blot (Figuras 6A, 6B e 6C, tiras d). Devemos salientar nosso desconhecimento quanto ao grau de glicosilação desse antígeno.

4.5. Artefatos de recombinação

Os clones B12 e B13 foram utilizados como sondas para a varredura de uma biblioteca genômica no vetor λ EMBL3. A obtenção de 4 clones genômicos permitiu estabelecer o mapa de restrição de uma região de 32 kb que contém os genes B12 e B13. Entretanto, conforme relatado no item 3.13 (ver também Figura 8), os clones BGE7 e BGE14 apresentaram regiões deletadas, especialmente nas regiões de repetições seriadas.

Inicialmente pensou-se que a presença de deleções nas regiões de repetições poderia ser resultante da heterogeneidade da população de parasitas da qual o DNA foi obtido. Dessa forma, alguns parasitas poderiam ter originalmente um número menor de repetições seriadas em cada gene. Outra hipótese é a de que as deleções seriam um artefato originado durante a replicação do fago na bactéria hospedeira. Essa hipótese foi confirmada por cultivos seriados dos fagos recombinantes BGE2 e BGE7 e posteriores digestões de seu DNA. Foi possível observar que bandas contendo as repetições seriadas diminuíam progressivamente de tamanho, indicando um processo de deleção por artefato de recombinação (dados não mostrados).

A explicação técnica para esse problema pode ser encontrada nas características genéticas do sistema fago λ EMBL3 e hospedeira Q358 (Frischauf *et al.*, 1987). Esse vetor de substituição, derivado do λ 1059 (Karn *et al.*, 1980), apresenta em seu fragmento central os genes *red* e *gam*. Esses genes conferem ao fago o fenótipo *Spi* (sensível à interferência do fago P2), uma vez que impedem o crescimento do vetor em hospedeiras lisogênicas de P2. A vantagem desse sistema é o enriquecimento relativo da população de fagos recombinantes, os quais não contêm o fragmento central. Contudo, a replicação do fago λ na bactéria se dá inicialmente no modo θ (teta) e, posteriormente, muda para a forma de círculo rolante, de modo a gerar concatâmeros passíveis de empacotamento. Essa transição se dá pela inativação de *Exo V* pelo produto do gene *gam*. Não existindo o gene *gam* nos recombinantes, há uma via alternativa de geração de moléculas concatenadas, através da recombinação de monômeros, mediada por *recA* produzida pela bactéria hospedeira. Há portanto a necessidade de se propagar os vetores recombinantes em hospedeiras *recA* positivas, como a cepa Q358. Uma vez que *recA* está envolvida com processos de recombinação, sequências repetitivas de DNA do inserto estariam mais sujeitas a deleções progressivas e/ou rearranjos genômicos durante o ciclo do vetor na bactéria hospedeira. Como solução a esse problema sugere-se a utilização de uma bactéria *recA*⁻ e *recBC*⁻, contendo um plasmídeo auxiliar que expressa o produto de *gam* (Frischauf *et al.*, 1987).

O problema apresentado acima também foi enfrentado por Macina *et al.* (1989). Esses autores relataram a impossibilidade de obter clones inteiros de *T. cruzi*, contendo as regiões repetitivas e flanqueadoras, em *E. coli recA*. Uma vez que não dispúnhamos nem do plasmídeo auxiliar, nem de uma hospedeira *recA*⁻ e *recBC*⁻, e nossa biblioteca tinha sido construída em λ EMBL3, decidiu-se elucidar todo o mapa de restrição com os clones BGE7 e BGE14 parcialmente deletados, e os clones BGE2 e BGE9 íntegros. Para garantir a confiabilidade do mapa de restrição da região de 32 kb, os resultados foram confrontados com um Southern blot feito com o DNA de *T. cruzi* (Figura 9). Os resultados obtidos confirmaram a proximidade física dos genes B12 e B13, bem como o tamanho dos fragmentos homólogos aos clones B12 e B13 contendo as repetições.

Ao longo do trabalho, outro artefato de recombinação foi observado no sistema M13/JM101. O fragmento B4H5 (ver Figura 8), clonado em M13mp19, foi tratado segundo o protocolo de Henikoff (1987). Após a transfecção das reações na hospedeira JM101, foram obtidos clones deletados. Procedeu-se então ao seqüenciamento de alguns desses clones, utilizando-se o fragmento Klenow da *E. coli* DNA polimerase I (como descrito no item 2.25.2.2), objetivando a seleção daqueles com regiões de sobreposição. Os resultados, entretanto, demonstraram que a seqüência nucleotídica desses clones estava alterada em relação àquela que havia sido previamente determinada a partir de ssDNA obtido das placas de fagos. Quando se procedeu ao seqüenciamento do DNA da forma replicativa não submetida ao tratamento com Exonuclease III os resultados encontrados foram os mesmos. Esse fato indica que estas alterações devem ter ocorrido durante a etapa de propagação dos fagos para a preparação em larga escala de DNA da forma replicativa. A seqüência nucleotídica indicou a presença de deleções e inversões, impedindo a obtenção de dados confiáveis. Eventos semelhantes foram verificados no DNA da forma replicativa do fragmento E2E3 em uma das orientações, mas não na outra. Problemas de recombinação são freqüentemente citados na literatura como causa de insucesso no uso de fagos filamentosos para seqüenciamento de DNA (Sambrook *et al.*, 1989; Tripathi, 1992; Wang & Sodja, 1991). É interessante verificar que os fragmentos B4H5 e E2E3 apresentam longos segmentos de timinas (ver Figuras 12 e 14), o que poderia levar à formação de estruturas propícias a eventos de recombinação. A utilização de cepas *recA*⁻ é sugerida para reduzir a possibilidade desses eventos, assim como a clonagem de fragmentos de pequeno tamanho em M13. Foi tentada então a infecção da hospedeira JM109 com os fagos derivados das placas originais (sabidamente não deletados). Entretanto, o rendimento de fagos obtido nessa hospedeira foi extremamente baixo, inviabilizando seu uso. Decidiu-se então subclonar todos os fragmentos destinados ao seqüenciamento no vetor pBluescript® e não utilizar mais o sistema M13, visto que não apresenta suficiente estabilidade com nossas seqüências.

4.6 Caracterização dos genes B12 e B13

Os clones genômicos BGE2, BGE7, BGE9 e BGE14, isolados da biblioteca de *T. cruzi* no vetor λ EMBL3, tiveram seus mapas de restrição determinados. A sobreposição dos respectivos mapas permitiu definir uma região de 32 kb do genoma de *T. cruzi*. Surpreendentemente foi verificado que os respectivos genes B12 e B13 estão fisicamente muito próximos um do outro. De fato, a partir de dados de Southern blots hibridizados com B12 e B13, foi possível determinar que a distância entre os dois genes era inferior a 2,4 kb (ver Figura 8). A proximidade física dos dois genes foi confirmada por Southern blots utilizando DNA genômico do parasita (Figura 9). Através do seqüenciamento completo do

gene B12 e da região 5' terminal do gene B13 (Figura 12), foi possível verificar que a distância entre as regiões codificadoras é de somente 1,5 kb. É interessante comentar que a abordagem utilizada para a clonagem de B12 e B13 não favorecia a obtenção de seqüências fisicamente relacionadas. A razão pela qual dois genes tão próximos tenham sido isolados, utilizando como sonda um soro policlonal, permanece uma incógnita. A probabilidade, ao acaso, da ocorrência de tal evento é tão baixa que gera uma indagação: será que genes com funções relacionadas, no caso antígenos, teriam *loci* próximos e até mesmo relacionados via transcritos policistrônicos? Será interessante no futuro fazer um mapeamento do genoma de *T. cruzi* utilizando como sondas as diferentes seqüências já caracterizadas, comparando suas funções e localizações cromossômicas. Tal estudo deveria, obviamente, ser feito em um clone definido. Nesta direção, o clone CL Brener, foi escolhido no Projeto Genoma de *T. cruzi* e deverá ser caracterizado, podendo fornecer esclarecimentos para essa indagação (Zingales *et al.*, 1994; Levin *et al.*, 1994).

Henriksson *et al.* (1990) determinaram o mapa de restrição de uma região que contém um gene homólogo a B13, isolado da cepa CA-1 de *T. cruzi*. A comparação desse mapa com aquele determinado em nosso laboratório mostra uma similaridade bastante alta, porém o número de sítios de cada enzima é menor no mapa desses autores. Essa diferença pode ser devida a variações entre as cepas Y e CA-1. Outra possibilidade é de que o mapa de restrição de Henriksson *et al.* (1990), por ter sido determinado a partir de digestões de DNA total do parasita, não apresente a mesma resolução conseguida a partir de fragmentos de DNA clonados. A probabilidade de não detectar-se um sítio, principalmente quando ele está próximo de um outro, é muito maior quando se trabalha com DNA genômico total e com genes de cópia única.

A partir dos resultados do seqüenciamento do gene B12 (Figura 12) e da extremidade 5' terminal de B13 (Figura 16) foi possível verificar que a orientação de transcrição é a mesma para ambos os genes (ver também Figura 8). Essa orientação foi determinada a partir das ORFs nas seqüências e a partir da codificação das repetições dos insertos B12 e B13. Uma demonstração direta, contudo, poderia ser obtida mediante a hibridização de um Northern blot com sondas feitas por "primer extension" de cada uma das fitas de B12 e B13. A proximidade física (1,5 kb) das ORFs de B12 e B13 (Figuras 12 e 16), aliada ao fato de a transcrição dos genes ocorrer na mesma orientação, abre a possibilidade da existência de um transcrito comum policistrônico.

Em Northern blot hibridizado com as sondas B12 e B13 (Figura 4) não se observa a presença de nenhuma banda de alto peso molecular comum aos dois genes. O mesmo resultado se verifica quando são utilizadas como sondas os DNA dos clones genômicos BGE2, 7, 9 e 14 (consulte Figura 8). Na Figura 18 observa-se que as sondas BGE7 (tira *b*) e BGE9 (tira *c*) apresentam uma fraca hibridização com espécies de alto peso molecular. Entretanto, o mesmo padrão é observado quando se utiliza como sonda o fragmento SE1

(tira e), levando à conclusão que esse resultado não pode ser atribuído a um mRNA policistrônico dos genes B12 e B13. É interessante frisar que esses clones genômicos contêm a região intergênica, que deveria necessariamente fazer parte de um hipotético transcrito policistrônico. Mesmo em ensaios de Northern blots hibridizados com sondas feitas somente dos fragmentos E2E3 e B4H5 (consulte Figura 8) os resultados obtidos foram os mesmos (não mostrados). A hibridização observada na faixa de 1,66 a 2,4 kb (observada com os clones genômicos e com os fragmentos E2E3 e B4H5) corresponde às espécies de rRNA de *T. cruzi* e parece ter um caráter inespecífico. Na verdade, devido ao fato da região intergênica ser muito rica em timinas (ver Figuras 12 e 16), esta poderia hibridizar com rRNAs, que sabidamente apresentam uma elevada constituição de trechos ricos em adeninas (Arruda *et al.*, 1990).

A despeito desses resultados, a hipótese de que B12 e B13 sejam transcritos em um mRNA policistrônico de alto peso molecular, com vida média extremamente curta, não pode ser descartada. Esse transcrito, uma vez processado, poderia dar origem às diferentes espécies de RNAs visualizadas (Figura 4). Um ensaio mais sensível, capaz de detectar a presença de um transcrito policistrônico, seria o "run-on" com núcleos isolados e marcados com [α - 32 P]UTP. O RNA nuclear nascente e radioativo seria usado como sonda em dot-blot ou Southern blot para mapear as regiões transcritas. Como o RNA testado é nuclear e nascente, as regiões passíveis de processamento pós-transcricional estariam preservadas e representadas na amostra. Esse ensaio deverá ser conduzido futuramente.

A existência de transcritos policistrônicos têm sido demonstrada em vários membros da ordem Kinetoplastida. González *et al.* (1985) relataram a presença em *T. cruzi* de uma unidade multigênica denominada IF8, constituída de 20 cópias seriadas e que, em Northern blot, revelou multímeros de precursores parcialmente processados. Em *T. brucei* foi relatada a presença de transcritos poligênicos, contendo pelo menos dois cistrons do aglomerado de genes que expressam calmodulina. Os genes de tubulina de *T. brucei* também estão arranjados em aglomerados, contendo unidades alternadas de genes de α - e β -tubulina. Imboden *et al.* (1987) demonstraram por meio de um ensaio de "run-on" a existência de transcritos poligênicos contendo os dois genes bem como a região intergênica. Posteriormente foi verificado que o choque térmico era capaz de interromper a maquinaria responsável pelo "trans-splicing", levando ao acúmulo desses transcritos precursores (Muhich *et al.*, 1988). O aumento da concentração no estado estacionário de transcritos policistrônicos de tubulina é mais acentuada à temperatura de 42,5°C (Muhich *et al.*, 1989). A detecção de transcritos poligênicos de tubulina também foi reportada em *T. cruzi* (Soares *et al.*, 1989). É possível que os transcritos policistrônicos não constituam a regra, entretanto têm sido cada vez mais detectados em diferentes organismos da ordem Kinetoplastida e famílias de genes. Em tripanossomatídios, a obtenção de mRNAs maduros ocorre por "trans-splicing", através da clivagem do mRNA precursor e da adição da seqüência líder

(mini-exon) a cada um dos cistrons constituintes (De Lange *et al.*, 1984b). A ocorrência de "splicing" alternativo, via "cis-splicing", observado em outros eucariotos, ainda não foi verificada em membros da ordem Kinetoplastida. Entretanto, observou-se que o "trans-splicing" também pode adquirir vias alternativas e hierárquicas (Revelard *et al.*, 1993), dependendo principalmente da composição da região rica em polipirimidinas localizada diretamente a montante do sítio acceptor de "splicing" (Layden & Eisen, 1988; Huang & Van der Ploeg, 1991; Matthews *et al.*, 1994).

Os resultados de Southern blot de DNA de *T. cruzi*, digerido com várias enzimas, sugerem que os genes B12 e B13 apresentam somente uma cópia por genoma haplóide (ver Figura 2). Na digestão com *SalI*, podem ser vistas várias bandas de hibridização com B12, mas elas se devem à existência de três sítios internos de *SalI* no gene, conforme foi demonstrado pelo mapa de restrição (Figura 8) e seqüenciamento completo do gene (Figura 12). O fato de não haver outras bandas de hibridização indica que não há outras cópias desse gene dispersas pelo genoma do parasita. A hipótese de haver um aglomerado de cópias seriadas não é compatível com o mapa de restrição da região de 32 kb (Figura 8). Esse mapa, que inclui o gene B12 e regiões flanqueadoras maiores do que 10 kb, mostra não haver outra cópia do gene B12. A dupla de bandas observada na região de 9,4 kb (ver digestão com *SalI* - Figura 2) corresponde ao fragmento S5S6 (consultar o mapa de restrição da Figura 8), que contém parte dos genes B12 e B13. As duas bandas possivelmente se originam de dois alelos distintos que apresentam um número diferente de repetições seriadas, conforme foi observado por Henriksson *et al.* (1990) para um gene homólogo de B13 (ver discussão abaixo).

No caso de B13 observa-se hibridização com uma dupla de bandas em quatro das enzimas testadas (Figura 2). Henriksson *et al.* (1990) também obtiveram um padrão de duas bandas para um gene homólogo a B13, utilizando digestões duplas e simples com várias enzimas. Quando esses autores fizeram um ensaio de Southern blot a partir de uma eletroforese de campo pulsado, também observaram hibridização com duas bandas, indicando a presença do gene em dois cromossomos distintos. Henriksson *et al.* (1990) submeteram então o DNA de *T. cruzi* a uma eletroforese de campo pulsado na primeira dimensão, seguida de uma clivagem com *HindIII* e uma eletroforese convencional na segunda dimensão. Esse experimento permitiu demonstrar que a dupla de bandas, observada em digestões com enzimas de restrição, era originária de cromossomos distintos. A partir da comparação dos mapas de restrição dos dois cromossomos os autores concluíram que essas bandas representam diferentes alelos do mesmo gene, os quais diferem entre si pelo número de repetições seriadas. As bandas observadas em campo pulsado representariam, portanto, cromossomos homólogos segundo a definição clássica.

Em nosso caso, uma digestão de DNA de *T. cruzi* com *HindIII* gera bandas de 4,2 e 3,5 kb (ver Figura 2). O clone BGE 2, quando digerido com essa enzima, apresenta uma

banda de 3,5 kb, correspondendo ao alelo com menor número de repetições seriadas. Os clones BGE 7 e BGE 14 apresentam deleções nas regiões homólogas às repetições seriadas, sendo assim impossível determinar de qual alelo derivam. Southern blots de DNA de *T. cruzi*, hibridizados com a sonda B12, mostram uma banda (ou duas bandas de tamanho muito próximo), o que sugere que, provavelmente, os dois alelos desse gene devam apresentar um número semelhante de repetições seriadas. Em vista disso, não sabemos a qual dos alelos correspondem os respectivos clones BGE2, BGE7, BGE9 e BGE14. Desta forma, o mapa de restrição da região de 32 kb poderia representar uma quimera dos dois alelos. O gene B13, assim como já foi observado para B12, parece ter apenas uma cópia por genoma haplóide. Essa conclusão se baseia não somente nos resultados de Southern blot genômico (Figura 2), como também no mapa de restrição de uma região de 32 kb (Figura 8).

A eletroforese de campo pulsado, seguida de Southern blot (Figura 24), demonstrou que os genes B12 e B13 estão presentes em um único cromossomo por genoma haplóide. O fato de as duas sondas hibridizarem com o mesmo cromossomo confirma a proximidade física desses dois genes, conforme demonstrado no mapa de restrição (Figura 8). O fato de não se observar a hibridização em uma dupla de cromossomos, como relatado por Henriksson *et al.* (1990), parece indicar que as variações entre os supostos cromossomos homólogos na cepa Y é menor do que o observado na cepa CA-1. Outra possibilidade é de que as condições utilizadas na eletroforese de campo pulsado não tenham permitido resolver eficientemente cromossomos pertencentes à mesma faixa de peso molecular.

Um fato interessante, relacionado a B12 e B13, diz respeito à localização e arranjo dos respectivos genes no genoma e cromossomos de distintas cepas. Conforme pode ser visto na Figura 3, há uma variação, no tamanho das bandas observadas em Southern blots de DNAs das cepas Y e CL. Esta variabilidade também se observa a nível dos cromossomos. De fato, a Figura 24 indica que as sondas B12 e B13 hibridizam com um único cromossomo de 1,26 Mb na cepa CL, 1,41 Mb na cepa Y e 0,98 Mb na cepa G. Utilizando um gene homólogo a B13, Henriksson *et al.* (1990) relataram pesos moleculares de 1,01/1,02 Mb nas cepas T₀ e CA-1/72, 1,3 Mb na cepa T₂, 1,07 Mb na cepa RA e 0,98/1,01 Mb na cepa Dm 28c. Há, portanto, uma boa concordância entre os nossos resultados e aqueles obtidos por esses autores, tanto em relação à ocorrência de variabilidade entre cepas, como também quanto à faixa de tamanho do cromossomo que contém o gene B13.

A heterogeneidade cariotípica entre diferentes cepas de *T. cruzi* e mesmo entre diferentes isolados de uma mesma cepa já foi observada em géis de campo pulsado hibridizados com sondas de diferentes genes (Engman *et al.*, 1987; Aymerich *et al.*, 1989). Não foram detectadas variações após a diferenciação da forma epimastigota para o tripomastigota metacíclico (Aymerich *et al.* 1989). O genoma de tripanossomatídeos apresenta uma plasticidade muito grande, com grande tolerância para suportar alterações no número e tamanho dos seus cromossomos. Uma demonstração notável desse

plasticidade foi obtida após tentativas de duplo "nocaute" do gene da diidrofolato redutase-timidilato sintase de *Leishmania major*, um gene essencial desse parasita. As linhagens duplo-mutantes obtidas demonstraram alterações no seu genoma, apresentando eventos de tetraploidia e aneuploidia (Cruz *et al.*, 1993). Essa alta plasticidade e heterogeneidade talvez seja decorrente do fato de não existir ou não ser freqüente a reprodução sexuada nesses parasitas (Vickerman, 1986). Dessa forma, as populações do parasita, ao invés de uma estrutura sexual, seriam preferencialmente multiclonais (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc & Ayala, 1987). Dentro dessa perspectiva, a obtenção de mapas de "linkage" de diferentes genes em várias cepas seria muito interessante. Esses dados poderiam auxiliar o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes cepas, da organização do genoma do parasita e da geração dessa heterogeneidade. Nesse sentido, a caracterização dos genes B12 e B13 e a comprovação de que estão fisicamente ligados oferece um caminho importante de investigação. Desta forma, seria interessante, por exemplo, verificar se existem cepas nas quais esses genes estão presentes em cromossomos distintos. Além disso, sendo genes de cópia única e presentes em um único cromossomo, poderiam ser usados como marcadores genéticos em estudos de cariotipagem do *T. cruzi* e estabelecimento de mapas de "linkage".

4.7. Análise das seqüências nucleotídicas e protéicas de B12 e B13

4.7.1. Seqüências relacionadas com o gene B12

Na Figura 12 pode ser vista a seqüência nucleotídica do gene B12. Na posição 372 inicia-se uma ORF que se estende até a posição 6.714, onde há um códon de terminação TGA. Com a finalidade de avaliar-se se essa ORF coincide com a predição de uma região supostamente codificadora de proteínas, analisou-se a seqüência nucleotídica no programa CODONPREFERENCE, do pacote de análise de seqüências GCG (Devereux *et al.*, 1984). Esse programa tenta reconhecer seqüências codificadoras de proteínas em virtude da similaridade de seu uso de códons, em comparação com uma tabela de freqüência de utilização de códons. Além disso, esse programa também considera a tendência ("bias") da composição (geralmente GC) na terceira posição de cada códon. A análise é feita individualmente para cada passo de leitura. Os resultados dessa análise (não mostrados) demonstraram haver um claro aumento na preferência do uso de códons e da tendência GC da terceira posição a partir da posição 450. Há portanto uma relativa coincidência dessa análise com a ORF prevista pelo ATG da posição 372. Um aspecto negativo da análise da utilização de códons é que ela foi realizada com uma tabela de uso de códons de *E. coli*. Não existe até o momento uma tabela análoga para *T. cruzi* depositada na base de dados CUTG (tabela de freqüência de códons do GenBank - Wada *et al.*, 1992), em formato

apropriado para a análise pelo GCG. A tabela do organismo filogeneticamente mais próximo é a de *T. brucei* (Parsons *et al.*, 1991), no entanto, a utilização de códons para esse parasita é bastante diferente daquela encontrada em *T. cruzi* (Musto *et al.*, 1994). Embora já tenham sido determinadas tabelas de frequência de uso de códons para *T. cruzi* (Alonso *et al.*, 1992; Musto *et al.*, 1994), elas não podem ser utilizadas pelo programa CODONPREFERENCE pelo fato dos artigos não apresentarem todas as informações necessárias. Quando estas tabelas estiverem apresentadas no formato adequado, a análise acima poderá ser feita com maior grau de confiabilidade.

Outra análise da sequência de B12 foi feita com o programa TESTCODE, que também ajuda a identificar sequências codificadoras de proteínas. Esse programa faz uma análise estatística da sequência em função da não randomicidade da composição de cada terceira base. Sequências não codificadoras devem apresentar uma maior randomicidade de composição da terceira base do que as codificadoras. Sua vantagem é não ter que utilizar tabelas de frequência de códons. No caso do gene B12 foi observada uma boa correlação entre a predição feita pelo programa e a ORF determinada pela sequência nucleotídica (dados não mostrados).

Com relação ao códon de iniciação, procedeu-se a uma análise baseada no modelo de varredura de Kozak (1989). Segundo esse modelo, a subunidade 40S do ribossomo de eucariotos se ligaria inicialmente à extremidade 5' terminal do mRNA e então migraria até atingir o primeiro ATG, posicionado em contexto favorável. A análise de 699 mRNAs de vertebrados (Kozak, 1984, 1989) resultou na sequência consenso GCCGCC(A/G)CCAUGGA, relacionada com um contexto favorável de iniciação da tradução. A região do suposto códon de iniciação na posição 372 (Figura 12) apresenta a sequência AGGUUAGUAAUGC. Essa sequência tem homologia muito baixa com o consenso. Contudo, na sequência obtida observa-se uma purina (G) na posição -3, sendo que esse é o nucleotídeo mais conservado em mRNAs de eucariotos, incluindo vertebrados, plantas e fungos (Kozak, 1989). Cavener & Ray (1991) ampliaram os estudos acerca das sequências flanqueadoras do sítio de iniciação incluindo 112 sequências de protozoários. O consenso encontrado foi uuuaauaaAAAUGac (as letras maiúsculas representam os consensos superiores a 50%), que apresenta homologia ainda menor do que o de Kozak (1989) com o sítio de iniciação de B12. Em relação a essas sequências consenso é preciso levar em conta a grande diversidade existente entre os organismos e, mesmo entre os mRNAs de eucariotos superiores, há casos em que a sequência observada é bastante diferente do consenso proposto (*cf.* Kozak, 1984). Cavener & Ray (1991) exemplificam que de um total de 2.595 sequências de mRNA analisadas, somente 3% apresentavam o consenso CC(A/G)CCAUGG e 0,2% o consenso GCCGCC(A/G)CCAUGG. Segundo esses autores, o consenso de Kozak (1989) é estatístico e leva em consideração um nível máximo de transcrição. Entretanto, nem sempre o nível máximo é também o nível ótimo *in vivo*, ou seja, a predição do códon de iniciação não pode

ser baseada somente em um consenso estatístico, mas também em aspectos funcionais. Em nossa opinião, o que torna essa análise problemática em eucariotos é a falta de conhecimento a respeito das interações entre o ribossomo e o mRNA. Não existe, por exemplo, a descrição de uma sequência semelhante à de Shine-Dalgarno, como ocorre em procariotos. Além disso, dadas as peculiaridades dos membros da ordem Kinetoplastida, serão necessários estudos mais específicos em tripanossomatídios para que se possa avaliar a validade do uso dessas sequências consenso na predição do códon de iniciação.

A existência de uma região rica em pirimidinas a montante ("upstream") do sítio 3' acceptor do mRNA parece ser um fator importante para a eficiência do processo de "trans-splicing". Layden & Eisen (1988) demonstraram em *Trypanosoma equiperdum* que o "trans-splicing" pode ocorrer em vários sítios, mas os preferenciais seriam aqueles contendo uma região a montante ("upstream") rica em pirimidinas. Além disso, os autores propuseram uma sequência consenso (5' UACCAAU 3') em mRNAs de tripanossomatídios, a qual seria complementar ao medRNA (RNA doador do mini-exon). Huang & Van der Ploeg (1991) também demonstraram a importância da região de polipirimidinas utilizando um sistema de transfecção transiente e de expressão do gene CAT (cloranfenicol acetil transferase) em *T. brucei*. Foi verificado que a substituição de pirimidinas, especialmente na região -30 a -10 do sítio de "splicing", levava a uma redução drástica da expressão de CAT. Esses autores definiram a região de polipirimidina como uma sequência localizada imediatamente a montante do sítio acceptor de "splicing" (AG), entre as posições -80 e -1. Essa região deve conter um mínimo de 5 pirimidinas consecutivas e interrompidas por não mais do que 22% de purinas. Curotto de Lafaille *et al.* (1992) demonstraram em *Leishmania enrietti* que, em transfecção estável extracromossômica, a produção de mRNA de CAT era dependente de uma região intergênica a montante do gene de tubulina. Essa região podia ser substituída por um fragmento deletado contendo o sítio de "splicing" e uma região de polipirimidina adjacente, ou mesmo por um fragmento sintético contendo uma região de polipirimidina e um sítio de "splicing".

Recentemente foi verificada uma relação funcional e temporal entre os eventos de "trans-splicing" e poliadenilação de mRNAs. LeBowitz *et al.* (1993) propuseram em *Leishmania* um mecanismo de varredura na seleção do sítio de poliadenilação, assumindo um acoplamento dos processos de "trans-splicing" e poliadenilação. O reconhecimento do sítio acceptor de "splicing" determinaria também o sítio de poliadenilação do mRNA a montante. Matthews *et al.* (1994) fizeram substituições de blocos na região intergênica entre os cistrons de α - e β -tubulina e testaram os efeitos utilizando vetores que expressam mRNAs bicistrônicos. Foi verificado que regiões ricas em pirimidinas a montante do sítio 3' de "splicing" do gene de α -tubulina são requeridas na identificação desse sítio de "splicing", bem como na seleção do sítio de poliadenilação do gene de β -tubulina. A remoção dessa região de polipirimidinas pode levar à formação de mRNAs aberrantes com a utilização de

sítios críticos de poliadenilação. As regiões de polipirimidinas poderiam ser bifuncionais, atuando em um sistema acoplado de "*trans*-splicing" e poliadenilação (LeBowitz *et al.*, 1993) ou serem pontos de ligação para algum fator comum aos dois processos. O possível acoplamento entre esses processos e o papel exercido pela região de polipirimidinas abre uma nova perspectiva para o estudo das regiões intergênicas, conforme salientaram Schürch *et al.* (1994):

"O achado de que a poliadenilação em tripanossomas é ditada por seqüências a juzante coloca as regiões intergênicas em uma nova luz. Elas não deveriam mais ser consideradas inertes e, portanto, seqüências espaçadoras dispensáveis entre genes adjacentes mas sim, ser exploradas quanto à presença de elementos que podem regular a expressão gênica".

Examinando a seqüência do gene B12 (Figura 12) observa-se a presença de uma região de polipirimidinas a montante do códon de iniciação, entre as posições 299 e 308. Essa região é constituída de 10 pirimidinas. Se considerarmos uma região mais extensa, das posições 299 a 328, teríamos um total de 30 bases com uma composição de 70% de pirimidinas. Essas regiões definiriam dois possíveis sítios aceptores de "splicing" nas posições 317 ou 330. Experimentos de "primer extension" e ensaios de proteção à digestão por Nuclease S1 poderiam ajudar a determinar o sítio de "*trans*-splicing". Outra possibilidade é a realização de uma reação de PCR em mRNA poli(A⁺) de *T. cruzi*, utilizando como iniciadores a seqüência do mini-exon de *T. cruzi* e a seqüência complementar da região 5' terminal do gene B12. O fragmento resultante poderia ser clonado e seqüenciado, evidenciando a posição do sítio acceptor de "*trans*-splicing". A seqüência a juzante do códon de terminação do gene B12 apresenta nas posições 6.978 a 6.983 (Figura 12) a seqüência AAUAAA, idêntica à seqüência consenso para sítios de poliadenilação em eucariotos (Proudfoot *et al.*, 1991), embora essa característica não tenha sido definida para *T. cruzi* (Zwierzynski *et al.*, 1989). Na verdade, conforme foi discutido acima, a definição do sítio de poliadenilação em tripanossomatídeos estaria relacionada com a presença de regiões de polipirimidinas a juzante da região codificadora. A região intergênica de B12 e B13 apresenta, de fato, 6 regiões de polipirimidinas (ver Figuras 12 e 16).

Um aspecto interessante da seqüência do gene B12 é a existência de 4 blocos com um número variável de repetições seriadas de 60 pb (Figura 12). Nas seqüências já publicadas, incluindo a de um gene homólogo a B13 (Buschiazzo *et al.*, 1992), os genes de *T. cruzi* geralmente apresentam repetições seriadas, mas contidas em um único bloco. Em B12, os blocos de repetições seriadas de 60 pb são intercalados por uma seqüência de 519 pb, a qual ocorre de maneira totalmente conservada por três vezes ao longo do gene (Figura 12 - posições 690-1.208; 2.538-3.056; 3.195-3.713). Essa seqüência será denominada repetição maior ou repetição de 173 aminoácidos, quando relacionada à seqüência protéica.

A presença de vários blocos de repetições seriadas, aliada à existência de dois tipos de repetições no mesmo gene, torna a estrutura do gene B12 peculiar, principalmente considerando que não há homologia entre as seqüências das repetições de 60 pb e de 519 pb. Embora já tenha sido evidenciada a presença de mais de um tipo de repetição em um mesmo gene de *Plasmodium*, estas repetições apresentam uma alta homologia entre si (Di Giovanni *et al.*, 1990). Por outro lado, a proteína KAP de *T. cruzi* (González *et al.*, 1990) apresenta vários blocos de repetições seriadas, que estão separados por pequenos trechos compostos principalmente de repetições degeneradas.

As repetições seriadas de 60 pb não são totalmente conservadas, apresentando microheterogeneidades. Considerando as seqüências do clone B12 (Figura 1) e de seu respectivo gene (Figura 12) foram observadas mutações em 12 dos 20 códons que compõem cada repetição seriada. Em quatro desses códons foi encontrada mais de uma variação possível. Do total de 28 variações de códons encontradas, 26 ocorrem por substituições simples e somente três apresentam substituições de 2 bases. Em 16 das 26 variações observadas as mutações ocorrem na terceira base e não alteram a codificação. Nas 10 mutações em que há substituição do aminoácido, somente 4 apresentam variações quanto à natureza do grupo radical. Esse resultado indica que, a despeito de uma certa flexibilidade da seqüência nucleotídica, há uma alta conservação das repetições seriadas na estrutura protéica.

Essa estrutura gênica altamente repetitiva pode ter se originado de eventos sucessivos de recombinação entre dois cromossomos homólogos, em um processo semelhante ao que ocorre na meiose de eucariotos superiores. A origem da primeira duplicação poderia se dar em consequência de reajustamentos erráticos de cromossomos que sofreram quebras em mais de um ponto. A seguir uma sucessão de "crossing-over" desiguais entre cromossomos homólogos poderia levar a um processo dinâmico de aumento ou diminuição do número de repetições (Lewin, 1994; Alberts *et al.*, 1989). Tal comportamento seria bastante semelhante ao verificado em DNA satélite e estaria de acordo com os resultados de Macina *et al.* (1989), que observaram uma variação do número de repetições seriadas de um mesmo gene entre diferentes cepas de *T. cruzi*, e os de Henriksson *et al.* (1990), que obtiveram resultados semelhantes comparando dois supostos alelos de um gene homólogo a B13. Outro mecanismo possível seria o aumento gradativo do número de repetições seriadas por eventos de replicação saltatória (Lewin, 1994). É possível que ambos os mecanismos tenham tomado parte no processo evolutivo do gene B12. Nesse caso, eventos de replicação saltatória e/ou "crossing-over" desiguais poderiam ter originado um bloco de repetições de 60 pb adjacente à região da repetição de 519 pb. Em seguida, os blocos de repetições de 60 pb, em conjunto com a repetição de 519, poderiam ter sido duplicados por um "crossing-over" desigual, gerando domínios alternados de repetições de 60 pb e de 519 pb.

A estrutura da proteína B12, esquematizada na Figura 13, permite verificar a presença de domínios amino- e carboxi-terminais de 36 e 198 aminoácidos, respectivamente. Internamente há 4 blocos com um número variável de repetições seriadas de 20 aminoácidos, intercalados por 3 repetições de 173 aminoácidos. Conforme discutido acima, as repetições seriadas, a nível protéico são bastante conservadas, embora apresentem microheterogeneidades. Por outro lado, as três repetições de 173 aminoácidos são perfeitamente conservadas e, interessantemente, apresentam no seu próprio interior mais duas repetições de 36 aminoácidos com 75% de identidade. Abaixo está apresentado o alinhamento dessas repetições internas, onde a numeração corresponde às posições relativas em uma escala de 1 a 173 aminoácidos:

```

17 WKCSRCGKAKDLSGEHLKNKTEVRSDCWPCARKSTF 52
   |||  ||| | | ||||  ||||| ||||| | ||
128 WRCRVCDKVKPLAGQHLSGKTEVRSDCWPCAARKTF 163

```

Além desse aspecto interessante, as repetições de 173 aminoácidos apresentam o motivo GQHLSGKT, que é compatível com a sequência consenso A do sítio de ligação de ATP/GTP (Walker *et. al.* 1982). Esse motivo, também chamado alça P (Saraste *et al.*, 1990), é representado pela sequência (A,G)x4GK(S,T) e está presente em várias proteínas ligantes de GTP e ATP, como quinases, ATP sintase, cadeias pesadas de miosina e quinesina, entre outras. Essa sequência forma uma alça entre regiões de α -hélice e folha β -pregueada na qual ocorre a interação com um dos grupos fosfato do nucleotídeo. Algumas proteínas como quimotripsina, apesar de não ligarem-se a um nucleotídeo, apresentam esse motivo (Fonte: PROSITE - Dicionário de sítios e padrões de proteínas - versão Outubro 1993). O significado biológico desse achado na proteína B12 é desconhecido, uma vez que a análise da estrutura secundária, nas regiões flangeadoras a esse motivo, demonstrou que esta alça P é flanqueada por uma região de α -hélice, mas não de folha β -pregueada (ver Figura 15A, posição 270). Além disso, outros sítios relacionados com a ligação de adenina ou de guanina dos nucleotídeos, bem como sítios de ligação para os outros fosfatos não foram detectados na sequência de B12.

Com relação às repetições seriadas de 20 aminoácidos, há uma alta frequência de prolínas, que perfazem 20% da composição de aminoácidos desse domínio. A ocorrência de quatro prolínas a cada repetição resulta na formação concomitante de quatro dobras por repetição (ver Figuras 15A e 15B). Como consequência, os domínios dessas repetições não apresentam uma estrutura secundária definida.

Uma questão que surge com relação à estrutura primária de uma grande parte das proteínas de *T. cruzi* clonadas até hoje diz respeito à ocorrência de repetições seriadas com diferente número de aminoácidos (*cf.* Frasch *et al.*, 1991). Essa característica estrutural também é observada frequentemente em proteínas de outros protozoários como *T. brucei*,

Plasmodium, *Leishmania* e *Toxoplasma*. Como características comuns essas regiões apresentam imunodominância e uma alta composição dos aminoácidos N, A, D, V, P, E, G, Q e S e baixa dos aminoácidos C, M, F, W, Y, I e L (Schofield, 1991). Segundo teoria proposta por este autor, as repetições seriadas poderiam promover ligações cruzadas entre as imunoglobulinas presentes na superfície de células B. Isto representaria um sinal de ativação timo-independente que não induziria a maturação de afinidade e conseqüente formação de memória nos linfócitos B e T. Além disso, as repetições teriam uma estrutura primária adequada à formação de epitopos de células B, favorecendo a hidrofiliidade e conformação adequadas.

Outro aspecto interessante que pode estar relacionado com as repetições imunodominantes seria sua função putativa de supressão da resposta humoral dirigida contra outros domínios funcionalmente importantes na mesma proteína. Dessa forma, as repetições fariam parte de um mecanismo de evasão da resposta imune, denominado supressão epitópica. Os dados obtidos para a enzima *trans*-sialidase de *T. cruzi* corroboram esta hipótese. De fato, essa enzima é composta de um domínio amino-terminal que contém os motivos de neuraminidase bacteriana (Cazzulo & Frasch, 1992) e um domínio carboxi-terminal contendo as repetições seriadas previamente caracterizadas no antígeno SAPA (Pollevick *et al.*, 1991). Foi demonstrado que anticorpos dirigidos contra as repetições seriadas não reduzem as atividades enzimáticas de *trans*-sialidase/neuraminidase de *T. cruzi* (Parodi *et al.*, 1992). Além disso, enquanto o domínio das repetições (SAPA) é majoritariamente reconhecido por soros de pacientes chagásicos, a região amino-terminal que contém o sítio ativo apresenta uma baixa reatividade (Cazzulo & Frasch, 1992). Foi também demonstrado que o domínio das repetições não é necessário para a atividade enzimática, uma vez que um gene no qual foi removida a região 3' terminal (codificadora das repetições seriadas) foi capaz de expressar uma enzima ativa com valores cinéticos semelhantes aos da enzima nativa (Campetella *et al.*, 1994).

A seqüência primária da região amino-terminal da proteína B12 foi analisada quanto à presença de uma seqüência sinal utilizando o programa SIGSEQ, que é baseado no algoritmo de von Heijne (1986) e seqüências consenso obtidas a partir de proteínas de procariotos e eucariotos (von Heijne, 1985). Os sítios de clivagem de peptídio sinal são caracterizados pela presença de uma região N-terminal básica, um segmento central hidrofóbico e um trecho C-terminal polar. Não foi detectada na proteína B12 nenhuma seqüência compatível com a predita para a clivagem do peptídio sinal. A região carboxi-terminal da proteína B12, por sua vez, não apresentou nenhum segmento hidrofóbico semelhante àqueles detectados em proteínas ligadas a âncoras de glicosil-fosfatidilinositol (Cross, 1990; Ferguson & Williams, 1988).

A seqüência da proteína B12 foi analisada pelo programa PEPTIDESTRUCTURE, do pacote de software GCG (Devereux *et al.*, 1984). Esse programa faz predições sobre a

estrutura secundária de seqüências protéicas pelo método de Chou & Fasman (1978); hidrofiliidade segundo Kyte & Doolittle (1982); presença de sítios de glicosilação, entre outras. Os dados calculados por esse programa podem ser utilizados para gerar um gráfico, usando o programa PLOTSTRUCTURE. Conforme explicado no item 3.17.4, a predição foi feita com uma seqüência denominada "B12 curta", que apresenta, respectivamente, um domínio amino-terminal, um domínio com 4 repetições de 20 aminoácidos, uma repetição de 173 aminoácidos, um segundo domínio com 4 repetições de 20 aminoácidos e, finalmente, o domínio carboxi-terminal de 198 aminoácidos. Os resultados da predição estão expostos nas Figuras 15A e 15B. No gráfico de hidrofiliidade se observa que a proteína é predominantemente hidrofílica, embora haja pequenas regiões hidrofóbicas, especialmente nos domínios da repetição de 173 aminoácidos e carboxi-terminal.

A predição de Chou & Fasman (1978) mostra que não há regiões extensas de estrutura secundária definida, como α -hélice ou folha β -pregueada. Na verdade há uma alternância muito grande entre essas formas de estrutura, gerada principalmente pela grande abundância de prolina, que provoca uma elevada incidência de dobras. Os dados de predição devem ser interpretados com cautela, uma vez que a taxa de acertos está ao redor de 50% (Kabsch & Sander, 1983) e não existem dados de cristalografia de proteínas semelhantes para serem confrontados. Três prováveis sítios de glicosilação estão indicados na Figura 15A, correspondendo a seqüências Asn-X-Thr/Ser. Quando a posição X é ocupada por ácido aspártico, triptofano ou prolina, considera-se um sítio fraco de glicosilação. Em outros casos o sítio apresenta uma maior probabilidade de glicosilação. Os sítios de alta probabilidade apresentados correspondem na proteína B12 (Figura 12) às seqüências Asn-Ile-Thr (posições 24-26), Asn-Lys-Thr (posições 141-143) e Asn-Leu-Ser (posições 184-186). Como esses dois últimos sítios estão presentes nos 3 domínios da repetição de 173 aminoácidos (ver Figuras 12 e 13), podemos dizer que existe um total de sete sítios prováveis de glicosilação na proteína B12.

As seqüências protéicas de "B12 curto", assim como de cada um dos domínios isolados, foram utilizadas para uma busca de homologia nos bancos de dados do NCBI. Os domínios amino- e carboxi- terminais não apresentaram resultados significativos, embora tivessem sido detectados blocos de homologia com as proteínas quinesina e filamina, respectivamente. O domínio da repetição de 173 aminoácidos apresentou blocos de homologia com integrinas, proteínas ligantes de DNA e a subunidade pesada da proteína triplet de neurofilamento (NF-H) de rato (Chin & Liem, 1990). As repetições de 60 bp, apresentando 20% de prolina em sua composição, apresentaram homologia com proteínas ricas em prolina, entre elas a subunidade pesada da proteína triplet de neurofilamento (NF-H) de várias espécies (Chin & Liem, 1990; Julien *et al.*, 1988), incluindo o homem (Lees *et al.*, 1988); um antígeno de 85 kDa de *Babesia bovis* (Brown *et al.*, 1993); mucina e proteínas de

parede celular de *Gossypium*. As seqüências dessas proteínas foram recuperadas e comparadas com cada um dos domínios de B12 através de um gráfico de pontos ("dot-plot"). Não foram observados outros blocos de homologia além dos citados acima.

A proteína de neurofilamento, que foi a única a apresentar blocos de homologia com dois domínios diferentes da proteína B12 (Figura 14), apresenta um bloco de repetições seriadas de seis aminácidos (KSPAEA) que, devido à existência de uma prolina, apresenta identidades periódicas com as repetições de 60 pb de B12. A homologia é completada com a presença também periódica de resíduos de serina e de lisina nas repetições de ambas as proteínas. As seqüências de neurofilamento e de B12 foram comparadas com o programa COMPARE e os resultados plotados pelo programa DOTPLOT (do pacote de programas GCG-Devereux *et al.*, 1984), utilizando uma janela de 30 resíduos e uma estringência de 18. Os resultados (não mostrados) demonstraram não haver homologia além dos domínios mencionados acima. Esse resultado parece sugerir que a homologia observada ao nível dos blocos de repetições seriadas das duas proteínas possa não ter relação funcional e ser casual.

Corroborando essa hipótese, observou-se elevada homologia entre a mesma proteína de neurofilamento e os antígenos 13 (Ibañez *et al.*, 1988) e TcD (Burns *et al.*, 1992), ambos clonados de *T. cruzi* e que apresentam repetições seriadas. Essa comparação é mostrada na Figura 25, onde não foi incluída a seqüência de B12 por apresentar maiores divergências, que prejudicariam o alinhamento múltiplo. A homologia observada entre B12, o antígeno 13 e TcD com a proteína de neurofilamento, embora não implique necessariamente em um relacionamento funcional, pode estar associada à indução de uma reação auto-imune. É interessante ressaltar que em outro antígeno de *T. cruzi*, denominado Fl-160, foi relatada a existência de um epítipo de 12 aminoácidos que mimetiza uma proteína de nervo de mamíferos de 48 kDa, diferente da proteína de neurofilamento (Van Voorhis *et al.*, 1989; Van Voorhis *et al.*, 1991). Posteriormente foi demonstrado que proteínas da mesma família multigênica de FL-160 apresentam outro epítipo de reatividade cruzada com nervos, distinto do primeiro (Van Voorhis *et al.*, 1993). Salienta-se que não há homologia entre a seqüência de B12 e Fl-160.

Neste ponto, seria interessante investigar se o antígeno B12 apresenta reatividade cruzada com neurofilamento. Pretende-se no futuro testar se um soro anti-B12 reage com nervos de mamíferos em cortes histológicos e em Western blot. Se os resultados forem positivos, poderá ser feito um mapeamento de epítopos segundo o sistema preconizado por Geysen *et al.* (1987), onde utilizam-se peptídios sintéticos de cerca de 8 resíduos que, sobrepostos, cobrem uma região determinada da proteína. Em ensaios de competição entre os anticorpos e os peptídios frente à proteína, é possível identificar os epítopos de reatividade cruzada. Particularmente com B12, seria interessante testar soros de pacientes chagásicos que apresentam degenerações nervosas, como ocorre nos casos de neuropatia,

Figura 25 - Alinhamento múltiplo, obtido pelo programa Clustal V, entre as seqüências parciais das proteínas de neurofilamento triplet H de rato (PIR - A37221), antígeno 13 (GenBank - M92046) e TcD (GenBank - M82834). Os hífen representam lacunas entre as seqüências alinhadas. Os símbolos abaixo das seqüências representam resíduos idênticos nas três seqüências (*) ou somente em duas (.).

cardiomiopatia, e nas megasíndromes digestivas. A busca e identificação de epitopos de reatividade cruzada entre B12 e neurofilamento deverá ser investigada no futuro.

Uma análise similar, realizada entre a proteína B13 e a cadeia pesada de miosina cardíaca humana, demonstrou a existência de um epitopo de reatividade cruzada entre as duas proteínas. Esse epitopo, caracterizado pela sequência AAALDK na miosina e AAAGDK em B13, é reconhecido majoritariamente por soros de pacientes chagásicos cardiopatas (Cunha-Neto, 1994; Cunha-Neto *et al.*, 1994). O mimetismo antigênico é um aspecto importante na doença de Chagas, que pode estar relacionado com a indução da patogênese resultante de processos autoimunes.

4.7.2. Sequências relacionadas com o gene B13

No item anterior foi discutida a análise da sequência do gene B12, obtida entre os sítios H3 e B4 (consultar Figura 8) e que inclui uma parte da região intergênica entre B12 e B13. A sequência do fragmento B4H5, que representa a continuação dessa região intergênica e a porção 5' terminal do gene B13, pode ser visualizada na Figura 16. Em virtude de ter sido previamente descrita a sequência completa de um gene homólogo a B13 (Buschiazzo *et al.*, 1992), decidiu-se não determinar a sequência nucleotídica da porção 3' do gene B13.

Na posição 544 da região intergênica (Figura 16), existe um códon de terminação TAG, a partir do qual existe um passo de leitura aberto ao longo do fragmento, com possíveis códons de iniciação nas posições 553, 556, 610, 613 e 829. O clone TcCA-2 (Buschiazzo *et al.* 1992), homólogo a B13, apresenta um códon de iniciação equivalente àquele da posição 829. Entretanto, 73 pb a montante, existe um códon de terminação que inviabiliza os demais códons ATG como sítios de iniciação. Comparando nossa sequência com a do clone Tc-CA-2 observa-se uma homologia de 95,5% (Figura 17). Entretanto, a existência de 7 regiões de lacunas entre as duas sequências faz com que, no clone TcCA-2, os ATGs das posições 553, 556, 610 613 estejam em outro passo de leitura. Essa discrepância entre as duas sequências provavelmente se deve às diferentes cepas de *T. cruzi* utilizadas (Y e CA-1). Não sabemos se, no caso do gene B13, os códons a montante do ATG da posição 829 seriam funcionais.

Temos entretanto alguns resultados que, indiretamente, parecem indicar que o sítio de iniciação mais provável seja o da posição 829, mesmo no caso do gene B13. Em primeiro lugar, se admitirmos a funcionalidade dos demais códons de iniciação, teríamos um domínio adicional de cerca de 70 a 90 aminoácidos na proteína B13 em relação àquela caracterizada por Buschiazzo *et al.* (1992). Esse domínio seria extremamente hidrofóbico, contendo longos trechos compostos somente de fenilalaninas, uma vez que esta região do gene é muito rica em timinas. Utilizando os programas CODONPREFERENCE e TESTCODE,

concluiu-se que a probabilidade da região a montante do códon da posição 829 ser codificante seria baixa (dados não mostrados). Além disso, o segmento compreendido entre as posições 684 a 754 é muito rico em pirimidinas e define dois possíveis sítios aceptores de "trans-splicing", nas posições 756 e 761. Como já foi discutido anteriormente, a região de polipirimidina a montante do sítio 3' acceptor é importante para o processo de "trans-splicing" (Huang & Van der Ploeg, 1991). Os códons das posições 610 e 613, por outro lado, não apresentam a montante nenhuma região próxima de polipirimidinas. Já os códons 553 e 554 estão mais próximos de um trecho de pirimidinas (464 a 482).

Outro aspecto interessante quando se alinham as seqüências do fragmento B4H5 e do clone TcCA-2 diz respeito às lacunas. Observando a Figura 17, verifica-se que todas as lacunas entre as duas seqüências ocorrem a montante do códon 829, sendo que quatro delas na região entre as posições 553 e 829. Como essas lacunas alteram o passo de leitura, esse fato sugere que essa região não seria codificadora e, portanto, não estaria sob pressão evolutiva. Por outro lado, a juzante da posição 829 somente são encontradas mutações pontuais de substituição, sem alteração do passo de leitura, sugerindo uma maior pressão evolutiva. Obviamente todas as características apontadas acima não excluem totalmente a possibilidade de os códons a montante da posição 829 serem funcionais. Ensaio de "primer-extension" e de proteção à digestão por nuclease S1 poderiam ajudar a elucidar esse aspecto.

A região do suposto códon de iniciação da posição 829 apresenta a seqüência AUAAUAUGGC. Essa seqüência contém, além de uma purina (A) na posição -3, uma guanina na posição +4 que, segundo Kozak (1989), também é importante para o início da tradução. Esse sítio de iniciação também apresenta uma homologia com o a seqüência consenso uuuaauaaAAAUGac de Cavener & Ray (1991).

As repetições seriadas de B13 (Figura 1), assim como as de B12, apresentam uma alta composição de prolinas, atingindo até três resíduos por repetição (25%). Essa alta porcentagem de prolinas gera uma estrutura retorcida com alta incidência de dobras (dados não mostrados). A seqüência relatada por Buschiazzi *et al.* (1992) para o clone TcCA-2 (homólogo a B13) não mostra a presença de sítios de clivagem de peptídio sinal ou de ancoragem de estruturas de glicosil-fosfatidilinositol. Buscas em bancos de dados, realizadas com a seqüência protéica de B13, e com a seqüência completa relatada por Buschiazzi *et al.* (1992), não resultaram em nenhuma proteína com homologia significativa.

4.8. Caracterização do gene B11 e sua relação com retrotransposons

A determinação do mapa de transcrição da região de 32 kb permitiu identificar um terceiro cistron, denominado B11, distante cerca de 9,5 kb do gene B12. Uma sonda feita a partir do fragmento SE1 (Figura 8) hibridizou com um transcrito de 5.5 kb em ensaios de

Northern blot feitos com RNA total (Figura 18) e fração poli (A)⁺ de formas epimastigotas (dados não mostrados). Futuramente essa análise deverá ser estendida a RNA de tripomastigotas. Foi verificada também uma fraca hibridização com bandas de RNA de alto peso molecular. Esse resultado pode ser atribuído à possível existência de transcritos policistrônicos ou então ser devido a uma hibridização inespecífica.

O gene B11 apresenta um grande número de cópias por genoma, conforme verificado em ensaio de Southern blot (Figura 19). Nessa figura é possível visualizar a presença de múltiplas bandas na maior parte das digestões. Algumas bandas, entretanto, são muito mais intensas e podem representar cópias altamente conservadas, enquanto que as demais representariam cópias contendo polimorfismos nos seus sítios de restrição. É interessante notar que as cópias de B11 não apresentam polimorfismo para a enzima *SacII*, pois somente se observa a hibridização de alta intensidade com uma única banda. A existência de bandas de alta intensidade de hibridização também poderia levar à interpretação de que a maior parte das cópias estivesse arranjada em série. Nesse caso, as bandas fracas corresponderiam a algumas cópias dispersas no genoma do parasita, ou seja, "orphons" (Childs *et al.*, 1981). Entretanto, os dados de Southern blot de um gel de campo pulsado não são totalmente compatíveis com essa hipótese. Conforme se observa na Figura 24, a sonda SE1 hibridiza com a quase totalidade dos cromossomos distinguíveis no gel, em todas as cepas testadas (CL, Y e G). A existência de hibridizações mais intensas em alguns cromossomos, especialmente nas cepas Y e G, sugere que eles podem conter blocos de cópias seriadas desse gene. Entretanto, uma grande proporção das cópias de B11 também estaria dispersa nos demais cromossomos.

Usando o programa FRAMES, que mostra as "open reading frames" (ORFs) nos 6 passos de leitura possíveis, identificou-se uma ORF ao longo de todo o fragmento SE1 na orientação *EcoRI* → *SalI* (dados não mostrados). A direção da transcrição dessa hipotética ORF seria oposta à dos genes B12 e B13 (ver figura 8). A análise com o programa TESTCODE confirmou a existência de uma maior probabilidade de codificação nessa orientação do fragmento. A sequência completa do fragmento SE1 e da suposta ORF estão apresentadas na Figura 20. A análise da sequência protéica de B11 pelo programa PEPTIDESTRUCTURE demonstrou a existência de uma sequência Asn-Val-Ser (posições 43-45), compatível com um sítio de glicosilação. Além disso há uma predominância de blocos de estrutura secundária do tipo folha β -pregueada alternados com dobras (Figura 23).

Quando essa sequência protéica foi comparada com o banco de dados GenBank, foram observados vários blocos de homologia com o produto protéico da ORF1 de TRS-1, um elemento com características de retrotransposon, isolado de *T. brucei* (Murphy *et al.*, 1987). As sequências protéicas de SE1 e TRS-1 foram então alinhadas com o programa BESTFIT, obtendo-se cerca de 30% de identidade e uma homologia de 48% em um total de 252 resíduos de aminoácidos (Figura 21). Quando as respectivas sequências nucleotídicas

foram alinhadas obteve-se uma homologia de 43% (Figura 22). A comparação dos perfis de hidropaticidade das proteínas de SEI e TRS-1 demonstrou semelhanças (dados não mostrados), sugerindo que a homologia observada a nível da estrutura primária das proteínas pode ter também um significado funcional. A proteína codificada pela ORF-1 de TRS-1 apresenta homologia com transcriptases reversas (Murphy *et al.*, 1987). Quando a sequência da proteína foi comparada com o banco de dados PROSITE, nenhum sítio ou padrão específico foi identificado. Vale ressaltar que essa sequência, quando comparada à de TRS-1, não abrange o sítio ativo da transcriptase reversa, que é a região mais conservada. Esse fato explica porque não se encontrou em SEI um motivo relacionado com essa enzima. A existência de retrotransposons em membros da ordem Kinetoplastida têm sido demonstrada desde o início da década 80 (ver Tabela II). Os retrotransposons ou retroposons são elementos não infecciosos de DNA que têm aspectos estruturais (homologia com transcriptases reversas virais) que sugerem que sua transposição ocorra via um intermediário de RNA (*cf.* Boeke & Corces, 1989). A maior parte dos elementos descritos em Kinetoplastida, incluindo o TRS-1, apresenta características estrutural e filogeneticamente semelhantes aos LINEs - Long Interspersed Elements (para revisões consultar: Singer, 1982; Singer & Skowronski, 1985; Fanning & Singer, 1987) descritos em mamíferos (Xiong & Eickbush, 1990). Esses retroposons têm com uma de suas principais características a ausência de LTRs ("long terminal repeats") em suas extremidades.

O elemento TRS-1 (Murphy *et al.*, 1987) apresenta 5,2 kb e é flanqueado em suas extremidades por duas metades de um outro retrotransposon denominado RIME, o qual geralmente está relacionado com genes ribossomais (Hasan *et al.*, 1984). Um elemento análogo a TRS-1 foi também descrito independentemente por Kimmel *et al.* (1987) e denominado "ingi", como referência a um adjetivo de uma língua africana Kiswahili, que significa "muito". O produto protéico da ORF1 é um polipeptídio de 1651 aminoácidos que apresenta em sua porção carboxi-terminal um domínio contendo cinco motivos de "zinc-fingers" (Pays & Murphy, 1987), que representa a região de ligação com o ácido nucleico (Klug & Rhodes, 1987). Ao contrário dos elementos denominados "siteposons" (Aksoy, 1991), TRS-1/ingi estão dispersos no genoma de *T. brucei* e não apresentam sítios específicos de inserção. Os "siteposons" constituem uma família de retroposons isolados em *T. brucei* (elemento MAE - Carrington *et al.*, 1987), *T. gambiense* (elemento SLACS - Aksoy, 1987; Aksoy, 1991), *Crithidia fasciculata* (elemento CRE1 - Gabriel *et al.*, 1990) e *T. cruzi* (elemento CZAR - Villanueva *et al.*, 1991). Além de apresentarem homologias em suas sequências, têm como principal característica comum a inserção sítio-específica entre os nucleotídios 11 e 12 de genes de SL-RNA (Aksoy, 1993). O elemento CRE1 aparentemente é ativo, uma vez que verificou-se uma alta taxa de rearranjo, atingindo 1% a cada geração (Gabriel *et al.*, 1990). Interessantemente os "siteposons" estão ausentes nas amostras de

TABELA II - Comparação das características dos diferentes elementos do tipo retrotransposons isolados de organismos da ordem Kinetoplastida.

Nome do elemento	Organismo	Tamanho	Nº de cópias/ genoma haplóide	Outros elementos relacionados	Comentários	Referência
RIME	<i>T. brucei</i>	dímeros de 511 bases	200	Cópias de RIME são encontradas associadas com TRS-1/Ingi.	Inserido em genes de rRNA.	Hasan <i>et al.</i> , 1984
TRS-1	<i>T. brucei</i>	5,2 kb	200	Possivelmente igual ao Ingi.	Apresenta metades dos monômeros do elemento RIME flanqueando as extremidades 5' e 3' terminais.	Murphy <i>et al.</i> , 1987
Ingi	<i>T. brucei</i>	5,2 kb	200	Possivelmente igual ao TRS-1.	Apresenta metades dos monômeros do elemento RIME nas extremidades 5' e 3' terminais.	Kimmel <i>et al.</i> , 1987
TUBIS	<i>T. brucei</i>	4,0 kb (truncado*)	Poucas cópias em uma localização cromossômica	Representa uma forma truncada de elemento TRS-1/Ingi. Contém trechos de RIME.	Inserido na extremidade 3' terminal do último gene de β -tubulina do bloco de genes seriados.	Affolter <i>et al.</i> , 1989; Clauser <i>et al.</i> , 1994
ESR	<i>T. brucei</i>	1,4/2,0 kb	12-18	Homologia de 52% com TRS-1/Ingi.	Pseudogene inserido a montante do promotor do sítio de expressão T3 e T5 de genes de VSG.	Smiley <i>et al.</i> , 1990 Lodes <i>et al.</i> , 1993
CRE1	<i>C. fasciculata</i>	4,0 kb	10	Relacionado com SLACS, CZAR e MAE.	Inserido em genes de SL-RNA. Transposição sítio-específica - siteposon	Gabriel <i>et al.</i> , 1990
CZAR	<i>T. cruzi</i>	7,3 kb	15-20	Relacionado a CRE1, SLACS e MAE.	Inserido em genes de SL-RNA. Transposição sítio-específica - siteposon	Villanueva <i>et al.</i> , 1991
SLACS	<i>T. gambiense</i>	7,0 kb	8	Possivelmente igual ao MAE e relacionado com CZAR e CRE1.	Inserido em genes de SL-RNA. Transposição sítio-específica - siteposon	Aksoy <i>et al.</i> , 1987
MAE	<i>T. brucei</i>	5,5-7 kb	25	Possivelmente igual ao SLACS e relacionado com CZAR e CRE1	Inserido em genes de SL-RNA. Transposição sítio-específica - siteposon	Carrington <i>et al.</i> , 1987
Sem nome	<i>T. cruzi</i>	317 pb (truncado*)	Baixo (não determinado)	Extremidade 5' terminal semelhante à posição correspondente em RIME	Inserido na região intergênica de genes seriados de gGAPDH**.	Kendall <i>et al.</i> , 1990
Sem nome	<i>T. cruzi</i>	182 pb (truncado*)	50-80 cópias do gene TAT***. Não medido especificamente para o elemento.	Homologia de 77% com RIME.	Inserido na região intergênica de genes seriados de TAT***.	Bontempi <i>et al.</i> , 1993

* O elemento identificado está truncado por um gene associado

** gGAPDH - gliceraldeído-3-P desidrogenase glicossomal

*** TAT - tirosina aminotransferase

Leishmania testadas, sugerindo que este gênero pode ter surgido antes da introdução desses elementos (Aksoy, 1993). A construção de um gene quimérico da ORF do elemento CRE1 com o retrotransposon Ty1 permitiu observar em leveduras a expressão de uma atividade de DNA polimerase RNA-dirigida, indicando que esse elemento codifica uma transcriptase reversa funcionalmente ativa (Gabriel & Boeke, 1991), enzima requerida no evento de retrotransposição.

Alguns elementos apresentando homologia com retrotransposons, porém truncados pelos genes vizinhos também foram observados. Uma sequência homóloga a TRS-1/ingi, denominada TUBIS, foi identificada na região 3' terminal do último gene de β -tubulina do bloco de genes seriados de *T. brucei* (Affolter, 1989). A inserção deste elemento provocou a interrupção do último gene de β -tubulina, gerando um pseudogene. O elemento TUBIS por sua vez também está truncado e, semelhantemente ao observado em TRS-1/ingi, está associado à sequência RIME. Uma hipótese é de que TUBIS represente um vestígio fossilizado da inserção de um elemento TRS-1/ingi no bloco de genes de tubulina (Glauser & Braun, 1994). Uma vez que TUBIS está presente em várias espécies do subgênero *Trypanozoon* e na mesma localização cromossômica, mas não em *T. congolense* e *T. cruzi*, sugere-se que esta inserção teria ocorrido somente após a ramificação das seções Stercoraria e Salivaria, bem como dos subgêneros *Trypanozoon* e *Nannomonas* (Braun *et al.*, 1992).

Outros elementos truncados também foram identificados na região intergênica de genes seriados de gliceraldeído 3-P desidrogenase glicossomal (Kendall *et al.*, 1990) e tirosina aminotransferase (Bontempi *et al.*, 1993) de *T. cruzi*. Um elemento relacionado com Ingi, denominado ESR, também foi encontrado inserido em regiões 5' terminais de genes de VSG de *T. brucei*, (Smiley *et al.*, 1990; Lodes *et al.*, 1993). Embora ESR seja transcrito, dados de seqüenciamento indicaram que não há códons de iniciação, caracterizando-o como um pseudogene. O local de inserção está a cerca de 30 pb do suposto promotor dos sítios de expressão T3 e T5, e o elemento está posicionado em uma orientação invertida em relação aos genes de VSG. Uma vez que ESR apresenta acumulação de transcritos em formas sangüíneas mas não em procíclicas, e está inserido em sítios de expressão de genes de VSG, sugere-se que sua expressão possa estar coordenada com a desses genes (Lodes *et al.*, 1993).

Visando caracterizar melhor o gene B11, foi construída uma biblioteca genômica parcial de *T. cruzi*, contendo fragmentos genômicos de *EcoRI*, de tamanho entre 3,5 a 5,5 kb. Usando o inserto SE1 como sonda, foram isolados alguns clones homólogos. Um deles, denominado 5.3 apresenta 5,3 kb e está sendo seqüenciado em nosso laboratório. Esse trabalho está sendo conduzido por Beatriz Simonsen Stolf em seu estágio de iniciação científica.

Recentemente, na XXI Reunião Anual de Pesquisa Básica sobre Doença de Chagas, foi comunicada a clonagem e caracterização de um retrotransposon de *T. cruzi* com características muito similares a B11 (Francisco Martín - Instituto de Parasitología y Biomedicina, Granada, Espanha). Este elemento, denominado L1Tc, apresenta 5,3 kb, é transcrito somente em formas replicativas amastigotas e epimastigotas, mas não em tripomastigotas, apresenta homologia com TRS-I/Ingi e codifica para uma transcriptase reversa e uma endonuclease. A comparação das seqüências nucleotídica e protéica de L1Tc e B11 revelou que ambos os elementos são virtualmente idênticos. O retrotransposon L1Tc apresenta em sua porção 3' terminal homologia com o elemento E12, previamente descrito pelo mesmo grupo (Requena *et al.*, 1994).

4.9. Perspectivas futuras

Neste trabalho foram relatadas a clonagem e caracterização de dois genes contíguos de *T. cruzi*, codificadores de antígenos. O gene B12 foi totalmente seqüenciado e, a partir da seqüência protéica, foi possível evidenciar a presença de blocos com certa homologia com uma proteína de nervos de mamíferos: a subunidade pesada de neurofilamento. A existência de possíveis epitopos de reatividade cruzada entre estas duas proteínas deverá ser investigada, semelhantemente ao que foi realizado para a proteína B13 e miosina cardíaca humana (Cunha-Neto, 1994; Cunha-Neto *et al.*, 1994). Com relação à própria proteína B13, os trabalhos de investigação de seu papel na autoimunidade e patogênese deverá ser continuado por Márcia Duranti, estudante de doutorado, em colaboração com o grupo do Dr. Jorge Kalil, do Instituto do Coração.

O fato de B12 e B13 serem genes contíguos abre a possibilidade de compartilharem um transcrito comum policistrônico. Embora nossos resultados não tenham demonstrado sua existência, pretende-se realizar experimentos de "run-on", para confirmar essa hipótese.

Outra característica ainda não analisada dos transcritos de B12 e B13 diz respeito aos sítios de "trans-splicing". Pretende-se investigar esse aspecto através da clonagem e seqüenciamento das extremidades 5' terminais dos mRNAs via RACE-PCR, utilizando como iniciadores a seqüência do mini-exon e oligonucleotídeos de regiões da fita complementar a juzante. Também deverão ser feitos ensaios concomitantes de proteção à digestão com nuclease S1 e "primer-extension". Esta última técnica poderá evidenciar a existência de sítios alternativos e hierárquicos de "trans-splicing", como foi previamente demonstrado (Revelard *et al.*, 1993).

A localização dos sítios de poliadenilação dos transcritos de B12 e B13 também deverá ser investigada. Pretende-se utilizar as regiões 3' terminais dos respectivos genes para a varredura de uma biblioteca de cDNA de *T. cruzi*, com o intuito de isolar clones contendo a cauda poliadenilada. Esses clones deverão ser seqüenciados e os dados serão

comparados com as seqüências genômicas que já dispomos, visando identificar a localização dos sítios de adição da cauda poli (A)+.

Visando identificar possíveis seqüências regulatórias de transcrição, as regiões a montante do gene B12 e intergênica, entre B12 e B13, deverão ser inseridas em vetores contendo genes-repórter. Estas construções, seguidas por uma transfecção e expressão transiente, poderão indicar a presença de promotores, bem como de sítios funcionais de *trans*-splicing e poliadenilação. Com o objetivo de investigar a função dos genes B12 e B13 na biologia do parasita, deverão ser conduzidos experimentos de ruptura gênica por recombinação homóloga. Para essa tarefa serão construídos vetores contendo genes de resistência a neomicina e/ou higromicina, flanqueados das regiões a montante e a juzante dos genes B12 e B13.

O fato de termos isolado dois genes distintos e contíguos abre a possibilidade de estudar a conservação deste "linkage" nas diferentes cepas de *T. cruzi*. Este estudo pode ser interessante não somente para detectar relações taxonômicas entre cepas, como também para verificar o grau de rearranjos genômicos em populações do parasita. Além disto, o programa de seqüenciamento do genoma de *T. cruzi* terá como primeira etapa o mapeamento físico dos cromossomos (Levin *et al.*, 1994). As sondas de B12 e B13, que são genes de cópia única, poderão ser úteis tanto na identificação do cromossomo a que pertencem, como também no seu mapeamento.

O gene B11, identificado como um retrotransposon da família dos elementos LINES (Fanning & Singer, 1987), poderá ser utilizado como um marcador de, senão todos, ao menos da quase totalidade dos cromossomos de *T. cruzi*. Além disto, como este elemento c/ou retroposons homólogos estão presentes tanto em membros da seção Stercoraria como Salivaria, ele abre a possibilidade de estudos filogenéticos baseados em sua seqüência e distribuição. Além disso, como este elemento está altamente disperso no genoma do parasita, é possível que possa ser utilizado em estudos de RFLP ("restriction fragments length polymorphism"), visando a identificação e classificação de cepas de *T. cruzi*.

Finalmente, a observação de que o soro anti-GST *Schistosoma japonicum* reage com proteínas de *T. cruzi* sugere seu uso na clonagem da GST de *T. cruzi*. Um dado interessante é que proteínas de *T. cruzi* purificadas por cromatografia de afinidade em colunas de GSH-agarose foram reconhecidas pelo soro anti-GST. De fato, em um trabalho paralelo, desenvolvido em nosso laboratório, esse soro foi utilizado para a varredura de uma biblioteca genômica de *T. cruzi* em λ gt11. Foram isolados três clones, os quais estão sendo caracterizados. Um deles, denominado 1.1, foi subclonado no vetor pEX34b (Klinkert *et al.*, 1988) e expresso em fusão com a polimerase do fago MS2. A proteína de fusão também foi reconhecida pelo soro anti-GST. Esse trabalho de clonagem e caracterização de genes de proteínas relacionadas com o metabolismo de glutatona está sendo continuado pelo estudante de doutoramento Fernando Freitas em nosso laboratório.

5. RESUMO

Uma biblioteca genômica de *T. cruzi*, construída no vetor λ gt11, foi selecionada com um soro anti-tripomastigota. Dois clones, denominados B12 e B13, foram isolados, verificando-se que expressam proteínas que contêm repetições seriadas de 20 aminoácidos (B12) e 12 aminoácidos (B13). Os insertos respectivos foram subclonados e expressos em fusão com β -galactosidase no vetor pMSgt11. A caracterização dos antígenos em *T. cruzi* foi feita por Western blot, utilizando soros de coelho contra as proteínas de fusão ou anticorpos imuno-selecionados de soros de pacientes chagásicos. Concluiu-se que B12 corresponde a antígenos de 230 kDa e 200 kDa expressos em tripomastigotas e epimastigotas, respectivamente. Anticorpos contra B13 reconheceram antígenos de 140 kDa e 116 kDa nas duas formas evolutivas. A imunoprecipitação de parasitas radioiodados indicou que o antígeno de 140 kDa está localizado na superfície de tripomastigotas, enquanto os demais polipeptídios correspondem a antígenos internos em ambos os estágios evolutivos. As proteínas recombinantes B12 e B13 foram avaliadas no diagnóstico sorológico da doença de Chagas por radioimunoensaio. Foi feito um levantamento com 128 soros, sendo 70 de pacientes chagásicos, 38 de pacientes com outras parasitoses e 20 de indivíduos normais. B12 e B13 obtiveram índices Kappa, que estimam a proporção de acertos verdadeiros, de 0,94 e 0,61, respectivamente. Esses resultados indicam que o antígeno B13 é um candidato potencial para ser empregado no diagnóstico sorológico da doença de Chagas.

Os insertos dos clones B12 e B13 foram usados como sondas para o isolamento de clones genômicos de uma biblioteca em λ EMBL3. O mapa de restrição de uma região de 32 kb do genoma de *T. cruzi* indicou que os genes B12 e B13 são contíguos. Em ensaios de Northern blot B12 hibridizou com transcritos de 7,2 e 8,8 kb e B13 com mRNAs de 3,5 e 4,2 kb. O arranjo genômico de B12 e B13, deduzido de Southern blots de DNA e de cromossomos separados por eletroforese de campo pulsado, é compatível com genes de cópia única. A sequência completa de um gene homólogo a B13 foi previamente descrita por Buschiazzo e cols. (*Mol. Biochem. Parasitol*, 54: 125-128, 1992), indicando que 75 repetições seriadas de 36 pb estão presentes em um único bloco. A sequência completa do gene B12 e da região intergênica entre B12 e B13 foi determinada. B12 codifica uma proteína de 223 kDa contendo um domínio de 173 aminoácidos repetido 3 vezes ao longo da proteína e intercalado por blocos contendo um número variável de repetições seriadas de 20 aminoácidos. A estrutura de B12 é peculiar, uma vez que em outros antígenos de *T. cruzi* clonados as repetições seriadas estão contidas em um único bloco. Uma busca no banco de dados GenBank demonstrou homologia com proteínas ricas em prolina, incluindo a subunidade pesada da proteína triplet de neurofilamento (NF-H) de mamíferos.

Um terceiro gene, denominado B11, e que hibridiza com um transcrito de 5,5 kb, foi localizado a cerca de 9,5 kb a montante de B12. Análises de Southern blot, feitas a partir de DNA de *T. cruzi* digerido com enzimas de restrição ou de cromossomos, demonstrou que B11 apresenta múltiplas cópias dispersas no genoma do parasita. A sequência nucleotídica de um fragmento de 0,7 kb de B11 revelou homologia, a nível protéico, com o produto de TRS-1, um elemento semelhante a retrotransposon, isolado de *T. brucei* (Murphy *et al.*: *J. Mol. Biol.*, 195: 855-871, 1987).

6. SUMMARY

Characterization of two contiguous antigen genes of *Trypanosoma cruzi* presenting immunodominant repetitive epitopes

A genomic library of *T. cruzi* in the vector λ gt11 was screened with anti-trypomastigote serum. Two clones, named B12 and B13, were isolated and shown to express proteins which contain tandemly repeated units of 20 amino acids (B12) and 12 amino acids (B13). Inserts from clones B12 and B13 were subcloned in the vector pMSgt11 and expressed as β -galactosidase fusion proteins. The characterization of *T. cruzi* antigens coded by recombinants B12 and B13 was performed by Western blot, using either rabbit antisera to the fusion proteins or immunoselected antibodies from chagasic patients. It was concluded that B12 corresponds to antigens of 230 kDa and 200 kDa found, respectively, both in trypomastigotes and epimastigotes, whereas B13 corresponds to polypeptides of 140 kDa and 116 kDa expressed in both evolutive stages. Immunoprecipitation of radioiodinated parasites indicates that the 140 kDa antigen is located on the surface of trypomastigotes, whereas the other polypeptides correspond to internal antigens. B12 and B13 recombinant proteins were evaluated by radioimmunoassay in the serological diagnosis of Chagas' disease. Analysis of 128 sera from 20 normal individuals, 70 chagasic patients and 38 patients with other parasitoses indicated kappa indexes of 0.94 and 0.61, respectively, for the B12 and B13 proteins. These data indicate that B13 polypeptide is a potential candidate for the diagnosis of Chagas' disease.

The inserts of B12 and B13 were used to isolate genomic clones from a λ EMBL3 library. The restriction map of a region of 32 kb from *T. cruzi* genome indicated that B12 and B13 genes are contiguous. Northern blots showed that B12 corresponds to 7.2 and 8.8 kb mRNAs, whereas B13 hybridizes to transcripts of 3.5 and 4.2 kb. Southern blot analysis of total digested *T. cruzi* DNA and pulse field-separated chromosomes lead to the conclusion that B12 and B13 correspond to single copy genes. The entire sequence of a gene homologous to B13 was previously reported (Buschiazzo *et al.*: *Mol. Biochem. Parasitol.*, 54: 125-128, 1992), indicating that ca. 75 units of the 36 bp repeat motif are organized in a single cluster. The complete sequence of B12 gene and the intergenic region between B12 and B13 genes were determined. B12 encodes a 223 kDa protein bearing a 173 amino acids motif repeated 3 times along the sequence and intercalated by clusters containing a variable number of tandemly repeated 20 amino acids units. The sequence of B12 gene is peculiar since in other cloned antigen genes of *T. cruzi* the repeat units are generally located in a single cluster. A search for homology, with the BLAST program, revealed some homology to proline-rich proteins, like mammalian heavy neurofilament subunit (NF-H).

A third gene, denominated B11 and hybridizing to a 5.5 mRNA species, was identified 9.5 kb upstream from the 5' end of B12 gene. Southern blots of digested DNA and pulse field-separated chromosomes hybridized with the B11 probe, indicating that B11 is a multicopy gene distributed in many chromosomes. The nucleotide sequence of a 0.7 kb fragment from B11 was determined and a search in GenBank database, performed with BLAST program, revealed a significant homology at the protein level to the product of TRS-1 element, a retrotransposon-like sequence of *T. brucei* (Murphy *et al.*: *J. Mol. Biol.*, 195: 855-871).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J. & CAPRON, A. (1979). Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture formes: identification of a specific component. *J. Parasitol.*, 65: 507-514.
- AFFOLTER, M.; RINDISBACHER, L. & BRAUN, R. (1989). The tubulin gene cluster of *Trypanosoma brucei* starts with an intact β -gene and ends with a truncated β -gene interrupted by a retrotransposon-like sequence. *Gene*, 80: 177-183.
- AFFRANCHINO, J.L.; IBÁÑEZ, C.F.; LUQUETTI, A.O.; RASSI, A.; REYES, M.B.; MACINA, R.A.; ÅSLUND, L.; PETTERSSON, U. & FRASCH, A.C.C. (1989). Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 34: 221-228.
- AKSOY, S. (1991). Site-specific retrotransposons of the trypanosomatid protozoa. *Parasitol. Today*, 7: 281-285.
- AKSOY, S. (1993). A family of target site-specific retrotransposons interrupts spliced leader RNA genes in trypanosomatids. *J. Parasitol.*, 79: 645-652.
- AKSOY, S.; LALOR, T.M.; MARTIN, J.; VAN DER PLOEG, L.H.T. & RICHARDS, F.F. (1987). Multiple copies of a retroposon interrupt spliced leader RNA genes in the African trypanosome, *Trypanosoma gambiense*. *EMBO J.*, 6: 3819-3826.
- AKSOY, S.; WILLIAMS, S.; CHANG, S.; RICHARDS, F.F. (1990). SLACS retrotransposon from *Trypanosoma brucei gambiense* is similar to mammalian LINES. *Nucleic Acids Res.*, 18: 785-792.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J.D. (1989). *Molecular Biology of the Cell*. 2ª edição, Garland Publishing.
- ALMEIDA, E.; KRIEGER, M.A.; CARVALHO, M.R.; OELEMANN, W. & GOLDENBERG, S. (1990). Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas' disease. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*, 85: 513-517.
- ALONSO, G.; GUEVARA, P. & RAMIREZ, J.L. (1992). Trypanosomatidae codon usage and GC distribution. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87: 517-523.

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
- ANDRADE, A.Z. (1991). Pathogenesis of Chagas' disease. *Res. Immunol.*, 142: 126-129.
- ANDREWS, N.W.; ALVES, M.J.M.; SCHUMACHER, R.I. & COLLI, W. (1985). *Trypanosoma cruzi*: protection in mice immunized with 8-methoxypsoralen inactivated trypomastigotes. *Exp. Parasitol.*, 60: 255-262.
- ARRUDA, M.V.; REINACH, F.C.; COLLI, W. & ZINGALES, B. (1990). Sequence of the 24S α ribosomal RNA gene and characterization of a corresponding pseudogene from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 40: 35-42.
- AVILA, H.A.; PEREIRA, J.B.; THIEMANN, O.; DE PAIVA, E.; DEGRAVE, W.; MOREL, C. & SIMPSON, L. (1993). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 2421-2426.
- AVILA, H.A.; SIGMAN, D.S.; COHEN, L.M.; MILIKAN, R.C. & SIMPSON, L. (1991). Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 48: 211-222.
- AYMERICH, S. & GOLDENBERG, S. (1989). The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm 28c: comparison with other *T. cruzi* strains and trypanosomatids. *Exp. Parasitol.*, 69: 107-115.
- BASSO, B.; MORETTI, E.R.A. & VOTTERO-CIMA, E. (1991). Immune response and *Trypanosoma cruzi* infection in *Trypanosoma rangeli*-immunized mice. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, 44: 413-419.
- BEARD, C.A.; WRIGHTSMAN, R.A. & MANNING, J.E. (1988). Stage and strain specific expression of the tandemly repeated 90 kDa surface antigen gene family in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 28: 227-234.
- BENNE, R. (1990). RNA editing in trypanosomes: is there a message? *Trends Genet.*, 6: 177-181.

- BENNE, R.; VAN DEN BURG, J.; BRAKENHOFF, J.P.J; SLOOF, P.; VAN BOOM, J.H. & TROMP, M.C. (1986). Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell*, 46: 819-826.
- BIGGIN, M.D.; GIBSON, T.J. & HONG, G.F. (1983). Buffer gradient and ^{35}S label as an aid to rapid DNA sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 3963-3965.
- BLUM, B.; BAKALARA, N. & SIMPSON, L. (1990). A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell*, 60: 189-198.
- BLUM, B.; STURM, N.R.; SIMPSON, A.M. & SIMPSON, L. (1991). Chimeric gRNA-mRNA molecules with oligo(U) tails covalently linked at sites of RNA editing suggest that U addition occurs by transesterification. *Cell*, 65: 543-550.
- BOEKE, J.D. & CORCES, V.G. (1989). Transcription and reverse transcription of retrotransposons. *Annu. Rev. Microbiol.*, 43: 403-434.
- BONTEMPI, E.J.; BÚA, J.; ÅSLUND, L.; PORCEL, B.; SEGURA, E.L.; HENRIKSSON, J.; ÖRN, A.; PETTERSSON, U. & RUIZ, A.M. (1993). Isolation and characterization of a gene from *Trypanosoma cruzi* encoding a 46-kilodalton protein with homology to human and rat tyrosine aminotransferase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 59: 253-262.
- BOOTHROYD, J.C. & CROSS, G.A.M. (1982). Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. *Gene*, 20: 281-289.
- BORST, P. (1991). Why kinetoplast DNA networks? *Trends Genet.*, 7: 139-141.
- BOUCHÉ, J.P. (1981). The effect of spermidine on endonuclease inhibition by agarose contaminants. *Anal. Biochem.*, 125: 42-45.
- BRAUN, R.; BEHRENS, K.; GLAUSER, A. & BRUN, R. (1992). Evolution of the retrotransposons TRS/ingi and of the tubulin genes in trypanosomes. *Acta Trop.*, 52: 175-187.
- BRENER, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 27: 347-383.

- BRENER, Z. (1980). Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.*, 18: 247-292.
- BRENER, Z. (1986). Why vaccines do not work in Chagas disease. *Parasitol. Today*, 2: 196-197.
- BRENER, Z. (1987). Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Suppl)*, 82: 205-213.
- BRENER, Z. & CAMARGO, E.P. (1982). Perspectives of vaccination in Chagas disease. *Pontif. Acad. Sci. Scr. Varia*, 47: 145-168.
- BRENER, Z. & CHIARI, E. (1963). Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 5: 220-224.
- BROWN, W.C.; ZHAO, S.; WOODS, V.M.; TRIPP, C.A.; TETZLAFF, C.L; HEUSSLER, V.T.; DOBBELAERE, D.A.E. & RICE-FICHT, A.C. (1993). Identification of two Th1 cell epitopes on the *Babesia bovis*-encoded 77-kilodalton merozoite protein (Bb-1) by use of truncated recombinant fusion proteins. *Infect. Immun.*, 61: 236-244.
- BURNETTE, W.N. (1981). "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 112: 195-203.
- BURNS, J.M., JR.; SHREFFLER, W.G.; ROSMAN, D.E.; SLEATH, P.R.; MARCH, C.J. & REED, S.G. (1992). Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1239-1243.
- BUSCHIAZZO, A.; CAMPETELLA, O.E.; MACINA, R.A.; SALCEDA, S.; FRASCH, A.C.C. & SANCHEZ, D.O.. (1992). Sequence of the gene for a *Trypanosoma cruzi* protein antigenic during the chronic phase of human Chagas disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 54:125-128.
- CAMARGO, M.E. (1966). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 5: 227-234.

- CAMARGO, M.E.; HOSHINO, S. & SIQUEIRA, G.R.V. (1973). Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of american trypanosomiasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 15: 81-85.
- CAMARGO, M.E.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; MACEDO, V.; PERES, B.A. & CASTRO, C. (1977). Diagnóstico sorológico da infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi*. Estudo comparativo de testes de fixação do complemento, imunofluorescência, hemaglutinação e floculação, em 3.624 soros. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 19: 254-260.
- CAMARGO, M.E. & REBONATO, C. (1969). Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 18: 500-505.
- CAMPBELL, D.A.; THORNTON, D.A. & BOOTHROYD, J.C. (1984). Apparent discontinuous transcription of *Trypanosoma brucei* variant surface antigen genes. *Nature*, 311: 350-355.
- CAMPETELLA, O.E.; HENRIKSSON, J. ÅSLUND, L. FRASCH, A.C.C.; PETTERSSON, U. & CAZZULO, J.J. (1992). The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 50: 225-234.
- CAMPETELLA, O.E.; UTTARO, A.D.; PARODI, A.J. & FRASCH, A.C.C. (1994). A recombinant *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase lacking the amino acid repeats retains the enzymatic activity. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 64: 337-340.
- CANO, M.I.; SANTORI, F.R.; ARAYA, J.E.; SANTOS, M.R.; RAMIREZ, I.M.; GALINDO, I.; GUEVARA, P.; RAMIREZ, J.L.; SOLARI, A.; MORTARA, R.A. & FRANCO DA SILVEIRA, J. (1994). Chromosome polymorphism in *Trypanosoma cruzi* and selection of chromosome-specific markers. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Suppl.)*, 89: 118.
- CARRINGTON, M.; RODITI, I. & WILLIAMS, R.O. (1987). The structure and transcription of an element interspersed between tandem array of mini-exon donor genes in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids. Res.*, 15: 10179-10198.
- CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L. V. & FERNANDES, J. F. (1967). Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Protozool.*, 14: 447-451.

- CASTRO, C.; CRAIG, S.P. & CASTAÑEDA, M. (1981). Genome organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 4: 273-282.
- CAVENER, D.R. & RAY, S.C. (1991). Eukaryotic start and stop translation sites. *Nucleic Acids. Res.*, 19: 3185-3192.
- CAZZULO, J.J.; COUSO, R.; RAIMONDI, A.; WERNSTEDT, C. & HELLMAN, U. (1989). Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 33: 33-42.
- CAZZULO, J.J. & FRASCH, A.C.C. (1992). SAPA/*trans*-sialidase and cruzipain: two antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. *FASEB J.*, 6: 3259-3264.
- CHIARI, E. (1992). Diagnostic tests for Chagas disease. Em Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E. & Rassi, A. (editores) *Chagas disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*. ISBT Brazil'92, São Paulo, Brasil, pág. 153-164.
- CHIARI, E. & BRENER, Z. (1966). Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 8: 134-138.
- CHILDS, G.; MAXSON, R.; COHN, R.H. & KEDES, L. (1981). Orphans: dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eucaryotes. *Cell*, 23: 651-663.
- CHIN, S.S.M. & LIEM, R.K.H. (1990). Transfected rat high-molecular-weight neurofilament (NF-H) coassembles with vimentin in a predominantly nonphosphorylated form. *J. Neurosci.*, 10: 3714-3726.
- CHOU, P.Y. & FASMAN, G.D. (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Methods Enzymol.*, 47: 45-148..
- CHU, G.; VOLLRATH, D & DAVIS, R.W. (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*, 234: 1582-1585.
- CLAYTON, C.E. (1988). The molecular biology of the Kinetoplastidae. Em Rigby, P.W.J. (editor) *Genetic Engineering*. Vol. 7. San Diego, CA, Academic Press Inc.

- COHEN, J. (1960). A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Meas.*, 20: 37-46.
- COLLI, W.; ANDREWS, N.W. & ZINGALES, B. (1981). Surface determinants in American Trypanosomes. Em: Schweiger, H.G. (editor) *International Cell Biology* 1980/1981. Springer, Berlin Heidelberg New York, pág. 418-441.
- CONTRERAS, V.T.; SALLES, J.M.; THOMAS, N.; MOREL, C.M. & GOLDENBERG, S. (1985). *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 16: 315-327.
- COTRIM, P.C.; PARANHOS, G.S.; MORTARA, R.A.; WANDERLEI, J.; RASSI, A.; CAMARGO, M.E. & FRANCO DA SILVEIRA, J. (1990). Expression in *Escherichia coli* of a dominant immunogen of *Trypanosoma cruzi* recognized by human chagasic sera. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 519-524.
- CROSS, G.A.M. (1990). Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 6: 1-39.
- CRUZ, A.K.; TITUS, R. & BEVERLEY, S.M. (1993). Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1599-1603.
- CUNHA-NETO, E. (1994). Imunopatogênese da cardiopatia chagásica humana: estudo dos linfócitos infiltrantes da lesão e da reação cruzada miosina cardíaca-*Trypanosoma cruzi*. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - Depto. de Imunologia. São Paulo.
- CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; DE MESSIAS, I.; STOLF, N.; BELLOTTI, F.; PATARROYO, M.E.; PILLEGGI, F. & KALIL, J. (1994). Autoimmunity in Chagas' disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (no prelo).
- DAVIS, L.G.; DIBNER, M.D. & BATTEY, J.F. (1986). *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York.
- DAYHOFF, M.O.; BARKER, W.C. & HUNT, L.T. (1983). Establishing homologies in protein sequences. *Methods Enzymol.*, 91: 524-545.

- DEGRAVE, W.; FRAGOSO, S.P.; BRITTO, C.; VAN HEUVERSWYN, H.; KIDANE, G.Z.; CARDOSO, M.A.B.; MUELLER, R.U.; SIMPSON, L. & MOREL, C.M. (1988). Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 27: 63-70.
- DE LAFAILLE, M.A.C.; LABAN, A. & WIRTH, D.F. (1992). Gene expression in *Leishmania*: analysis of essential 5' DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2703-2707.
- DE LANGE, T.; LIU, A.Y.C.; VAN DER PLOEG, L.H.T.; BORST, P.; TROMP, M.C. & VAN BOOM, J.H. (1983). Tandem repetition of the 5' mini-exon of variant surface glycoprotein genes: a multiple promoter for VSG gene transcription? *Cell*, 34: 891-900.
- DE LANGE, T.; BERKVEN, T.M.; VEERMAN, H.J.G.; FRASCH, A.C.C.; BARRY, J.D. & BORST, P. (1984a). Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species. *Nucleic Acids Res.*, 12: 4431-4443.
- DE LANGE, T.; MICHELS, P.A.M.; VEERMAN, H.J.G.; CORNELISSEN, A.W.C.A. & BORST, P. (1984b). Many trypanosome messenger RNAs share a common 5' terminal sequence. *Nucleic Acids Res.*, 12: 3777-3790.
- DEVEREUX, J.; HAEBERLI, P. & SMITHIES, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.*, 12: 387-395.
- DIAS, J.C.P. (1987). Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitol. Today*, 3: 336-341.
- DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V. & GONZALEZ, A. (1992). An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 46: 616-623.
- DI GIOVANI, L.; COCHRANE, A.H. & ENEA, V. (1990). On the evolutionary history of the circumsporozoite protein in plasmodia. *Exp. Parasitol.*, 70: 373-381.
- DRAGON, E.A.; BROTHERS, V.M.; WRIGHTSMAN, R.A. & MANNING, J. (1985). A M_r 90000 surface polypeptide of *Trypanosoma cruzi* is a candidate for a Chagas' disease diagnostic antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 16: 213-229.

- EAKIN, A.E.; MILLS, A.A.; HARTH, G.; MCKERROW, J.H. & CRAIK, C.S. (1992). The sequence, organization, and expression of the major cysteine proteinase (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, 267: 7411-7420.
- ENGLUND, P.T.; HAJDUK, S.L. & MARINI, J.C. (1982). The molecular biology of trypanosomes. *Annu. Rev. Biochem.*, 51: 695-726.
- ENGMAN, D.M.; REDDY, L.V.; DONELSON, J.E. & KIRCHHOFF, L.V. (1987). *Trypanosoma cruzi* exhibits inter- and intra-strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 22: 115-123.
- FANNING, T.G. & SINGER, M.F. (1987). LINE-1: a mammalian transposable element. *Biochim. Biophys. Acta*, 910: 203-212.
- FAWCETT, T.W. & BARTLETT, S.G. (1990). An effective method for eliminating "artifact banding" when sequencing double-stranded DNA templates. *BioTechniques*, 9: 46-48.
- FEAGIN, J.E.; ABRAHAM, J.M. & STUART, K. (1988). Extensive editing of the cytochrome c oxidase III transcript in *Trypanosoma brucei*. *Cell.*, 53: 413-422.
- FERREIRA, A.W. (1992). Tests for Chagas' disease serodiagnosis: a review. Em Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E. & Rassi, A. (editores) *Chagas disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*. ISBT Brazil'92, São Paulo, Brasil.
- FERREIRA, A.W.; BELEM, Z.R.; MOURA, M.E.G. & CAMARGO, M.E. (1991). Aspectos da padronização de testes sorológicos para a doença de Chagas: um teste imunoenzimático para a triagem de doadores de sangue. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 33: 123-128.
- FERGUSON, M.A.J. & WILLIAMS, A.F. (1988). Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu. Rev. Biochem.*, 57: 285-320.
- FRANCO DA SILVEIRA, J.; PARANHOS, G.S.; COTRIM, P.C.; MORTARA, R.A.; CAMARGO, M.E.; RASSI, A.; WANDERLEY, J.; CORRAL, R.; FREILIJ, H.L.; GRINSTEIN, S. & DEGRAVE, W. (1990). Antigens of *Trypanosoma cruzi* with clinical interest cloned and expressed in *Escherichia coli*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85: 507-511.

- FRASCH, A.C.C.; CAZZULO, J.J.; ÅSLUND, L. & PETTERSSON, U. (1991). Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. *Parasitol. Today*, 7: 148-151.
- FRASCH, A.C.C. & REYES, M.B. (1990). Diagnosis of Chagas disease using recombinant DNA technology. *Parasitol. Today*, 6: 137-139.
- FREISTADT, M.S.; CROSS, G.A.M.; BRANCH, A.D. & ROBERTSON, H.D. (1987). Direct analysis of the mini-exon donor RNA of *Trypanosoma brucei*: detection of a novel cap structure also present in messenger RNA. *Nucleic Acids Res.*, 23: 9861-9879.
- FRISCHAUF, A.-M.; LEHRACH, H.; POUTSKA, A. & MURRAY, N. (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.*, 170: 827-842.
- FRISCHAUF, A.-M.; MURRAY, N. & LEHRACH, H. (1987). λ phage vectors - EMBL series. *Methods Enzymol.*, 153: 103-115.
- FUCHS, R. & BLAKESLEY, R. (1983). Guide of the use of type II restriction endonucleases. *Methods Enzymol.*, 100: 3-38.
- GABRIEL, A. & BOEKE, J.D. (1991). Reverse transcriptase encoded by a retrotransposon from the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88: 9794-9798.
- GABRIEL, A.; YEN, T.J.; SCHWARTZ, D.C.; SMITH, C.L.; BOEKE, J.D.; SOLLNER-WEBB, B. & CLEVELAND, D.W. (1990). A rapidly rearranging retrotransposon within the minixon gene locus of *Crithidia fasciculata*. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 615-624.
- GAZZINELLI, R.T.; GALVÃO, L.M.C.; KRAUTZ, G.; LIMA, A.P.C.A.; CANÇADO, J.-R.; SCHARFSTEIN, J. & KRETTLI, A.U. (1993). Use of *Trypanosoma cruzi* purified glycoprotein (GP57/51) or trypomastigote-shed antigens to assess cure for human Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 49: 625-635.
- GEYSEN, H.M.; RODDA, S.J.; MASON, T.J.; TRIBBICK, G. & SCHOOFS, P.G. (1987). Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J. Immunol. Methods*, 102: 259-274.
- GIBSON, W.C. & MILES, M.A. (1986). The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO. J.*, 5: 1299-1305.

- GIBSON, W.C.; OSINGA, K.A.; MICHELS, P.A.M. & BORST, P. (1985). Trypanosomes of subgenus *Trypanozoon* are diploid for housekeeping genes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 16: 231-242.
- GLAUSER, A. & BRAUN, R. (1994). TUBIS, a fossilized retroposon in the tubulin gene cluster of *Trypanosoma brucei*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1218: 99-101.
- GONZÁLEZ, A.; LERNER, T.J.; HUECAS, M.; SOSA-PINEDA, B.; NOGUEIRA, N. & LIZARDI, P.M. (1985). Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res.*, 13: 5789-5804.
- GONZÁLEZ, A.; PREDIGER, E.; HUECAS, M.E.; NOGUEIRA, N. & LIZARDI, P. (1984). Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 3356-3360.
- GONZÁLEZ, A.; ROSALES, J.L.; LEY, V. & DÍAZ, C. (1990). Cloning and characterization of a gene coding for a protein (KAP) associated with the kinetoplast of epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 40: 233-244.
- GOODE, B. L. & FEINSTEIN, S. C. (1992). "Speedprep" purification of template for double-stranded DNA sequencing. *BioTechniques*, 12: 374-375.
- GRIECO, F.; HAY, J.M. & HULL, R. (1992). An improved procedure for the purification of protein fused with glutathione S-transferase. *Biotechniques*, 13: 856-857.
- GRUBER, A. & ZINGALES, A. (1993). *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Exp. Parasitol.*, 76: 1-12.
- GUHL, F.; HUDSON, L.; MARINKELLE, C.J.; MORGAN, S.J. & JARAMILLO, C. (1985). Antibody response to experimental *Trypanosoma rangeli* infection and its implications for immunodiagnosis of South American trypanosomiasis. *Acta Trop.*, 42: 311-318.
- GUHL, F.; HUDSON, L.; MARINKELLE, C.J.; JARAMILLO, C.A. & BRIDGE, D. (1987). Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. *Parasitology*, 94: 475-484.

- HANAHAN, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. Em Glover, D.M. (editor) *DNA Cloning: a practical approach*. Oxford, IRL Press. Vol. 1, pág. 109-135.
- HARTREE, E.F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48: 422-427.
- HASAN, G.; TURNER, M.J. & CORDINGLEY, J.S. (1984). Complete nucleotide sequence of an unusual mobile element from *Trypanosoma brucei*. *Cell*, 37: 333-341.
- HE, M.; WILDE, A. & KADERBHAI, M.A. (1990). A simple single-step procedure for small scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. *Nucleic Acids Res.*, 18: 1660.
- HELFMAN, D.M.; FERAMISCO, J.R.; FIDDES, J.C.; THOMAS, G.P. & HUGHES, S.H. (1983). Identification of clones that encode chicken tropomyosin by direct immunological screening of a cDNA expression library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 31-35.
- HENIKOFF, S. (1987). Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis. *Methods Enzymol.*, 155: 156-165.
- HENRIKSSON, J.; ÅSLUND, L.; MACINA, R.A.; FRANKE DE CAZZULO, B.M.; CAZZULO, J.J.; FRASCH, A.C.C. & PETTERSSON, U. (1990). Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 42: 213-224.
- HIGGINS, D.G. & SHARP, P.M. (1988). Clustal: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, 73: 237-244.
- HIGGINS, D.G.; BLEASBY, A.J. & FUCHS, R. (1991) CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.*, 8: 189-191.
- HOARE, C.A. & WALLACE, F.G. (1966). Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature*, 212: 1385-1386.
- HOFT, D.F.; KIM, K.S.; OTSU, K.; MOSER, D.R.; JOHN YOST, W.; BLUMIN, J.H.; DONELSON, J.E. & KIRCHOFF, L.V. (1989). *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect. Immun.*, 57: 1959-1967.
- HOHN, B. (1979). *In vitro* packaging of λ and cosmid DNA. *Methods Enzymol.*, 68: 299-309.

- HOHN, B. & MURRAY, K. (1977). Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 3259-3263.
- HUANG, J. & VAN DER PLOEG, L.H.T. (1991). Requirement of a polypyrimidine tract for *trans*-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *EMBO J.*, 10: 3877-3885.
- HUDSON, L.; GUHL, F.; DE SANCHEZ, N.; BRIDGE, D.; JARAMILLO, C.A. & YOUNG, A. (1988). Longitudinal studies of the immune response of Colombian patients infected with *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Parasitology*, 96: 449-460.
- IBAÑEZ, C.F.; AFFRANCHINO & FRASCH, A.C.C. (1987). Antigenic determinants of *Trypanosoma cruzi* defined by cloning of parasite DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 25: 175-184.
- IBAÑEZ, C.F.; AFFRANCHINO, J.L.; MEDINA, R.A.; REYES, M.B.; LEGUIZAMON, S.; CAMARGO, M.E.; ÅSLUND, L.; PETTERSSON, U. & FRASCH, A.C.C. (1988). Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated aminoacid sequence motifs. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 30: 27-34.
- IMBODEN, M.A.; LAIRD, P.W.; AFFOLTER, M. & SEEBECK, T. (1987). Transcription of the intergenic regions of the tubulin gene cluster of *Trypanosoma brucei*: evidence for a polycistronic transcription unit in a eukaryote. *Nucleic Acids Res.*, 15: 7357-7368.
- JULIEN, J.-P.; CÔTÉ, F.; BEAUDET, L.; SIDKY, M.; FLAVELL, D.; GROSVELD, F. & MUSHYNSKI, W. (1988). Sequence and structure of the mouse gene coding for the largest neurofilament subunit. *Gene*, 68: 307-314.
- KABSCH, W. & SANDER, C. (1983). How good are predictions of protein secondary structure? *FEBS Lett.*, 155: 179-182.
- KAHN, S.; COLBERT, T.G.; WALLACE, J.C.; HOAGLAND, N.A. & EISEN, H. (1991). The major 85-kDa surface antigen of the mammalian-stage forms of *Trypanosoma cruzi* is a family of sialidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4481-4485.
- KARN, J.; BRENNER, S.; BARNETT, L. & CESARENI, G. (1980). Novel bacteriophage λ cloning vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5172-5176.

- KENDALL, G.; WILDERSPIN, A.F.; ASHALL, F.; MILES, M.A. & KELLY, J.M. (1990). *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the 'hotspot' topogenic signal model. *EMBO J.*, 9: 2751-2758.
- KESSLER, S.W. (1975). Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.*, 115: 1617-1624.
- KIMMEL, B.E.; OLE-MOIYOI, O.K. & YOUNG, J.R. (1987). Ingi, a 5.2-kb dispersed sequence element from *Trypanosoma brucei* that carries half of a smaller mobile element at either end and has homology with mammalian LINEs. *Mol. Cell. Biol.*, 7: 1465-1475.
- KLINKERT, M.Q.; RUPPEL, A.; FELLEISEN, R.; LINK, G. & BECK, E. (1988). Expression of diagnostic 31/32 kilodalton proteins of *Schistosoma mansoni* as fusions with bacteriophage MS2 polymerase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 27: 233-240.
- KLUG, A. & RHODES, D. (1987). 'Zinc fingers': a novel protein motif for nucleic acid recognition. *Trends Biochem. Sci.*, 12: 464-469.
- KOOTER, J.M. & BORST, P. (1984). α -amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes. *Nucleic Acids Res.*, 12: 9457-9472.
- KOOY, R.F.; ASHALL, F.; VAN DER PLOEG, M. & OVERDULVER, J.P. (1989). On the DNA content of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 36: 73-76.
- KOZAK, M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 12: 857-872.
- KOZAK, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.*, 108: 229-241.
- KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. (1982). Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.*, 128: 2009-2012.
- KRETTLI, A.U.; CANÇADO, J.-R. & BRENER, Z. (1982). Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas' disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 76: 334-340.

- KRIEGER, M.A.; ALMEIDA, E.; OELEMANN, W.; LAFAILLE, J.J.; PEREIRA, J.B.; KRIEGER, H.; CARVALHO, M.R. & GOLDENBERG, S. (1992). Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, 46: 427-434.
- KRIEGER, M.A.; SALLES, J.M.; ALMEIDA, E.; LINSS, J.; BONALDO, M.C. & GOLDENBERG, S. (1990). Expression and polymorphism of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a cytoplasmic repetitive antigen. *Exp. Parasitol.*, 70: 247-254.
- KYTE, J. & DOOLITTLE, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157: 105-132.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LAFAILLE, J.J.; LINSS, J.; KRIEGER, M.A.; SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W. & GOLDENBERG, S. (1989). Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 35: 127-136.
- LAIRD, P.W.; KOOTER, J.M.; LOOSBROEK, N. & BORST, P. (1985). Mature mRNAs of *Trypanosoma brucei* possess a 5' cap acquired by discontinuous RNA synthesis. *Nucleic Acids Res.*, 13: 4253-4266.
- LAIRD, P.W.; ZOMERDIJK, J.C.B.M.; DE KORTE, D. & BORST, P. (1987). *In vivo* labelling of intermediates in the discontinuous synthesis of mRNAs in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.*, 6: 1055-1062.
- LANAR, D.E.; SILVEN LEVY, L. & MANNING, J. (1981). Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 3: 327-341.
- LASKEY, R.A. & MILLS, A.D. (1977). Enhanced autoradiographic detection of ^{32}P and ^{125}I using intensifying screens and hypersensitized film. *FEBS Lett.*, 82: 314-316.
- LAYDEN, R.E. & EISEN, H. (1988). Alternate *trans* splicing in *Trypanosoma equiperdum*: implications for splice site selection. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 1352-1360.
- LEBOWITZ, J.H.; SMITH, H.Q.; RUSCHE, L. & BEVERLEY, S.M. (1993). Coupling of poly (A) site selection and *trans*-splicing in *Leishmania*. *Genes & Dev.* 7: 996-1007.

- LEES, J.F.; SCHNEIDMAN, P.S.; SKUNTZ, S.F.; CARDEN, M.J. & LAZZARINI, R.A. (1988). The structure and organization of the human heavy neurofilament subunit (NF-H) and the gene encoding it. *EMBO J.*, 7: 1947-1955.
- LEGUIZAMON, M.S.; CAMPETELLA, O.E.; REYES, M.B.; IBAÑEZ, C.F.; BASOMBRIIO, M.A.; RINCON, J.; ÖRN, A. & FRASCH, A.C.C. (1991). Bloodstream *Trypanosoma cruzi* parasites from mice simultaneously express antigens that are markers of acute and chronic human Chagas disease. *Parasitology*, 102: 379-385.
- LENARDO, M.J.; DORFMAN, D.M. & DONELSON, J.E. (1985). The spliced leader sequence of *Trypanosoma brucei* has a potential role as cap donor structure. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 2487-2490.
- LEVIN, M.J.; CANO, M.I.; FRANCO DA SILVEIRA, J.; DEGRAVE, W.; RONDINELLI, E.; ZINGALES, B.; SOLARI, A.; REQUENA, J.M.; ALONSO, C.; GONZÁLEZ, A.; HERNÁNDEZ, R.; RAMIREZ, J.L.; LE PASLIER, D. & SAUMIER, M. (1994). *Trypanosoma cruzi* genome project: analysis of the molecular karyotype of clone CL Brener. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Suppl.)*, 89: 116.
- LEVIN, M.J.; MESRI, E.; BENAROUS, R.; LEVITUS, G.; SCHIJMAN, A.; LEVY-YEYATI, P.; CHIALE, P.A.; RUIZ, A.M.; KAHN, A.; ROSENBAUM, M.B.; TORRES, H.N. & SEGURA, E. (1989). Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 41: 530-538.
- LEVIN, M.J.; ROSSI, R.; LEVITUS, G.; MESRI, E.; BONNEFOY, S.; KERNER, N. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. (1990). The cloned C-terminal region of a *Trypanosoma cruzi* P ribosomal protein harbors two antigenic determinants. *Immunol. Lett.*, 24: 69-74.
- LEVIN, M.J.; VAZQUEZ, M.; KAPLAN, D. & SCHIJMAN, A.G. (1993). The *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein family: classification and antigenicity. *Parasitol. Today*, 9: 381-384.
- LEWIN, B. (1994). *Genes V*. New York, NY, Oxford University Press Inc.
- LOCKETT, T.J. (1990). A bacteriophage λ DNA purification procedure suitable for the analysis of DNA from either large or multiple small lysates. *Anal. Biochem.*, 185: 230-234.

- LODES, M.J.; SMILEY, B.L.; STADNYK, A.W.; BENNET, J.L.; MYLER, P.J. & STUART, K. (1993). Expression of a retroposon-like sequence upstream of the putative *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein gene expression site promoter. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 7036-7044.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- LUQUETTI, A.O. (1990). Use of *Trypanosoma cruzi* defined proteins for diagnosis - Multicentre trial - Serological and technical aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85: 497-505.
- MACINA, R.A.; AFFRANCHINO, J.L.; POLLEVICK, G.D.; JAZIN, E.E. & FRASCH, A.C.C. (1989). Variable number of repeats in genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. *FEBS Letters*, 257: 365-368.
- MARKWELL, M.A.K. & FOX, C.F. (1978). Surface-specific iodination of membrane proteins of viruses and eucaryotic cells using 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril. *Biochemistry*, 17: 4807-4817.
- MARSTON, F.A.O. (1986). Review Article - The purification of eucaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, 240: 1-12.
- MARSTON, F.A.O. (1987). The purification of eucaryotic polypeptides expressed in *Escherichia coli*. Em Glover, D.M. (editor) *DNA cloning: a practical approach*. Oxford, IRL Press. Vol. 3, pág. 59-87.
- MATTHEWS, K.R.; TSCHUDI, C. & ULLU, E. (1994). A common pyrimidine-rich motif governs *trans*-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes & Dev.*, 8: 491-501.
- MCCARTHY-BURKE, C; TAYLOR, Z.A. & BUCK, G.A. (1989). Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Gene*, 82: 177-189.
- MELO, R.C. & BRENER, Z. (1978). Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.*, 64: 475-482.

- MESSING, J. & VIEIRA, J. (1982). A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene*, 19: 269-276.
- MIERENDORF, R.C. & PFEFFER, D. (1987). Direct sequencing of denatured plasmid DNA. *Methods Enzymol.*, 152: 556-562.
- MILES, M.A. & CIBULSKIS, R.E. (1986). The heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* - Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today*, 2: 94-101.
- MILHAUSEN, M.; NELSON, R.G.; SATHER, S.; SELKIRK, M. & AGABIAN, N. (1984). Identification of a small RNA containing the trypanosome spliced leader: a donor of shared 5' sequences of trypanosomatid mRNAs? *Cell*, 38: 721-729.
- MONCADA, C.; REPETTO, Y.; ALDUNATE, J.; LETELIER, M.E. & MORELLO, A. (1989). Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94: 87-91.
- MONCAYO, A. & LUQUETTI, A.O. (1990). Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85: 489-495.
- MOREL, C.M.; DEANE, M.P. & GONÇALVES, A.M. (1986). The heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* - The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitol. Today*, 2: 94-101.
- MORELLO, A. (1988). Review. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90C: 1-12.
- MOSER, D.R.; KIRCHHOFF, L.V. & DONELSON, J.E. (1989). Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 27: 1477-1482.
- MUHICH, M.L. & BOOTHROYD, J.C. (1988). Polycistronic transcripts in trypanosomes and their accumulation during heat shock: evidence for a precursor role in mRNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 3837-3846.

- MUHICH, M.L.; HSU, M.P. & BOOTHROYD, J.C. (1989). Heat-shock disruption of *trans*-splicing in trypanosomes: effect on Hsp70, Hsp85 and tubulin mRNA synthesis. *Gene*, 82: 169-175.
- MUNIZ, J. & DE FREITAS, G. (1944). Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 41: 303-333.
- MURPHY, W.J.; WATKINS, K.P. & AGABIAN, N. (1986). Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for *trans* splicing. *Cell*, 47: 517-525.
- MURPHY, N.B.; PAYS, A.; TEBABI, P.; COQUELET, H.; GUYAUX, M.; STEINERT, M. & PAYS, E. (1987). *Trypanosoma brucei* repeated element with unusual structural and transcriptional properties. *J. Mol. Biol.*, 195: 855-871.
- MUSTO, H.; RODRÍGUEZ-MASEDA, H. & BERNARDI, G. (1994). The nuclear genomes of African and American trypanosomes are strikingly different. *Gene*, 141: 63-69.
- NEAL, R.A. & MILES, R.A. (1970). Indirect haemagglutination test for Chagas' disease, with a simple method for survey work. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 12: 325-332.
- NELSON, R.G.; PARSONS, M.; BARR, P.J.; STUART, K.; SELKIRK, M. & AGABIAN, N. (1983). Sequences homologous to the variant antigen mRNA spliced leader are located in tandem repeats and variable orphans in *Trypanosoma brucei*. *Cell*, 34: 901-909.
- NELSON, R.G.; PARSONS, M.; SELKIRK, M.; NEWPORT, G.; BARR, P.J. & AGABIAN, N. (1984). Sequences homologous to variant antigen mRNA spliced leader in Trypanosomatidae which do not undergo antigenic variation. *Nature*, 308: 665-667.
- ØRSKOV, F. & ØRSKOV, I. (1984). Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods Microbiol.*, 14: 43-112.
- OZAKI, L.S.; MATTEI, D.; JENDOUBI, M.; DRUIHLE, P.; BLISNICK, T.; GUILLOTE, M. PUJALON, O. & PEREIRA DA SILVA, L. (1986). Plaque antibody selection: rapid immunological analysis of a large number of recombinant phage clones positive to sera against *Plasmodium falciparum* antigens. *J. Immunol. Methods*, 89: 213-219.

- PAN, A.A.; ROSENBERG, G.B.; HURLEY, M.K.; SCHOCK, G.J.H.; CHU, V.P. & ANYAPPA, A. (1992). Clinical evaluation of an EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease). *J. Infect. Dis.*, 165: 585-588.
- PARANHOS, G.S.; COTRIM, P.C.; MORTARA, R.A.; RASSI, A.; CORRAL, R.; FREILIJ, H.L.; GRINSTEIN, S.; WANDERLEY, J.; CAMARGO, M.E. & FRANCO DA SILVEIRA, J. (1990). *Trypanosoma cruzi*: cloning and expression of an antigen recognized by acute and chronic human chagasic sera. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 71: 284-293.
- PARANHOS-BACALLA, G.S.; SANTOS, M.R.M.; COTRIM, P.C.; RASSI, A.; JOLIVET, M.; CAMARGO, M.E. & FRANCO DA SILVEIRA, J. (1994). Detection of antibodies in sera from Chagas' disease patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. *Parasite Immunol.*, 16: 165-169.
- PARODI, A.J.; POLLEVICK, G.D.; MAUTNER, M.; BUSCHIAZZO, A.; SANCHEZ, D.O. & FRASCH, A.C.C. (1992). Identification of the gene(s) coding for the *trans*-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.*, 11: 1705-1710.
- PARSONS, M.; NELSON, R.G.; WATKINS, K.P. & AGABIAN, N. (1984). Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell*, 38: 309-316.
- PARSONS, M.; STUART, K. & SMILEY, B.L. (1991). *Trypanosoma brucei*: analysis of codon usage and nucleotide composition of nuclear genes. *Exp. Parasitol.*, 73: 101-105.
- PAYS, E. & MURPHY, N.B. (1987). DNA-binding fingers encoded by a trypanosome retroposon. *J. Mol. Biol.*, 197: 147-148.
- PEARSON, W.R. & LIPMAN, D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444-2448.
- PERALTA, J.M.; TEIXEIRA, M.G.M.; SHREFFLER, W.G.; PEREIRA, J.B.; BURNS, J.M., JR.; SLEATH, P.R. & REED, S.G. (1994). Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 971-974.

- PEREIRA, M.E.A.; MEJIA, J.S.; ORTEGA-BARRIA, E.; MATZILEVICH, D. & PRIOLI, R.P. (1991). The *Trypanosoma cruzi* neuraminidase contains sequences similar to bacterial neuraminidases, YWTD repeats of the low density lipoprotein receptor, and type III modules of fibronectin. *J. Exp. Med.*, 174: 179-191.
- PETERSON, D.S.; WRIGHTSMAN, R.A. & MANNING, J.E. (1986). Cloning of a major surface-antigen gene of *Trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat. *Nature*, 322: 566-568.
- PLUMAS-MARTY, B.; VERWAERDE, C.; LOYENS, M.; VELGE, P.; TAIBI, A.; CESBRON, M. -F.; CAPRON, A. & OUAISSI, M.A. (1992). *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins: immunogenicity during human and experimental Chagas' disease. *Parasitology*, 104: 87-98.
- POLLEVICK, G.D.; AFFRANCHINO, J.L.; FRASCH, A.C.C. & SÁNCHEZ, D.O. (1991). The complete sequence of a shed-acute phase antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 47: 247-250.
- POLLEVICK, G.D.; SANCHEZ, D.O.; CAMPETELLA, O.; TROMBETTA, S.; SOUSA, M.; HENRIKSSON, J.; HELLMAN, U.; PETTERSSON, U.; CAZZULO, J.J. & FRASCH, A.C.C. (1993). Members of the SAPA/trans-sialidase protein family have identical N-terminal sequences and a putative signal peptide. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 59: 171-174.
- PROUDFOOT, N. (1991). Poly(A) signals. *Cell*, 64: 671-674.
- RALPH, D.; HUANG, J. & VAN DER PLOEG, L.H.T. (1988). Physical identification of branched intron side-products of splicing in *Trypanosma brucei*. *EMBO J.*, 7: 2539-2545.
- RASSI, A.; LUQUETTI, A.O.; RASSI JUNIOR, A.; RASSI, S.G. & RASSI, A.G. (1992). Chagas disease - Clinical features. Em Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E. & Rassi, A. (editores) *Chagas disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*. ISBT Brazil'92, São Paulo, Brasil, pág. 81-101.
- REQUENA, J.M.; JIMENEZ-RUIZ, A.; SOTO, M.; LOPEZ, M.C. & ALONSO, C. (1992). Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 51: 271-280.

- REQUENA, J.M.; MARTÍN, F.; SOTO, M.; LÓPEZ, M.C. & ALONSO, C. (1994). Characterization of a short interspersed reiterated DNA sequence of *Trypanosoma cruzi* located at the 3'-end of a poly(A)⁺ transcript. *Gene*, 146: 245-250.
- REVELARD, P.; LIPS, S. & PAYS, E. (1993). Alternative splicing within and between alleles of the ATPase gene 1 locus of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 62: 93-102.
- REYES, M.B.; LORCA, M.; MUÑOZ, P. & FRASCH, A.C.C. (1990). Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2846-2850.
- ROMANHA, A.J.; PEREIRA, A.A.S.; CHIARI, E. & KILGOUR, V. (1979). Isoenzyme pattern of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B: 139-142.
- RUEF, B.J. & MANNING, J.E. (1993). Isolation and characterization of the TSA/*trans*-sialidase family gene from the Silvio strain of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 62: 117-120.
- RUSSOMANDO, G.; FIGUEREDO, A.; ALMIRÓN, M.; SAKAMOTO, M. & MORITA, K. (1992). Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 2864-2868.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 2ª edição. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.
- SARASTE, M.; SIBBALD, P.R.; WITTINGHOFER, A. (1990). The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 15: 430-434.
- SCHARFSTEIN, J.; SCHECHTER, M.; SENNA, M.; PERALTA, J.M.; MENDONÇA-PREVIATO, L. & MILES, M.A. (1986). *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of 57/51,000 m.w. surface glycoprotein (GP57/51) expressed in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J. Immunol.*, 137: 1836-1842.

- SCHERF, A.; MATTEI, D. & SCHREIBER, M. (1990). Parasite antigens expressed in *Escherichia coli*. A refined approach for epidemiological analysis. *J. Immunol. Methods*, 128: 81-87.
- SCHOFIELD, C.J. (1985). Control of Chagas' disease. *Br. Med. Bull.*, 41: 187-194.
- SCHOFIELD, L. (1991). On the function of repetitive domains in protein antigens of *Plasmodium* and other eukaryotic parasites. *Parasitol. Today*, 7: 99-105.
- SCHÖNECK, R.; PLUMAS-MARTY, B.; TAIBI, A.; BILLAUT-MULOT, O.; LOYENS, M.; GRASMASSE, H.; CAPRON, A. & OUAISSI, A. (1994). *Trypanosoma cruzi* cDNA encodes a tandemly repeated domain structure characteristic of small stress proteins and glutathione S-transferases. *Biol. Cell.*, 80: 1-10.
- SCHULER, G.D.; ALTSCHUL, S.F. & LIPMAN, D.J. (1991). A workbench for multiple alignment construction and analysis. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 9: 180-190.
- SCHÜRCH, N.; HEHL, A.; VASSELLA, E.; BRAUN, R. & RODITI, I. (1994). Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 3668-3675.
- SHAW, J.M.; FEAGIN, J.E.; STUART, K. & SIMPSON, L. (1988). Editing of Kinetoplastid mitochondrial mRNAs by uridine addition and deletion generates conserved amino acid sequences and AUG initiation codons. *Cell*, 53: 401-411.
- SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MARCONDES, C.B.; GUEDES, L.A.; SIQUEIRA, G.S.; BARONE, A.A.; DIAS, J.C.P.; AMATO NETO, V.; TOLEZANO, J.E.; PERES, B.A.; ARRUDA JR., E.R.; LOPES, M.H.; SHIROMA, M. & CHAPADEIRO, E. (1991). Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 33: 351-357.
- SHORT, J.M.; FERNANDEZ, J.M.; SORGE, J.A. & HUSE, W.D. (1988). λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res.*, 16: 7583-7600.
- SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.*, 20: 191-207.
- SIMONS, P.C. & VANDER JAGT, D.L. (1977). Purification of glutathione S-transferase from human liver by glutathione-affinity chromatography. *Anal. Biochem.*, 82: 334-341.

- SIMPSON, L. (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.*, 41: 363-382.
- SINGER, M.F. (1982). SINEs and LINEs: highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell*, 28: 433-434.
- SINGER, M.F. & SKOWRONSKI, J. (1985). Making sense out of LINES: long interspersed repeat sequences in mammalian genomes. *Trends Biochem. Sci.*, 10: 119-122.
- SKEIKY, Y.A.W.; BENSON, D.R.; GUDERIAN, J.A.; SLEATH, P.R.; PARSONS, M. & REED, S.G. (1993). *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P protein gene family - novel P proteins encoding unusual cross-reactive epitopes. *J. Immunol.*, 151: 5504-5515.
- SMILEY, B.L.; ALINE, R.F., JR.; MYLER, P.J. & STUART, K. (1990). A retroposon in the 5' flank of a *Trypanosoma brucei* VSG gene lacks insertional terminal repeats. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 42: 143-152.
- SMITH, D.B. & JOHNSON, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67: 31-40.
- SNYDER, M.; ELLEDGE, S.; SWEETSTER, D.; YOUNG, R.A. & DAVIS, R.W. (1987). λ gt11: gene isolation with antibody probes and other applications. *Methods Enzymol.*, 154: 107-128.
- SOARES, C.M.A.; CARVALHO, E.F.; URMÉNYI, T.P.; CARVALHO, J.F.O.; CASTRO, F.T. & RONDINELLI, E. (1989). α - and β -tubulin mRNAs of *Trypanosoma cruzi* originate from a single multicistronic transcript. *FEBS Lett.*, 250: 497-502.
- SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517.
- SOUTO, R.P. & ZINGALES, B. (1993). Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 62: 45-52.
- SOUZA, S.L. & CAMARGO, M.E. (1966). The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for american trypanosomiasis serodiagnosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 8: 255-258.

- STEERS, E., JR.; CUATRECASAS, P. & POLLARD, H.B. (1971). The purification of β -galactosidase from *Escherichia coli* by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.*, 246: 196-200.
- STUART, K. (1983). Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 9: 93-104.
- STURM, N.R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C. & SIMPSON, L. (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 33: 205-214.
- STURM, N.R. & SIMPSON, L. (1990a). Partially edited mRNAs for cytochrome b and subunit III of cytochrome oxidase from *Leishmania tarentolae* mitochondria: RNA editing intermediates. *Cell*, 61: 871-878.
- STURM, N.R. & SIMPSON, L. (1990b). Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell*, 61: 879-884.
- SUTTON, R.E. & BOOTHROYD, J.C. (1986). Evidence for *trans* splicing in trypanosomes. *Cell*, 47: 527-535.
- SWANSTROM, R. & SHANK, P.R. (1978). X-ray intensifying screens greatly enhance the detection by autoradiography of the radioactive isotopes ^{32}P and ^{125}I . *Anal. Biochem.*, 86: 184-192.
- TACKLE, G.B. & CROSS, G.A.M. (1991). An 85-kilodalton surface antigen gene family of *Trypanosoma cruzi* encodes polypeptides homologous to bacterial neuraminidases. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 48: 185-198.
- TACKLE, G.B.; YOUNG, A.; SNARY, D.; HUDSON, L. & NICHOLLS, S.C. (1989). Cloning and expression of a trypomastigote-specific 85-kilodalton surface antigen gene from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 37: 57-64.
- TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M. & WITTNER, M. (1992). Chagas' disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 5: 400-419.

- TEIXEIRA, A.R.L.; CORDOVA, J.C.; SOUTO MAIOR, I. & SOLORZANO, E. (1990a). Chagas's disease: lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 43: 146-158.
- TEIXEIRA, A.R.L.; SILVA, R.; CUNHA NETO, E.; SANTANA, J.M. & RIZZO, L.V. (1990b). Malignant, non-Hodgkin's lymphomas in *Trypanosoma cruzi*-infected rabbits treated with nitroarenes. *J. Comp. Pathol.*, 103: 37-48.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354.
- TRIPATHI, R. L. (1992). Alternative dideoxy sequencing of double-stranded DNA. *BioTechniques*, 12: 390-391.
- TIBAYRENC, M. & AYALA, F.J. (1987). *Trypanosoma cruzi* populations: more clonal than sexual. *Parasitol. Today*, 3: 189-190.
- TIBAYRENC, M. & AYALA, F.J. (1988). Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution*, 42: 277- 292.
- TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F. & AYALA, F.J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2414-2418.
- TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A. & AYALA, F.J. (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 115-119.
- UEMURA, H.; SCHENKMAN, S.; NUSSENZWEIG, V. & EICHINGER, D. (1992). Only some members of a gene family in *Trypanosoma cruzi* encode proteins that express both *trans*-sialidase and neuraminidase activities. *EMBO J.*, 11: 3837-3844.
- UMEZAWA, E.S.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; GRUBER, A.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. & ZINGALES, B. (1994). Chagas' disease: reactivity of acute phase antibodies to defined antigens of *Trypanosoma cruzi*. Manuscripto em preparação.

- UMEZAWA, E.S; STOLF, A.M.S. & ZINGALES, B. (1993). *Trypanosoma cruzi*: different surface antigens of trypomastigotes are targets of lytic antibodies. *Acta Trop.*, 54: 41-53.
- VAITUKAITIS, J.L. (1981). Production of antisera with small doses of immunogen: multiple intradermal injections. *Methods Enzymol.*, 73: 47-52.
- VAN DER PLOEG, L.H.T.; LIU, A.Y.C.; MICHELS, P.A.M.; DE LANGE, T.; BORST, P.; MAJUMDER, H.K.; WEBER, H.; VEENEMAN, G.H. & VAN BOOM, J. (1982). RNA splicing is required to make the messenger RNA for a variant surface antigen in trypanosomes. *Nucleic Acids Res.*, 12: 3591-3604.
- VAN VOORHIS, W.C.; BARRET, L.; KOELLING, R. & FARR, A.G. (1993). FL-160 proteins of *Trypanosoma cruzi* are expressed from a multigene family and contain two distinct epitopes that mimic nervous tissues. *J. Exp. Med.*, 178: 681-694.
- VAN VOORHIS, W.C. & EISEN, H. (1989). Fl-160: a surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J. Exp. Med.*, 169: 641-652.
- VAN VOORHIS, W.C.; SCHLEKEWY, L. & TRONG, H.L. (1991). Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the Fl-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5993-5997.
- VERGARA, U.; LORCA, M.; VELOSO, C.; GONZALEZ, A.; ENGSTROM, Å.; ÅSLUND, L.; PETTERSSON, U. & FRASCH, A.C.C. (1991). Assay for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies in human sera based on reaction with synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 2034-2037.
- VERGARA, U.; VELOSO, C.; GONZALEZ, A. & LORCA, M. (1992). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas' disease using synthetic peptides. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 46: 39-43.
- VICKERMAN, K. (1985). Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br. Med. Bull.*, 41: 105-114.
- VICKERMAN, K. (1986). Clandestine sex in trypanosomes. *Nature*, 322: 113-114.

- VILLANUEVA, M.S.; WILLIAMS, S.P.; BEARD, C.B.; RICHARDS, F.F. & AKSOY, S. (1991). A new member of a family of site-specific retrotransposons is present in the spliced leader RNA genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 6139-6148.
- VON HEIJNE, G. (1985). Signal sequences: the limits of variation. *J. Mol. Biol.*, 184: 99-105.
- VON HEIJNE, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.*, 14: 4683-4690.
- WADA, K.; WADA, Y.; ISHIBASHI, F.; GOJOBORI, T. & IKEMURA, T. (1992). Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nucleic Acids Res. (suppl.)*, 20: 2111-2118.
- WALDER, J.A.; EDER, P.S.; ENGMAN, D.M.; BRENTANO, S.T.; WALDER, R.Y.; KNUTZON, D.S.; DORFMAN, D.M. & DONELSON, J.E. (1986). The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNA's. *Science*, 233: 569-571.
- WALKER, J.E.; SARASTE, M.; RUNSWICK, M.J.; GAY, N.J. (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, 1: 945-951.
- WANG, B. & SODJA, A. (1991). Alternate approach to sequencing double-stranded template DNAs. *BioTechniques*, 10: 198-201.
- WENDEL, S. & BRENER, Z. (1992). Historical aspects. Em Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E. & Rassi, A. (editores) *Chagas disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*. ISBT Brazil'92, São Paulo, Brasil, pág. 5-12.
- WINCKER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, J.B.; CARDOSO, M.A.; OELEMANN, W. & MOREL, C.M. (1994). Use of simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (no prelo).
- WINCKER, P.; ROIZES, G. & GOLDENBERG, S. (1990). Characterization of a *Trypanosoma cruzi* specific nuclear repeated sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 41: 147-152.
- XIONG, Y. & EICKBUSH, T.H. (1990). Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.*, 9: 3353-3362.

- YANISH-PERRON, C.; VIEIRA, J. & MESSING, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33: 103-119.
- YAWETZ, A. & AGOSIN, M. (1981). Purification of the glutathione S-transferase of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68B: 237-243.
- YOSHIDA, N. (1983). Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, 40: 836-839.
- YOUNG, R.A. & DAVIS, R.W. (1983a). Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 1194-1198.
- YOUNG, R.A. & DAVIS, R.W. (1983b). Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes. *Science*, 222: 778-782.
- ZINGALES, B.; ANDREWS, N.W.; KUWAJIMA, V.Y. & COLLI, W. (1982). Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 6: 111-124.
- ZINGALES, B. & COLLI, W. (1985). *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 117: 129-152.
- ZINGALES, B.; GRUBER, A.; RAMALHO, C.B.; UMEZAWA, E.S. & COLLI, W. (1990). Use of two recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85: 519-522.
- ZINGALES, B.; PEREIRA, M.E.S.; ALMEIDA, K.A.; OLIVEIRA, R.P.; GONÇALVES, A.; SOUTO, R.P. & UMEZAWA, E.S. (1994) *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular markers of the CL Brener clone. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Suppl.)*, 89: 115.
- ZWIERZYNSKI, T.A.; WIDMER, G. & BUCK, G.A. (1989). *In vitro* 3' end processing and poly(A) tailing of RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res.*, 17: 4647-4660.

CURRICULUM VITAE

Nome: Arthur Gruber

Local e data de nascimento: São Paulo, 13/03/65

EDUCAÇÃO:

Colégio Equipe, São Paulo, SP, 1980-1982.

Fac. de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1983-1987
Médico Veterinário

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 1988-1994
Doutor em Bioquímica

OCUPAÇÃO:

Auxiliar de ensino, Fac. de Medicina da Fundação ABC, 1989 até o presente.

PUBLICAÇÕES:

Gruber, A.; Mós, E.N.; Durigon & Noronha, A.M.B. (1985). Prevalência de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em fezes normais e diarréicas de cães em São Paulo. *Rev. Microbiol.*, 16: 287-289.

Zingales, B.; Gruber, A.; Ramalho, C.B.; Umezawa, E.S. & Colli, W. (1990). Use of two recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85: 519-522.

Gruber, A. & Zingales, B. (1993). *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Exp. Parasitol.*, 76: 1-12.

Zingales, B.; Golgher, D.B.; Marmorato, P.G.; Souto, R.P & Gruber, A. (1993). Molecular approaches to diagnosis of Chagas' disease: use of defined antigens and a target ribosomal RNA sequence. *Biol. Res.*, 26: 89-100.

Cunha-Neto, E.; Duranti, M.; Gruber, A.; Zingales, B.; Messias, I.; Stolf, N.; Bellotti, G.; Patarroyo, M.E.; Pilleggi, F. & Kalil, J. (1995). Autoimmunity in Chagas' disease: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (no prelo).