UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

BIBLIOTECA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

2 = 19616

**CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE cDNA COM PCR DE BAIXA
ESTRINGÊNCIA E *PRIMERS* HÍBRIDOS
E CLONAGEM DE UMA APIRASE DE *Schistosoma mansoni***

JULIANA LOPES RANGEL FIETTO

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: PROF. DR. SERGIO VERJOVSKI ALMEIDA

São Paulo – 14/03/2001

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta tese)

T
574.82
64682

DEDALUS - Acervo - CQ

30100003858

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Fietto, Juliana Lopes Rangel

F468c   Construção de bibliotecas de cDNA com PCR de baixa
estrangência e *primers* híbridos e clonagem de uma apirase
de *Schistosoma mansoni* / Juliana Lopes Rangel Fietto. --
São Paulo, 2001.
180p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Verjovski-Almeida, Sergio

1. Biologia molecular 2. Bioquímica I. T. II. Verjovski-
Almeida, Sergio, orientador.

574.88 CDD

***"Construção de Bibliotecas de cDNA com
PCR de Baixa Estringência e Primers
Híbridos e Clonagem de uma Apirase de
Schistosoma mansoni"***

JULIANA LOPES RANGEL FIETTO

*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*

Aprovado por:

Prof. Dr. SÉRGIO VERJOVSKI DE ALMEIDA
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. HAMZA FAHMI ALI EL DORRY
IQ - USP

Prof. Dr. SHAKER CHUCK FARAH
IQ - USP

Profa. Dra. LUCILE MARIA FLOETER WINTER
ICB - USP

Prof. Dr. EMMANUEL DIAS NETO
Ludwig

SÃO PAULO
14 DE MARÇO DE 2001.

*"Nesta vida, pode-se
aprender três coisas
de uma criança:
estar sempre alegre,
nunca ficar inativo e
chorar com força por
tudo o que se quer."*

Paulo Leminski

Dedico este trabalho à:

À minha amada mãe, Anna Amélia.

À memória de meu pai, Nello Nuno.

Ao Luciano com amor.

Ao nosso filho Matheus.

À todos da minha família.

A Deus, eterna força e sabedoria, e a
todos seus ajudantes iluminados

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sergio Verjovski pela orientação, total disponibilidade a qualquer momento e compreensão nas horas difíceis.

Aos professores do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica que de alguma forma contribuíram para esta tese. Ao setor de enteroparasitoses do Instituto Adolfo Lutz.

À Lucivanda e Cláudio, por compartilharem muitos momentos de amizade.

Aos colegas do laboratório da Prof. Dra. Suely Lopes Gomes, pelos conselhos, empréstimos, companheirismo e, principalmente, amizades. As amigas Fabiana Almeida e Juliana Moreira.

Aos amigos e colegas do Lab: Alessandra, Vítor, Ivan, Ivone, Paulinho, Ricardo, Eduardo, Adriana, Gilson, Jefferson, Rodrigo, Renato, Katlin, Denise, Flávio, André, Ana Cláudia, Milton, Apuã, Ana Paula, Rafael e Felipe.

A todos do LBFM (Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Microorganismos) da Universidade Federal de Ouro Preto, onde tudo começou, especialmente aos Professores Rogério Lopes Brandão e Ileso de Miranda Castro.

Aos grandes amigos Márcia e Alexandre, por todos os “galhos quebrados”, companheirismo e sincera amizade. Ao Léleo e a Marianinha, sobrinhos do coração.

A todos meus irmãos, Alessandra, Nello, Gabriela, Tatiana, Bruno e Bernardo, por estarem sempre comigo mesmo em pensamento.

Aos meus queridos sobrinhos, Larissa, Nuno, Gustavo, Guilherme, Taiana, Lia, Vinícius e Fernando.

A D. Darcy e Sr. Ildeu Fietto, com muito amor e gratidão, a todos da família Fietto da qual faço parte de corpo e alma.

Ao Luciano meu companheiro de todas as horas.

Ao Matheus, filho adorado, luz da minha vida.

A minha mãezinha querida, não tenho palavras que possam expressar meu agradecimento por cada etapa da vida cumprida.

A todos que de uma forma ou de outra participaram desta etapa da minha vida.

ÍNDICE

	Página
Agradecimentos	III
Índice	IV
Resumo	VIII
Summary	IX
Abreviações	X
1-Introdução	1
1.1- A esquistossomose e o <i>Schistosoma mansoni</i>	1
1.2- O tegumento do <i>Schistosoma</i>	9
1.3- <i>Schistosoma mansoni</i> – Aspectos Imunológicos	11
1.4- Nucleotídeos extracelulares e ATP-difosfohidrolase (ecto-ATPase, apirase, NTPDase, ATPDase)	13
1.5- A ATP-difosfohidrolase do tegumento do <i>S. mansoni</i>	17
2- Objetivos	22
3- Materiais e Métodos	24
3.1- Materiais	24
3.2- Lista de Primers	23
3.3- Manutenção do Ciclo Biológico do <i>S. mansoni</i> e obtenção de parasitas	25
3.4- Extração de tegumento de verme adulto	26
3.5- Determinação da concentração de proteínas	26
3.6- - Purificação parcial da ATP difosfohidrolase de tegumento de <i>S. mansoni</i> através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes	27
3.7- Coloração de proteína pelo método de impregnação pela prata	28
3.8- Medidas de hidrólise de nucleotídeos	28
3.9 - Imunoprecipitação de citoqueratina em amostras de apirase semi-purificada por gel não desnaturante	29

3.10 - Purificação em colunas da proteína com atividade ADPásica de amostras de tegumento de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	30
3.11- Western blots	31
3.12- Obtenção de antisoro policlonal anti-apirase de batata	32
3.13- Extração de DNA genômico de <i>S. mansoni</i>	33
3.14- Extração de RNA total de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	34
3.15- Extração de mRNA de vermes adultos e tegumento de <i>S. mansoni</i>	34
3.16- PCR de colônia	34
3.17- Sequenciamento dos clones em aparelho ABI-377 (Perkin Elmer)	35
3.18- Mini-preparações plasmidiais ("mini-preps")	35
3.19- Extração de plasmídeos por fervura ("boiling-prep") para sequenciamento	36
3.20- Ligação de fragmentos de DNA à plasmídeos	37
3.21- Obtenção de células competentes para transformação por eletroporação	37
3.22- Experimentos de transformação	38
3.23- Construção das bibliotecas de cDNA com primers híbridos e PCR de baixa estringência	38
3.24- Coloração dos perfis de cDNA pelo método de impregnação pela prata	39
3.25- Reações de amplificação das extremidades gênicas 5' e 3' do provável gene CD39 de <i>S. mansoni</i>	39
3.26- Isolamento dos fragmentos amplificados em RACE-PCR para ligação em vetor	40
4- Resultados e Discussão	41
4.1- Purificação de uma enzima com atividade ATP-difosfohidrolásica	41
4.2- - Caracterização da atividade apirásica do tegumento de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> , presente na fração de proteínas solúveis em Triton X-100	55
4.2.1- Determinação das atividades de hidrólise de ADP e ATP em vermes machos e fêmeas	55
4.2.1- Efeito do pH na atividade ADPásica do sobrenadante 100.000 g	58
4.3- Clonagem do gene codificante da ATP-difosfohidrolase de <i>S. mansoni</i>	64

4.3.1- CODEHOP (Consensus degenerate Oligonucleotide Primer)	66
4.3.2- Desenho dos Primers Híbridos Consensu- Degenerados	69
4.3.3- Identificação de Novos Genes de <i>S. mansoni</i> através PCR com Primers Híbridos desenhados para Apirase, em DNA Genômico	72
4.3.4- RT-PCR com primers híbridos (CODEHOP)	77
4.3.4.1- Integridade do RNA	79
4.3.4.2- Influência do Touch-Down PCR	82
4.3.4.3- Influência da Diluição do Tampão e Diminuição da Velocidade de Rampa de Anelamento	84
4.3.4.4- Influência do Touch-down na Combinação de Diluição do Tampão e Diminuição da Velocidade de Rampa	86
4.3.4.5- Caracterização dos Produtos Amplificados (Mini-bibliotecas)	88
4.3.5- Clonagem de um Gene Codificando uma Apirase em Tegumento de <i>S. mansoni</i> Similar à CD39 de Camundongo	99
4.3.5.1 – RT-PCR com primers sem “clamp” em RNAm de Tegumento de vermes adultos	99
4.3.5.2- Clonagem do Gene Homólogo a CD39 de camundongo através de RACE-PCR	104
5- Conclusões e Perspectivas	122
5.1- Purificação e Caracterização de uma enzima com atividade apirásica no tegumento do <i>Schistosoma</i>	122
5.2 - Construção de minibibliotecas de cDNA através de RT-PCR de baixa estringência com primers híbridos consenso degenerados e touch-down PCR (uma modificação da técnica ORESTES)	124
5.3 - Clonagem parcial de um gene homólogo à CD39, uma apirase, no tegumento de <i>Schistosoma</i> .	126
6- Bibliografia	128

7- Curriculum vitae	137
8- Anexos	139
Addendum to Patent Application # 196,716- Costruction of ORESTES cDNA libraries using Touch-down PCR.	140
Artigos em preparação	157
1- cDNA Libraries Constructed with Arbitrary Consensus-degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers and Low-stringency RT-PCR.	158
2- Analysis of <i>Schistosoma mansoni</i> ESTs generated by Arbitrary Consensus-degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers and Low-stringency RT-PCR.	174

RESUMO

Este trabalho mostrou a purificação de uma apirase em extratos de tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* com razão de hidrólise de ADP/ATP aproximadamente 2. Análise da amostra por MALDI-TOF evidenciou a presença de helicase e carboxilesterase, sendo que a atividade de hidrólise de ADP ainda não foi descrita para estas proteínas. Através de “Western blot” mostrou-se que a proteína purificada não tem epítomos reconhecíveis por anticorpo anti-apirase de batata, e que a imunoreatividade cruzada com apirase da família CD39 está presente na fração insolúvel que não foi utilizada no processo de purificação.

Esta tese caracteriza também a utilização de “primers” consenso degenerados na construção de bibliotecas de cDNA com PCR de baixa estringência. A introdução do “touch-down” PCR aumentou o número médio de sequências não redundantes por biblioteca de 20 para 40. O “touch-down” associado ao uso de primers híbridos consenso-degenerados (40 pb) elevou a média de sequências não redundantes para 300. Este número significa uma diminuição de cerca de 10 vezes na quantidade de trabalho de clonagem e sequenciamento necessário para se gerar o mesmo montante de dados (Fietto et al., 2000, addendum patent application N°196,716). A diminuição da concentração de sal na reação e abaixamento da velocidade de rampa entre os passos de anelamento e extensão gerou os melhores perfis de amplificação de cDNA. Bibliotecas feitas com primers híbridos mais curtos (25 pb) mostraram-se mais redundantes, refletindo uma maior especificidade por certas sequências alvo. Com estes primers, usando-se RNAm de tegumento, clonamos um fragmento parcial de cDNA altamente homólogo à CD39 de camundongo. Esta sequência serviu como base para o isolamento de grande parte do gene de *Schistosoma* (2,9 Kb) através de RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends).

SUMMARY

This work shows purification of an apyrase from the tegument membrane of *S. mansoni* adult worms that exhibited an ADP/ATP hydrolysis ratio near 2. MALDI-TOF analyses showed that helicase and carboxylesterase were present in the sample, however in the literature there is no ADPase activity described for either enzyme. Western blot analyses showed that the purified apyrase has no epitopes common to members of the CD39 apyrase family. On the other hand, a CD39-like apyrase remained in the insoluble fraction that was not used in the purification procedures.

This work studied the construction of cDNA libraries with Hybrid Consensus-degenerate Oligonucleotide Primers (40bp) and low stringency RT-PCR. Introduction of touch-down PCR in the standard ORESTES technique improved the number of non-redundant sequences per library twofold. Association of touch-down with hybrid consensus-degenerated oligonucleotide primers increased this number to 300 sequences per library. The modifications resulted in a 10-fold decrease in the amount of work required for libraries construction and high-throughput sequencing (Fietto et al., 2000; addendum to patent application #196,716 - Ludwig Institute for Cancer Research). The best amplification profiles were obtained in RT-PCR reactions with low salt and a slow temperature ramp. Libraries made with shorter hybrid primers (25bp) showed more redundant sequences, reflecting a higher specificity for few templates. These shorter primers were used in combination with tegument mRNA to clone a gene fragment homologous to CD39 of mouse. This sequence was used in RACE-PCR reactions (rapid amplification of cDNA ends) to clone a 2.9 Kb cDNA corresponding to most of the predicted coding sequence of the *Schistosoma* gene.

ABREVIACÕES

AMP- Adenosina mono-fosfato

C₁₂E₈ - Octaetilenoglicol-mono-n-dodecileter

cDNA - DNA complementar ao RNA mensageiro

DNAg – DNA genômico

DOC - Deoxicolato de sódio

EDTA - Ácido etilenodiamino tetraacético

FSBA - 5'-p-Fluorosulfonilbenzoil adenosina

HPLC - Cromatografia líquida de alta resolução

IPTG - Isopropiltio-β-D-galactosídeo

LPC - Lisofosfatidilcolina

MES - Ácido 2-[N-morfolino]-etano sulfônico

MOPS - Ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico

NTPase - Nucleosídeo trifosfato hidrolase

P/V- peso por volume

PBS - Tampão salina fosfato

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil

RACE - Amplificação rápida das extremidades de cDNAs

RNA_m - RNA mensageiro

RNA_r – RNA ribossomal

RPM - rotações por minuto

SDS - Dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio

TEMED - N,N,N',N'- tetrametiletlenodiamina

TRIS - Tris (hidroximetil) aminometano

TRITON-X-100- Polioxietilenoglicol (9-10)p-t-actilfenol

W.H.O. - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

1- INTRODUÇÃO

1.1 – A esquistossomose e o *Schistosoma mansoni*

Schistosoma mansoni é o principal agente etiológico da esquistossomose ou bilhardose em humanos. Esta doença constitui hoje um dos maiores problemas de saúde pública em vários países tropicais, com uma estimativa de 600 milhões de pessoas em 74 países em risco de infecção, enquanto 200 milhões são correntemente infectadas. Estima-se que 120 milhões de indivíduos são assintomáticos e 20 milhões sofrem consequências severas devido á doença (World Health Organization, 1996). A esquistossomose afeta uma alta proporção de crianças nas idades entre 10 e 19 anos. Afeta adultos, principalmente em áreas rurais, estando também presente em regiões endêmicas não rurais. Estima-se que 20.000 óbitos anuais estão associados com a esquistossomose. Estas infecções estão em sua maioria associadas com câncer de bexiga, falha renal associada com esquistossomose urinária ou hipertensão portal e fibrose associada com a forma intestinal da doença (Organização mundial de saúde, W.H.O., 1996).

Estima-se que 80% dos casos da doença, incluindo a maioria dos casos de formas severas, estão concentrados na África. Porém existem vários países considerados como regiões endêmicas, incluindo nestes o Brasil.

A esquistossomose é causada por trematódeos sanguíneos digenéticos. Os esquistossomos são membros da família Schistosomatidae, classe Trematoda, sub-classe Digenea. Dentro desta família, somente o gênero *Schistosoma* possui espécies que parasitam o homem. As três principais espécies que infectam seres humanos são: *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*. Outras espécies de schistosomas, que parasitam pássaros e outros vertebrados, podem causar dermatite cercarial em humanos.

S. haematobium, responsável pela esquistossomose urinária, é encontrado em 53 países do Oriente Médio e África, incluindo as ilhas de Madagascar e Mauritius. Existe também um foco definido na Índia. Com a recente introdução do *S. mansoni* na Mauritânia, Senegal e Somália, a esquistossomose intestinal é encontrada atualmente em 54 países, incluindo a península Arábica,

Egito, Líbia, Sudão, Brasil, algumas ilhas Caribenhas, Suriname e Venezuela. O *S. intercalatum* é encontrado em 10 países da África central e o *S. japonicum* na China, Indonésia, Filipinas e Tailândia. Outro schistosoma oriental é o *S. mekongi* encontrado no Camboja e Laos, ao longo do rio Mekong. A seguir podemos ver um mapa (FIGURA 1) mostrando a distribuição geográfica e estado atual da esquistosomose, de acordo com a Organização Mundial de Saúde.

FIGURA 1- Distribuição geográfica da esquistosomose de acordo com a organização mundial de saúde (2001).

A esquistosomose é uma doença crônica, os parasitas vivem na vasculatura mesentérica do hospedeiro por vários anos escapando efetivamente da resposta imune e hemostática. As manifestações patológicas são principalmente causadas pela resposta granulomatosa dependente de células-T do hospedeiro frente a deposição de ovos dos vermes nos tecidos (Capron & Dessaint, 1992). A lesão fibrótica crônica que se forma ao redor dos ovos retidos nos tecidos é uma das mais importantes complicações da infecção, sendo responsável por efeitos tardios como obstrução venosa, hepatoesplenomegalia e ascite (Neves & Souza, 1983). Os principais sintomas da doença são a presença de sangue na urina (em casos de esquistosomose urinária) podendo

levar ao aparecimento de câncer de bexiga ou problemas nos rins ou, no caso de infecção intestinal, diarreia sanguinolenta, ou não, que pode levar a sérias complicações no fígado e baço. Os indivíduos infectados são seriamente afetados pela doença, o que gera graves consequências ao desenvolvimento sócio-econômico das regiões afetadas.

No caso da esquistosomose intestinal, os vermes residem nos vasos sanguíneos que revestem o intestino. Na forma urinária eles predominam nos vasos sanguíneos que revestem a bexiga. Cerca de metade dos ovos são eliminados nas fezes ou urina e o restante é retido nos tecidos, danificando outros órgãos vitais. São os ovos e não os vermes adultos, que causam dano aos intestinos, bexiga e outros órgãos.

As pessoas são infectadas quando entram em contato com água contaminada durante suas atividades diárias normais. Devido à falta de informação ou atenção insuficiente quanto à higiene, indivíduos infectados contaminam o meio ambiente quando defecam ou urinam em regiões próximas a rios ou lagos.

Os ciclos biológicos das espécies de *Schistosoma* que afetam o ser humano são muito semelhantes entre si, envolvendo sempre um hospedeiro intermediário invertebrado (normalmente um molusco do gênero *Biomphalaria*), onde ocorre a fase assexuada multiplicativa do ciclo, e tendo como hospedeiro definitivo um vertebrado, no qual se dá a reprodução sexuada.

No hospedeiro definitivo os esquistossômulos (forma imatura do parasita) residem nas veias intra-hepáticas do sistema porta, onde se alimentam e desenvolvem até o estágio adulto. O *S. mansoni* é principalmente encontrado nas veias mesentéricas superiores, enquanto o *S. japonicum* comumente habita as veias mesentéricas inferiores e o *S. haematobium* nas veias vesicais (estas localizações podem variar). Os vermes adultos sexualmente maduros, vivem aos pares no sangue onde podem sobreviver por uma média de cinco anos, podendo chegar até a 20 anos (Capron & Dessaint, 1992). As fêmeas depositam, nas pequenas vênulas dos sistemas porta e perivesical, cerca de 300 ovos por dia. Os ovos são progressivamente levados até o lúmen do intestino (*S. mansoni* e *S. japonicum*) ou para a bexiga e uretra (*S. haematobium*), e são eliminados com as fezes ou urina, respectivamente. Os ovos também podem ser encontrados em locais não habituais como: pulmões, baço, pâncreas e sistema nervoso central.

Em condições ótimas (água doce, limpa e temperatura em torno de 28°C), os ovos eclodem e liberam os miracídeos. Estas formas larvais então nadam e penetram especificamente moluscos do gênero *Biomphalaria* como hospedeiros intermediários. O desenvolvimento dos miracídeos no molusco envolve 2 gerações de esporocistos e a produção das cercárias (forma larval infectante dos hospedeiros vertebrados definitivos). Estas larvas quando maduras são liberadas na água e nadam à procura do hospedeiro. Uma vez em contato com este, as larvas penetram ativamente através da pele ou mucosa. A penetração na base da epiderme se completa em cerca de 30 minutos. A penetração na membrana basal da epiderme, usualmente a maior barreira para a migração do parasita, leva 1 ou 2 dias. Uma vez na derme, os *Schistosomas* encontram vasos sanguíneos ou linfáticos, onde penetram e são transportados pelo sistema circulatório até o coração e pulmões. Após 5 ou 6 semanas de desenvolvimento, eles migram para a vasculatura intestinal ou urinária e começam a oviposição completando assim o ciclo de vida. Um quadro ilustrativo do ciclo de vida do *Schistosoma* pode ser visto na FIGURA 2.

FIGURA 2 - Ciclo de Vida do *Schistosoma*

Os métodos atuais para o diagnóstico da esquistossomose podem ser divididos em três categorias: (1) método parasitológico direto; (2) métodos imunológicos e (3) métodos indiretos. Este último inclui interpretação dos sintomas clínicos, exames ultrasonográficos, medidas de marcadores da doença ou morbidade e a aplicação de questionários. Embora estas possam oferecer informações válidas em regiões de moderada a alta endemicidade, seu uso é limitado em áreas de baixa transmissão por causa da falta de especificidade. Estas técnicas são mais relacionadas à presença atual da doença do que à infecção. Os dados clínicos não são confiáveis pois os sintomas observados nos estágios iniciais da infecção podem ser facilmente confundidos com outras doenças como por exemplo malária, febre tifóide ou influenza (Harries & Cook, 1987). Para o diagnóstico de infecções recentes, a determinação de anticorpos específicos mostra ser bastante sensível, particularmente em indivíduos originários de regiões não endêmicas. Para a avaliação de cura e para o diagnóstico de infecção ativa em áreas endêmicas, os métodos de escolha são o exame parasitológico de fezes e a determinação dos antígenos circulantes anódico e catódico, respectivamente CAA e CCA. Dependendo do nível de infecção da população alvo, a determinação de CAA e CCA pode substituir o exame parasitológico ou, em casos de infecções leves, pode ser usado como diagnóstico complementar (L. Van Lieshout et al., 2000).

O diagnóstico de uma infecção ativa por *Schistosoma* é relativamente fácil em casos de alta carga de vermes, o que é acompanhado por grande excreção de ovos. Porém quando as infecções não são intensas, a demonstração da presença de ovos se mostra muito difícil devido à grande variação da oviposição diária e a relativa baixa quantidade de ovos (Barreto et al., 1978; Yogore et al., 1983; Teesdale et al., 1985). Somente quando a coleta e exame são repetidos mais de 5 vezes é que casos positivos adicionais podem ser demonstrados (Engels et al., 1996).

A sensibilidade do exame parasitológico pode ser aumentada usando-se métodos de concentração como sedimentação e filtração das amostras. Pode-se fazer também biópsia retal de pacientes com baixa infecção ou para verificação de cura após tratamento, mas a sensibilidade deste método não é maior que o exame de amostras repetitivo e por ser uma técnica invasiva não é aceita como procedimento de rotina.

Em infecções por *S. haematobium* os ovos podem ser bem mais facilmente detectados porque o volume de urina analisado é relativamente maior que a quantidade de amostra examinada para esquistossomose intestinal (Feldmeier and Poggenesee, 1993).

Para a demonstração de anticorpos específicos uma variedade de testes tem sido descrita. Pode-se usar antígenos brutos, purificados ou recombinantes e detecção de isotipos específicos de anticorpos. Estas técnicas têm se mostrado bastante sensíveis, sendo usadas em infecções com baixa carga parasitária ou pouco tempo de exposição à infecção. Vários estudos têm descrito aperfeiçoamentos nas técnicas de soro-diagnóstico usando antígenos purificados, como por exemplo o antígeno de ovo CEF6 no lugar da utilização de extratos brutos como SEA (extrato bruto de cercárias), como citado por Doenhoff et al., 1993.

Apesar da alta afinidade e sensibilidade das detecções via anticorpos estas não permitem avaliar a intensidade da infecção porque os níveis elevados de anticorpos podem ser detectados vários anos depois do tratamento (W.H.O., 1995).

Vários antígenos são liberados pelos parasitas na circulação sanguínea do hospedeiro e a detecção destes é utilizada no diagnóstico. Estes antígenos podem ser classificados, de acordo com o estágio de desenvolvimento do parasita, em antígenos de cercárias, vermes adultos (associados ao tegumento ou intestino) e antígenos de ovos. A maioria dos antígenos circulantes pertence à classe dos antígenos de vermes adultos associados ao intestino. Estes antígenos são liberados na circulação do hospedeiro pela regurgitação do parasita. A maioria dos pesquisadores enfoca os glico-conjugados CAA e CCA (Deelder et al., 1994) em seus trabalhos. Vários estudos, em diferentes espécies de *Schistosoma*, têm mostrado uma correlação significativa entre o nível de antígeno e o número de vermes adultos após perfusão (Barsoum et al., 1990, Van Dam et al., 1996a). Depois do tratamento, os níveis de antígeno decrescem rapidamente (Barsoum et al., 1990).

Além dos estudos com os antígenos CAA e CCA, outros antígenos circulantes, associados com diferentes estágios do ciclo de vida do parasita, têm sido pesquisados para sua aplicação em diagnóstico, mas apenas poucos destes estão sendo caracterizados e o número de estudos em humanos é limitado. Porém nenhum outro antígeno circulante, além de CAA e CCA, foi validado

para o uso em diagnóstico de infecções recentes ou leves em populações humanas (Van Lieshout et al., 2000).

Técnicas de ultrasonografia têm sido aplicadas para estudos epidemiológicos, assim como para o planejamento de programas de controle da infecção, reunião de dados patogênicos da doença e avaliação da regressão ou reaparecimento da infecção após tratamento (Butterworth et al., 1998). Estes estudos são mais eficazes em casos de esquistossomose urinária. Em casos de esquistossomose mansônica estudos de ultrasonografia são importantes para a identificação de fibrose peri-portal, condição que pode levar à hipertensão portal, varizes esofágicas e hemorragia gastrointestinal. A fibrose peri-portal é encontrada, geralmente, após anos de infecção; mas já foi descrita em crianças. Em lesões de grau leve ou identificação específica da lesão, este método se mostra menos efetivo.

Existe uma variedade de drogas anti-parasitárias já descritas para o tratamento da esquistossomose (Pessoa & Martins, 1982), porém, atualmente o praziquantel é a droga de escolha para o tratamento de casos individuais de esquistossomose. Este é um derivado pirazino-isoquinoleínico, sendo um anti-helmíntico seletivo com atividades trematocidas e cestocidas e sem nenhuma atividade aparente contra organismos maiores, tais como os nematódeos. O praziquantel interage com sítios específicos permeáveis ao cálcio no tegumento e membrana sarcoplasmática do parasita e sob condições elevadas da razão $Mg^{2+} : Ca^{2+}$, estes sítios se tornam bloqueados pelo Mg^{2+} , levando à contração, flacidez e paralisia do verme (Blair et al., 1992).

O tratamento com esta droga é a principal ferramenta da maioria dos programas de controle internacional da infecção por *Schistosoma*. Este medicamento é administrado para milhões de pessoas em países endêmicos. Alguns trabalhos recentes têm mostrado uma baixa eficácia do praziquantel tendo sido mostradas cepas do parasita resistentes à droga, apontando para o perigo do estabelecimento destas populações de parasitas em áreas endêmicas devido à pressão seletiva pelo uso extensivo do praziquantel (Ismail et al., 1999; Tsai et al., 2000).

A dose recomendada desta é cerca de 40 mg.Kg⁻¹ de peso. Os efeitos adversos são bem tolerados usualmente, porém problemas como reações alérgicas e diarreia sanguinolenta foram relatados.

O tratamento da esquistossomose intestinal geralmente conduz à redução do nível da infecção e uma melhora em aspectos clínicos como: diarreia sanguinolenta, hepatoesplenomegalia e fibrose periportal. A diminuição desta última previne o aparecimento de hipertensão portal (Homeida et al., 1996).

Após a quimioterapia, a fibrose do fígado, como revelado por estudo de ultrasonografia, regride, mas em certos casos estas mudanças patológicas parecem insensíveis ao tratamento. O tempo necessário para a regressão depende da severidade do envolvimento inicial, da intensidade da reinfecção, da idade do indivíduo e possivelmente de fatores genéticos. A melhora do quadro patológico geralmente é lenta, sendo observada após meses ou anos. A regressão é mais efetiva em crianças ou em pacientes com quadro de fibrose leve (W.H.O., 1996).

Existem vários estudos relacionados com o desenvolvimento de vacinas para a esquistossomose. Nas últimas décadas, os estudos com antígenos que possam conferir imunidade protetora à infecção experimental por *S. mansoni* tiveram grande impulso, especialmente devido ao avanço dos conhecimentos nos campos da biologia molecular e da imunologia. Embora estes estudos tenham levado a importantes avanços, atualmente a proteção conferida tem girado em torno de 50% de diminuição do número de vermes e, com alguns antígenos, diminuição também do número de ovos (Katz, N., 1999).

Nos últimos anos, grandes esforços, no mundo inteiro, têm sido feitos visando o descobrimento de uma vacina que poderia, através da imunização preventiva, impedir que indivíduos se infectassem durante o contato com águas contaminadas. Existem 6 candidatos, considerados pela organização mundial de saúde (W.H.O.), como os mais promissores para a obtenção da vacina para esquistossomose: Glutathione S-transferase (P28/GST), paramiosina (Sm97, proteína muscular), Irv-5 (62kDa, proteína muscular), triose fosfato isomerase (TPI, antígeno de membrana de 28kDa), Sm23 (antígeno de membrana) e Sm14 (antígeno de membrana). Em 1995 foram feitos testes com estes antígenos que mostraram uma eficácia de apenas cerca de 40 % na diminuição do número de vermes na infecção (Katz, N., 1999).

Atualmente, acredita-se que o controle potencial das doenças parasitárias necessita de múltiplas e interativas estratégias, entre as quais modernas ferramentas de imunointervenção (profiláticas e terapêuticas).

1.2- O Tegumento do *Schistosoma*

As cercárias, os esquistossômulos, os parasitas da forma pulmonar e os vermes adultos, são totalmente recobertos por um tecido especializado, denominado tegumento. O tegumento dos vermes adultos consiste de um sincício citoplasmático recoberto por uma única bicamada lipídica chamada membrana heptalaminada (McLaren & Hockley, 1977).

Dentro do tegumento são encontrados mitocôndrias, corpos discóides e corpos membranosos (Hoffmann & Strand, 1996). A função destas organelas especializadas (corpos discóides e membranosos) não é totalmente conhecida, entretanto algumas evidências indicam que elas mantêm a continuidade da membrana heptalaminada e do tegumento (Hockley, 1973). As organelas encontradas no tegumento são fabricadas nas células subtegumentais, que contêm todo o aparato necessário para a produção de proteínas e desenvolvimento de organelas (Hockley, 1973). Estas organelas são transportadas para dentro do tegumento via canais citoplasmáticos de conexão, mas ainda não se sabe como este transporte ocorre. A seguir temos um esquema geral do tegumento, FIGURA 3.

FIGURA 3 - Esquema geral do tegumento do *S. mansoni* de acordo com Matsumoto et al., 1988.

O tegumento do *S. mansoni* é a interface entre o parasita e o ambiente intravascular do hospedeiro, desempenhando um importante papel em 4 atividades básicas: assimilação de nutrientes do sangue do hospedeiro funcionando como superfície absorviva para a captação e transporte de moléculas (Coles, 1984; Rumjaneck, 1987); proteção do parasita contra o sistema imune (Ruppel & McLaren, 1986), ou proteção contra a hemostase (Saito, 1994) e regeneração devido à lesões induzidas (Popiel et al., 1985). Está também envolvido nas interações metabólicas. Nele estão contidas várias moléculas, incluindo uma grande quantidade de proteínas. Estudos têm revelado que as proteínas estão distribuídas nas duas secções da bicamada, mostrando diferenças entre as membranas interna e externa (McLaren et al., 1978).

Antígenos presentes no tegumento estão em contato direto com o sistema imunológico dos hospedeiros. Os mecanismos de proteção imunológica humoral propostos como envolvidos na resposta ao *S. mansoni* parecem mais diretamente direcionados contra o tegumento do parasita (Smithers et al., 1989).

A identificação e caracterização de proteínas associadas com o tegumento são importantes para o entendimento das funções desta estrutura no parasita e na relação parasita-hospedeiro. A maioria dos estudos das proteínas do tegumento dos vermes adultos, está relacionada a moléculas envolvidas na resposta imunológica protetora ou ao diagnóstico da infecção. Smithers e colaboradores (1989) mostraram que membranas de tegumento isoladas são capazes de conferir imunidade protetora em ratos.

A complexidade do tegumento também pode ser avaliada pela variedade de atividades enzimáticas caracterizadas e localizadas neste tecido. Entre as enzimas presentes no tegumento, destacamos aquelas que possuem atividade fosfohidrolásica, um dos assuntos de estudo desta tese. Em 1981, Cesare e colaboradores, identificaram atividades fosfohidrolásicas, na membrana do tegumento de vermes adultos, características de fosfatase alcalina, 5'-nucleotidase, glicerol-2-fosfatase, glicose-6-fosfatase, fosfodiesterase e ATPase. Também uma atividade ATP-difosfohidrolásica (E.C. 3.6.1.5) foi identificada em amostra de tegumento de vermes adultos (Vasconcelos et al., 1993). Esta última enzima é objeto de estudo neste trabalho.

1.3 - *Schistosoma mansoni* - Aspectos Imunológicos

Em condições naturais de exposição ao *Schistosoma*, muitos indivíduos repetidamente expostos à infecção se tornam resistentes a esta (Butterwoth, 1985). A resposta imunológica à infecção envolve a maioria dos componentes do sistema imune. A produção de anticorpos, IgG1, 2, 3, 4, IgA, IgE e IgM são todas estimuladas pela infecção. Evidências indicam que IgG, IgE e IgA sejam particularmente importantes na proteção e resistência contra a reinfecção (Hagan, et al., 1998).

As respostas imunológicas que tem sido associadas com a resistência à reinfecção são em sua maioria do tipo Th2 incluindo a participação de interleucina 4 (IL4), IL5, IgE e eosinófilos (Roberts et al., 1993; Hagan et al., 1991; Rihet et al., 1991; Dunne et al., 1992 e Hagan, et al., 1985). Os elementos genéticos que regulam a capacidade de resposta protetora e diminuem a probabilidade de infecção não são conhecidos. Em uma dada população brasileira, a análise de segregação revelou um gene ou *locus* principal envolvido no controle da intensidade da infecção. Este gene/*locus* foi designado SM1 (Abel et al., 1991) e localizado no cromossomo 5q31-33 (Marquet et al., 1996), em uma região que codifica alguns fatores imunológicos possivelmente ligados à resistência da esquistossomose em humanos. Nem todos os humanos expostos desenvolvem um nível de resistência que os proteja das consequências da deposição de ovos nos tecidos, isto faz variar os níveis patológicos, dos quais os afetados mais severamente morrem se não tratados a tempo (Ongom & Bradley, 1972 ; Forsyth & Bradley, 1966).

Aspectos relacionados à idade, como espessura da pele e hormônios, fazem com que os adultos sejam mais resistentes à infecção ou sejam um ambiente menos propício ao desenvolvimento dos parasitas.

Têm-se mostrado várias reatividades imunológicas potencialmente funcionais durante a infecção pelo *Schistosoma*, nas quais anticorpos participam em mecanismos celulares de citotoxicidade dependentes de anticorpos com uma variedade de células, incluindo eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, que são efetivos no ataque ao estágio de esquistossômulo *in vitro*. Outros tipos celulares como os basófilos e células tronco, no entanto têm um papel acessório na resposta à infecção. Entretanto a extensão em que estes mecanismos ocorrem *in vivo* não está

bem estabelecida. Estudos em animais mostram que as respostas imunes atuam em vários estágios, prevenindo a invasão, migração, desenvolvimento e produção de ovos (Hagan, et al., 1998).

Por outro lado, estratégias de sobrevivência do parasita também fazem parte da relação parasita-hospedeiro. Neste contexto, os parasitas frequentemente usam moléculas iguais ou similares às do sistema imune (mimetismo molecular) para escapar dos ataques do sistema imunológico do hospedeiro (Salzet et al., 2000).

Em hospedeiros imunocompetentes, os parasitas escapam da resposta imune principalmente através de dois mecanismos: (1) mudança da expressão de antígenos suficientemente rápida para prevenir uma resposta imune eficiente (variação antigênica) ou pela expressão de epítomos similares, se não idênticos, às moléculas do hospedeiro (mimetismo molecular); (2) pela modificação da resposta imunológica do hospedeiro (via autoimuno regulações similares), podendo ser isto feito por moléculas próprias do parasita ou indiretamente danificando a resposta de células efetoras do hospedeiro (Salzet et al., 2000).

1.4 - Nucleotídeos extracelulares e ATP-difosfohidrolase (ecto-ATPase, apirase, NTPDase, ATPDase)

Até a década de 70 pensava-se que os nucleotídeos extracelulares eram artefatos gerados em processos de danificação celular, não sendo atribuída a estes nenhuma função biológica. Atualmente sabemos que o ATP extracelular (ATP_e), e seus produtos de degradação ADP, AMP e adenosina, bem como outros nucleotídeos e nucleosídeos, são componentes normais do meio extracelular e estão envolvidos com vários efeitos em diferentes células, tecidos e órgãos (Dombrowski et al., 1998). Por exemplo, ATP_e , *in vitro*, estimula a síntese de DNA em timócitos e células de medula, mas inibe a síntese no baço, linfócitos e células mononucleares do sangue periférico (PBMC), (Ikehara et al., 1981). Os nucleotídeos extracelulares, também estimulam a liberação de histamina pelas células tronco (Diamant & Kruger, 1967; Cockcroft & Gomperts, 1979) e de grânulos dos neutrófilos e monócitos (Dubyak et al., 1988; Cockcroft & Stutchfield, 1989). ATP_e também está envolvido em efeitos citostáticos e citotóxicos em vários tumores (Rapaport, 1990). O ADP extracelular estimula a agregação plaquetária, mas não mostrou efeito

sobre os linfócitos (Luthje, 1989). Adenosina extracelular é transportada para o citoplasma e incorporada em vias de recuperação de purinas (Luthje, 1989; Schrader et al., 1972). O acúmulo de adenosina extracelular contribui para a imunodeficiência pois apresenta efeitos tóxicos frente ao desenvolvimento dos linfócitos (Resta & Thompson, 1997).

Atualmente sabe-se da existência de duas classes de proteínas ligadoras de nucleotídeos extracelulares, visto que estes não são capazes de atravessar membranas celulares: os purinoreceptores e as ecto-nucleotidases.

Os purinoreceptores são proteínas transmembranares agrupadas em duas grandes famílias, de acordo com os efeitos farmacológicos de antagonistas e agonistas dos nucleosídeos e nucleotídeos. (Fredholm et al., 1994) Os receptores do tipo P1 ligam adenosina ou AMP, e agem através da modulação de proteínas-G que induzem uma variedade de respostas celulares, incluindo inibição da adenilato ciclase e estimulação da fosfolipase C e proteína kinase C (Fredholm et al., 1994). Os receptores do tipo P2 ligam ATP e ADP. São divididos em sub-grupos e mediam diversos efeitos biológicos, como por exemplo, purinoreceptores P_{2X} formam canais iônicos que transportam Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . Os receptores P_{2Y} , ligados a proteína G, mobilizam cálcio através de uma via mediada pela fosfolipase C. A ligação a receptores P_{2Z} resultam na formação de poros transmembrana que transportam solutos < 900 Da. Receptores P_{2T} são expressos em plaquetas e induzem a agregação plaquetária mediada por ADP (Dombrowski et al., 1998).

As ecto-nucleotidases também são proteínas transmembranares que ligam nucleotídeos extracelulares. Estas enzimas catalizam a hidrólise dos nucleotídeos no espaço extracelular e são classificadas de acordo com a especificidade pelo substrato em: ecto-AMPase, também chamada de 5'-nucleotidase, cataliza a hidrólise do AMP_e à adenosina e fosfato inorgânico (Pi); ecto-ADPase, cataliza a hidrólise do ADP_e à AMP_e e Pi (Luthje, 1989; Moodie et al., 1991) e ecto-ATPdifosfohidrolase (E.C. 3.6.1.5.), comumente chamada de apirase; estas enzimas têm sido descritas em tecidos de plantas e animais. Elas hidrolizam ligações pirofosfato de nucleosídeos di- e trifosfatados, na presença de cátions divalentes, com liberação de ortofosfato, em um mecanismo sequencial onde ADP aparece como intermediário (Laliberte & Beaudoin 1983). O termo ecto-ATPase é usado para enzimas que hidrolisam nucleosídeos extracelulares, tri- e/ou difosfatados, com atividade enzimática isolada dependente de Ca^{2+} ou Mg^{2+} , insensível para

inibidores específicos de ATPase tipo-P, tipo-F e tipo-V; não hidrolisa nucleosídeos monofosfatados, e fosfatos não-nucleosídeos não são substratos. Uma atividade com estas características é dita atividade do tipo-E. Geralmente elas têm preferência por um dado substrato mas com baixa especificidade, podendo hidrolizar também outros nucleotídeos e nucleosídeos (de adenina, timina, guanina, citosina ou uracila).

O estudo das ecto-ATPases em mamíferos tem avançado muito durante as últimas duas décadas mostrando a presença desta enzima em tecido vascular, células sanguíneas, tecido imune, músculo esquelético, coração, pulmão, fígado, rim, placenta, pâncreas, glândulas parótidas, glândulas mamárias, medula adrenal, tecido nervoso, células gliais, junções sinápticas e várias outras linhagens de células e organismos (Plesner, 1995, Ferreira et al., 1995).

Os papéis fisiológicos das ecto-ATPases ou apirases, não são totalmente conhecidos ainda; entretanto algumas funções têm sido postuladas, incluindo participação na imunoregulação, na adesão celular, sinalização em terminações purinérgicas, secreção e tráfego em vesículas e ainda reciclagem de purinas. Os nucleotídeos extracelulares modulam uma variedade de processos celulares importantes em muitos tecidos e organismos através da ligação a receptores específicos. Tem sido proposta uma associação entre uma ecto-apirase e uma 5'-nucleotidase (que converte AMP em adenosina) na modulação destes processos biológicos, regulando a quantidade destes nucleotídeos no local.

As células T, B e NK (matadoras naturais) são hematopoiéticas e possuem atividade ecto-ATPásica com características cinéticas similares. Estudos com os análogos de ATP não hidrolisáveis, FSBA e AMPPNP em células NK3.3 mostraram que o FSBA inibe a atividade ecto-ATPásica abolindo a citotoxicidade natural (Dombrovski et al., 1995) e as atividades citolíticas dependentes de anticorpos (Dombrovski et al., 1997). AMPPNP e ADP também inibem a atividade citolítica destas células (Dombrovski et al., 1995). As células NK não possuem uma ecto-ADPase (Dombrovski et al., 1993) e o acúmulo de ADP causa uma inibição por *feedback* da atividade citolítica. Dombrowski et al., 1998, mostraram que a ecto-ATPase das células NK possui um papel importante na regulação da atividade citolítica através da sinalização de cálcio, visto que a mobilização de cálcio tem um papel importante na sinalização para ativação dos linfócitos e inibem a ação citolítica das células T-CD8⁺.

Estudos com linfócitos T citotóxicos (CTL) evidenciaram que estas células quando ativadas podem ser fonte de produção de ATP_e e que este por sua vez parece participar efetivamente do processo de lise celular (Fillipini et al., 1990). O mecanismo pelo qual o ATP_e pode agir nas células alvo não está totalmente determinado, algumas possibilidades são : 1- a habilidade já conhecida do ATP_e de permeabilizar membranas celulares (Rozengurt et al., 1979, Steinberg et al., 1987); 2- interação com receptores purinérgicos na superfície dos CTLs e das células alvo e 3- participação em reações de ecto-proteínas kinases (Kibler et al., 1989) ou 4) efeitos adicionais não conhecidos.

As células CD4⁺ expressam ecto-ATPase em sua superfície (Dombrovski et al., 1998). A inibição desta enzima pelo FSBA ocasiona a eliminação da liberação de IFN- γ em células Th1, mas não afeta a liberação de IL-4 pelas células Th2. Sabe-se que a secreção de citocinas pelas células Th1 é dependente de vias de transdução de sinal mediadas pelo cálcio e que a secreção de IL-4 pelas células Th2 não é mediada por cálcio. Dombrovski et al., 1998 concluem que a ecto-ATPase tem um papel importante nas funções efectoras dependentes de cálcio das células-T.

Estudos anteriores identificaram o ADP como um fator primário de indução da agregação plaquetária (Gaarder et al., 1961; Born et al., 1962). Day, H.J. e colaboradores, em 1971, mostraram a liberação de ADP, ATP, 5-hidroxitriptamina e Ca²⁺ dos grânulos densos de plaquetas ativadas por vários agentes. A degranulação das plaquetas ocorre usualmente no local da agregação plaquetária e então o conteúdo dos grânulos é liberado do grupo de plaquetas. A degranulação também pode ocorrer quando as plaquetas interagem com a parede vascular. Em ambos os casos a concentração de nucleotídeos no plasma no local da liberação é bastante alta (mais que micromolar), ver Ferreira et al., 1995.

O efeito da agregação plaquetária mediada pelo ADP acontece via receptores purinérgicos na superfície celular. No caso dos receptores das plaquetas (P₂), o ATP é um poderoso antagonista do ADP (MarcFarlane, 1975). AMP também funciona como antagonista, a diminuição da agregação plaquetária via adenosina parece acontecer pela interação com outro receptor (Haslam, et al., 1981). Os mecanismos pelos quais o ADP induz a agregação plaquetária estão ainda obscuros, mas pode envolver, inibição da adenilato ciclase ou estimulação do metabolismo de fosfatidilinositol e aumento das concentrações de Ca²⁺ citoplasmático (Haslam, et al., 1981).

Uma atividade apirásica foi caracterizada na superfície externa do tegumento do *S. mansoni*. Demonstrou-se sua ecto-localização através de técnicas histoquímicas ultraestruturais que identificaram precipitados de fosfato de chumbo na superfície do parasita quando exposto a ADP ou ATP extracelulares e também através de imunolocalização por imunofluorescência indireta usando microscópio laser confocal (Vasconcelos et al., 1993 e 1996). Esta foi a primeira demonstração de uma ATP-difosfohidrolase na superfície externa de um endoparasita sanguíneo. Outros endoparasitas também possuem uma atividade ecto-ATPásica e/ou ADPásica como *Toxoplasma gondii* (Johnson, A.M. et al., 1989; Asai, T. et al., 1995) e *Entamoeba histolytica* (Kobayashi, S. 1982).

Levanta-se a possibilidade de que endoparasitas tenham evoluído de maneira a mimetizar algumas das condições da superfície de células normalmente presentes na circulação do hospedeiro. A existência de uma atividade ecto-ATPásica na superfície de endoparasitas, com características cinéticas semelhantes as ecto-ATPases de células endoteliais e sanguíneas, leva a possibilidade da existência de um mecanismo comum a estas células que permita ao parasita escapar das respostas imunes e hemostáticas do hospedeiro dependentes de ATP ou ADP extracelulares (Ferreira et al., 1995). A hidrólise do ADP pode estar envolvida com a inibição da agregação plaquetária mediada por ADP, visto que a formação de coágulos sanguíneos ativados pela presença de patógenos ou corpos estranhos no sangue é uma forma de defesa. Processos de liberação de citocinas ativadoras de linfócitos produtores de anticorpos e liberação de fatores que ocasionam a lise celular de patógenos, mediados por ATP, ADP ou AMP, podem ser influenciados pela regulação da quantidade deste componentes nos locais de reação via atividade ecto-apirásica na superfície de patógenos.

1.5 – A ATP-difosfohidrolase do Tegumento do *S. mansoni*

Em 1991, Nascimento & Verjovski-Almeida caracterizaram uma atividade ATPásica não afetada pela ação do vanadato (um análogo do fosfato inorgânico conhecido como um inibidor de ATPases do tipo P, proteínas transportadoras de íons e outras moléculas), no tegumento do *S.*

mansoni. Esse mesmo grupo mostrou que calmodulina não modulava esta atividade enzimática do tegumento dos parasitas.

Todas estas características levaram este grupo de pesquisadores a propor que esta atividade ATPásica não inibida por vanadato e não modulada por calmodulina poderia ser devida a uma apirase presente nos extratos de tegumento (Nascimento & Verjovski-Almeida, 1991). A ecto-ATPase do tegumento de *S. mansoni* foi então caracterizada por Vasconcelos e colaboradores em 1993 e 1996, onde os autores mostraram que a enzima tinha um amplo espectro de utilização de nucleosídeos di e tri fosfatados e que era ativada por concentrações micromolares de Ca^{2+} , na presença de micromolar de Mg^{2+} , sendo que concentrações milimolares deste último se mostraram inibidoras da reação. Foram utilizados vários inibidores de enzimas que poderiam mimetizar a atividade ATP-difosfohidrolásica encontrada: ouabaina (inibidor de Na^+/K^+ -ATPase, Periyasami et al., 1983), tetramisole e levamisole (inibidores de fosfatases alcalinas, Khodaparast-Sharifi & Snow, 1989), Ap_5A (inibidor de adenilato quinase, Melnick et al., 1979) e vanadato, sendo que nenhum destes foi capaz de inibir a atividade ATPásica estudada, Vasconcelos et al., 1993). Azida sódica (10 mM), um inibidor da ATPase mitocondrial (Busse et al., 1980) mostrou inibir a atividade ATPásica em aproximadamente 40%, sendo que várias outras ATP-difosfohidrolases mostram parcial inibição por azida sódica (Knowles et al., 1983; Battastini et al., 1991; Yagi et al., 1991, Côté et al., 1992).

A hipótese da ATP-difosfohidrolase do tegumento inibir a agregação plaquetária dependente de ADP foi investigada em Vasconcelos et al., 1993. Neste trabalho os pesquisadores adicionaram ADP pré-incubado com tegumento de vermes adultos e verificaram que em tempos curtos (10 segundos) ocorreu agregação plaquetária, porém em incubações do ADP com tegumento por tempos mais longos, como 10 ou 25 minutos, induziu pequena ou nenhuma agregação.

Devido a dificuldade de se conseguir purificar proteínas de vermes adultos de *S. mansoni*, já que não se consegue manter o ciclo inteiro "in vitro", e a forma adulta só pode ser mantida através de infecção com cercárias em pequenos vertebrados (usualmente hamster), Vasconcelos et al. (1996) utilizaram a apirase de batata para produzir anticorpos anti-apirase, que ajudassem

no estudo da apirase de *Schistosoma*. A apirase de batata foi a primeira a ser descrita, sendo que já em 1961 Molnar & Lorand purificaram duas isoformas da enzima com atividade apirásica.

Vasconcelos e colaboradores (1996) mostraram que antisoro policlonal produzido contra apirase de batata purificada e antisoro anti nucleosídeo trifosfato hidrolase de *T. gondii* possuem reação cruzada com apirase semipurificada do tegumento de *S. mansoni*, sugerindo possíveis epítomos comuns para estas proteínas (Vasconcelos et al., 1996). A apirase de batata foi purificada e microsequeenciada e três peptídeos, num total de 60 aminoácidos, foram obtidos. Estes peptídeos apresentaram 50 a 60% de homologia com as sequências de levedura e *T. gondii* sugerindo a existência de uma família de enzimas, Vasconcellos et al., 1996. O alinhamento das sequências primárias dos genes até então representantes desta família levou à proposição de algumas regiões de blocos de aminoácidos homólogos que caracterizam hoje os genes desta família, **FIGURA 4** (Vasconcelos et al., 1996). Na mesma época o gene codificante da apirase de batata foi clonado e sequenciado, confirmando a nova família de enzimas (Handa & Guidot, 1996). Hoje existem disponíveis no GeneBank mais de 50 destes genes.

Através de ensaios de mutagênese com a ecto-apirase de cérebro humano, Smith & Kirley (1999) evidenciaram a inclusão das ecto-ATPases na superfamília das Actina/Hsp70/hexokinase. Todas estas proteínas possuem similaridade de sequência de aminácidos no domínio de ligação de nucleotídeo e predições de estrutura secundária compatíveis com as regiões IA e IIA das actinas. Nas ecto-ATPases fazem parte da ligação do nucleotídeo os domínios chamados ACRI e IV (apyrase conserved regions I e IV), que correspondem ao primeiro e terceiro blocos de aminoácidos conservados mostrados na **FIGURA 4**.

FIGURA 4 – Alinhamento de alguns representantes da família das apirases, Vasconcelos et al., 1996. Os blocos circundados por linhas interrompidas indicam as regiões de aminoácidos conservados. Os blocos circundados por linhas inteiras indicam sequências idênticas entre apirase de batata e ervilha. *Potato apyrase* corresponde a três peptídeos obtidos no trabalho. Outras sequências e seus números de acesso no banco de dados são: *Yeast GDPase*, *Saccharomyces cerevisiae* (P32621); pea NTPase, *Pisum sativum* nucleosídeo trifosfatase (S48859); mouse lymph, CD39 de camundongo (gi765257); human lymph, CD39 humano (S73813); *C. elegans* R07E4, cosmídeo R07E4 (gi1049394); *C. elegans* C33H5, cosmídeo C33H5 (gi086594); Yeast GDA1 homolog, proteína hipotética de 71.9-KDa protein na região intergênica PMI40-PAC2 (P40009) e *Toxoplasma* NTPase, nucleosídeo trifosfatase de *T. gondii* (L39077).

Vasconcelos e colaboradores sugeriram a presença de duas isoformas de apirase nos extratos de tegumento. Foram caracterizadas duas diferentes atividades de hidrólise de ATP e ADP em amostras protéicas de tegumento solubilizado com triton X-100 e DOC (deoxicolato de sódio) através de ensaios de atividade enzimática em gel, em condições não desnaturantes. As isoformas apresentaram diferentes mobilidades eletroforéticas e mesmo peso molecular aparente em gel de SDS-PAGE.

Ensaio de inibidores mostraram que FSBA (fluorosulfonilbenzoil adenosina) inibe a atividade ATPásica e ADPásica em 60% e 50% , respectivamente, sendo que a adição de ATP junto ao inibidor proporciona 90% de proteção da inibição, indicando a ligação do FSBA em algum sítio na enzima que ligue o ATP (Torres et al., 1998). A adição de FSBA em meio contendo formas adultas do parasita causa inibição de 30% e 50% da atividade ATP e ADPásica, respectivamente.

2 - OBJETIVOS

Diante da possibilidade da participação da ATP-difosfohidrolase do tegumento do *S. mansoni*, em mecanismos de escape do sistema imunológico e da hemostase do hospedeiro, o primeiro objetivo desta consistiu na continuação do estudo sobre esta proteína.

Os objetivos relacionados ao estudo da apirase de *S. mansoni* foram:

1 - A purificação de uma enzima com atividade apirásica em preparações de tegumento de vermes adultos de *S. mansoni*.

2 - Clonagem de um gene codificando para proteína da família das apirases.

Ao longo de nosso trabalho para a clonagem do gene codificante da apirase, foram clonados diversos fragmentos de outros genes de *S. mansoni*. Uma das técnicas usadas para a clonagem deu origem a uma nova abordagem para a construção de minibibliotecas de sequências de genes expressos. O ponto de partida de nosso trabalho foi baseado em Rose et al. 1998, que descreveram uma nova técnica para o desenho de *primers* “híbridos cosenso-degenerados”. Este trabalho mostra um método computacional disponível na Web (blocks.fhcrc.org/codehop.html), que desenha conjuntos de *primers* híbridos tendo como informação inicial blocos de sequência de aminoácidos conservados obtidos a partir do alinhamento de proteínas de uma mesma família. Os *primers* são chamados híbridos porque contém uma pequena região 3' degenerada, chamada “core” (com 9 a 12 bases) e uma região maior 5' não degenerada denominada grampo (*clamp*). A região 3' é desenhada a partir de 3 a 4 aminoácidos conservados. A região 5' é desenhada levando-se em conta qual o aminoácido mais frequente naquela posição e qual o códon mais representado deste aminoácido. Esta técnica foi denominada CODEHOP (*Consensus Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers*). Os *primers* são geralmente grandes, com cerca de 35 bases e temperatura de anelamento alta o que favorece PCR do tipo “touch down”, com temperaturas de anelamento decrescente durante a evolução dos ciclos. Estas características dos *primers*, de acordo com o trabalho de Rose et al. (1998), favoreceriam a amplificação de fragmentos de genes

distantemente relacionados, sendo que o uso do touch-down PCR favoreceria alvos mais específicos.

A partir desta referência desenhamos *primers* para clonagem da apirase de *S. mansoni*. Os *primers* têm alta degeneração (de 512 a 1092), devido a alta degeneração dos códons das regiões conservadas. Estes *primers* foram desenhados inicialmente para clonagem do gene da apirase, mas os resultados mostraram que, nas condições utilizadas, eles favoreciam a amplificação de fragmentos de genes diversos. A caracterização desta técnica, utilizando-se *S. mansoni* como modelo, faz parte desta tese e tem como objetivos:

3- Validação da nova técnica de construção das mini-bibliotecas de cDNA, através da:

- Construção de minibibliotecas direcionadas de ESTs (*expressed sequence tags*) a partir de RNA mensageiro (RNAm) de vermes adultos de *S. mansoni* e primers consenso-degenerados.
- Análise de Redundância (complexidade) das minibibliotecas.
- Análise posicional dos clones.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

Anticorpo policlonal anti-apirase de batata foi obtido em coelho, através de inóculo de apirase purificada de batata *Solanum tuberosum* (variedade Desireé).

As colunas de purificação em aparelho de FPLC e o Kit- ECL utilizado nos *Western Blots* foram obtidos da Amershan-Pharmacia. Anti-IgG de coelho conjugada à peroxidase foi obtida da BioRad e Amershan-Pharmacia. Leupeptina, pepstatina, inibidor de tripsina, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ATP, ADP, ouabaina, TRITON-X 100 e MES (ácido sulfônico 2-[N-morfolino]etano) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO). N-metildietanolamina foi obtida da Adrich Chemical Company, Inc. Marcadores de peso molecular de proteína foram obtidos da Bio Labs. Filmes Hyperfilm-ECL e Hyperfilm-MP foram obtidos da Amershan-Pharmacia. Todos os demais reagentes foram do mais alto grau analítico.

3.2 - Lista de Primers

PRIMER	SEQUÊNCIA (da região 5' para a 3')
APYBAFI	CAGAACGTGTAAATATGGTATTGTGATNGAYKSNGGNTC
APYBAF2	CAGAACGTGTAAATATGGTATTGTGATNGAYKSNGGNAG
APYBCF1	CTGAAACTCCAGTTTTATATGTGCTACNGCIGGNATG
APYBCF2	CTGAAACTCCAGTTTTATATGTGCTACNGCIGGNBT
APYBFR1	AAAAGCAATTTGAGTAGAAGCACCICCNNAVNTCNA
APYBFR2	AAAAGCAATTTGAGTAGAAGCACCICCNNAVNTC
Actinfw	CAGTGTTCCCTTCCATCGTTG
Actinrv	CGTTCCGTCAGGATCTTCAT
Retrecpfw	TTAGCCGCTTAATCGATGCT
Retrecprv	AAGTGGGCCAAGATCATCAG
Cathepfw	TGCGGTTTACATGTGCTGAT
Catheprv	ATAAATTTCTCCCGCCAAG
APYAF1EcoR	CGGAATTCCGTGTAAATATGGTATTGTGATNGAYKSNGGNTC

HIB8	CGGAATTCCGTGTTAAATATGGTATTGTGATNGAYKSNGGNAG
hib19	CGGAATTCCGGATNGAYKSNGWNTC
hib11	CGGAATTCCGTGTTAAATATGGTATTGTGATNGAYKSNGWNTC
APYAFI	CGGAATTCCGGATNGAYKSNGGNAG
APYR3	CGGAATTCCGAGCACCNCCACDRTC
APYCF1	CGGAATTCCGGCTACNGCTGGCATG
APYCF2	CGGAATTCCGTGCTACNGCTGGNBT
3'TEG	TTGTACATCTACAAGTGGCCAGCCAAGAAG
5'TEG	TCTTTCACTGAACATTCTTGCAACTGTTGC
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT
SMART II	AAGCAGTGGTAACAACGCACAGTACGCGGG
UPM-nested	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT
primer poliT	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ (A,G ou C)N
3'TEG3	AAGGTGGTGAATGTTAGTGAAGTCTACG
SP6	TGACACTATAGAATACTCAAGC
T7	GACTCACTATAGGGCGAATTGG
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGGAAC

3.3 - Manutenção do Ciclo Biológico do *S. mansoni* e obtenção de parasitas

Caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* foram infectados com 15 miracidios/caramujo através de exposição direta dentro de placas de Petri, por duas horas. Ao final de 6 a 7 semanas, as cercárias liberadas pelos caramujos foram utilizadas para a infecção de camundongos da linhagem isogênica Swiss, inoculando-se ~ 150 cercárias/animal por via subcutânea, de acordo com a técnica descrita por Smithers & Terry (1965). O tipo de infecção usada foi a bissexuada, resultando em vermes adultos machos e fêmeas. Os animais foram sacrificados ao final de aproximadamente 45 dias. Os vermes adultos foram obtidos a partir de perfusão do sistema porta hepático dos camundongos, usando-se solução salina fisiológica acrescida de EDTA 0,15%, segundo condições previamente descritas por Smithers & Terry (1965). Os parasitas foram lavados com salina para descartar possíveis contaminantes (matéria intestinal ou sangue do hospedeiro) e mantidos em solução salina a 4 °C até o processamento de extração do tegumento. O fígado foi triturado e filtrado em tamis para o isolamento de ovos do parasita. Os miracidios

provenientes destes ovos foram empregados na infecção de caramujos para início de novo ciclo biológico.

O ciclo biológico do *S. mansoni* é rotineiramente mantido no Instituto Adolfo Lutz, na Seção de Enteroparasitoses, e todos os detalhes pertinentes ao desenvolvimento, manutenção, infecção e coleta dos materiais foram realizados sob a supervisão da Dra. Sylvia Velloso.

3.4 - Extração de tegumento de verme adulto

Com o objetivo de induzir a liberação do tegumento, cerca de 2.000 parasitas vivos machos e fêmeas, obtidos a partir de cerca de 20 camundongos foram incubados por 10 minutos a 37°C em aproximadamente 10 ml de tampão salina-fosfato como previamente descrito (Simpson et al., 1981; Vasconcelos et al., 1993) em um meio contendo KCl 2,7 mM; CaCl₂ 0,9 mM; MgCl₂ 0,5mM e inibidores de proteases: leupeptina (0,5 µg/ml), pepstatina (0,07 µg/ml), inibidor de tripsina (50 µg/l) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (2 µg/ml). O material foi submetido a agitação em vórtex por 10 segundos (Payares et al., 1985). Os vermes inteiros, cujo tegumento havia sido liberado, foram removidos por decantação. Qualquer partícula macroscópica em suspensão foi retirada do sobrenadante com auxílio de pipeta Pasteur. O sobrenadante da decantação foi submetido à ultra-centrifugação a 100.000 x g. O sedimento foi homogeneizado em 300 µl de Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, contendo sacarose 8% e os já indicados inibidores de proteases, com o auxílio de um Potter-Elvehjem, resultando em aproximadamente 4 mg de proteína/ml (~ 0,61 µg de proteína total de tegumento/verme). As amostras foram estocadas em nitrogênio líquido. As atividades medidas foram preservadas por pelo menos 4 meses.

3.5- Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada de acordo com o método de Lowry, utilizando albumina sérica bovina como padrão. Nos casos em que a amostra continha detergente, este também estava presente na curva padrão.

3.6 - Purificação parcial da ATP difosfohidrolase de tegumento de *S. mansoni* através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes

A eletroforese foi feita usando-se um gel de poliacrilamida a 6% de acordo com o método descrito por Laemmli (1970), substituindo-se o dodecil sulfato de sódio por triton-X-100 0,1 % (v/v) e deoxicolato de sódio 0,1% (p/v) no gel e no tampão de corrida. O gel de separação (Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8, acrilamida-bis 6% (30:0,8), triton-X-100 0,1%, deoxicolato de sódio 0,1%, persulfato de amônio 0,05% e TEMED 0,05%) foi montado entre placas de 8 x 15 cm, com espaçadores de 1,5 mm de espessura. O gel de empilhamento (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, acrilamida-bis 4% (30:0,8), triton-X-100 0,1%, desoxicolato de sódio 0,1%, persulfato de sódio 0,05 % e TEMED 0,1 %) foi montado com a inserção de pente com o número de poços adequados para aplicação das amostras. O tampão de corrida, pH 8,3, continha Tris-base 3g/l; glicina 14,4 g/l; triton-X-100 0,1% e desoxicolato de sódio 0,1%. Não foi usado qualquer padrão de peso molecular.

Alíquotas de 100 µg de proteínas do tegumento foram solubilizadas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,125M, pH 6,8; triton-X-100 0,2%, desoxicolato de sódio 0,4% e glicerol 10%) e submetidas à eletroforese por aproximadamente 80 minutos a 150 volts a temperatura ambiente (em cuba de eletroforese BioRad, modelo Mini-Protean II Cell). O corante azul de bromofenol (0,05%) foi adicionado ao tampão de amostra sem proteínas e foi aplicado em um poço do gel como controle da corrida eletroforética, que foi interrompida após 20 minutos da saída do corante.

Após a corrida, o gel foi lavado por 40 minutos (sem agitação) em meio de reação padrão sem nucleotídeos para retirada do tampão de corrida eletroforético. Após a lavagem, o gel foi cortado em duas tiras que foram mergulhadas em placas de Petri contendo meio de reação padrão recém preparado acrescido de CaCl_2 10mM (alto cálcio foi usado aqui para induzir precipitação de fosfato de cálcio) e ATP ou ADP 5mM. Após incubação por 40 minutos a 37°C, as bandas com precipitados brancos de fosfato de cálcio foram fotografadas contra um fundo preto.

As bandas contendo atividades ATPásica e ADPásica foram cortadas e eletroeluídas em membrana de diálise (com poro de 14.000 Da) durante 1 hora a 100V em 1ml de tampão

Laemmli 1X (Tris 0,025M, glicina 0,192M; pH 8,3, e SDS 0,1%). As amostras eluídas foram concentradas em colunas Ultrafree-4 Biomax-30(Millipore), com filtro que retem moléculas maiores que 30 kDa, de acordo com manual do fabricante. O volume foi reduzido a 50-100 µl.

Amostras de proteínas foram submetidas à SDS-PAGE e visualizadas pelo método de coloração pela prata ou Coomassie Blue, dependendo da quantidade de proteína na amostra.

3.7- Coloração de proteína pelo método de impregnação pela prata

Gel de SDS-PAGE foi submetido à fixação de proteínas por 1 hora em metanol 50% e ácido acético 12%. Para géis pré-corados com *coomassie blue* foi adicionado 0,4 µl/ml de formaldeído 37% para cada 100 ml de solução. Em seguida o gel foi lavado com água destilada por 3 vezes de 20 minutos, incubado com solução de Tiosulfato de sódio 0,4g/l por 1 minuto e lavado como descrito anteriormente. A impregnação com prata foi feita em solução contendo AgNO₃ 1mg/ml e formaldeído 37% em concentração final de 0,75 µl/ml por 20 minutos. Em seguida foi feita uma rápida lavagem com água para remover toda a solução anterior. O desenvolvimento da coloração foi feito em solução de Na₂CO₃ 0,6 g/ml; formaldeído 0,5µl/ml e 0,2ml/ml da solução de tiosulfato de sódio pelo tempo necessário para visualização das bandas proteicas.

A reação de coloração foi interrompida pela retirada da solução de desenvolvimento, lavagem rápida com água e posterior incubação do gel em solução de metanol 50% e ácido acético 12%.

3.8 - Medidas de hidrólise de nucleotídeos

As medidas de atividades ATPásica e ADPásica foram feitas como descritas em Vasconcelos et al., 1993 em meio de reação padrão contendo de tampão MOPS 50mM, pH 7,4 ou 8,9; CaCl₂ 5mM; MgCl₂ 2mM; NaCl 150mM; KCl 5mM; ouabaína 1mM; azida sódica 10mM, usou-se amostras com volume fixo de eluído das colunas cromatográficas (com concentração desconhecida de proteína) de proteínas (para amostras de volume constante eluídas de colunas cromatográficas) ou 0,01-0,05 mg de proteína/ml, e ADP ou ATP 3 mM. A reação era iniciada pela

adição de nucleotídeos, incubada por 30 minutos a 37 °C, e interrompida pela adição de 1 volume de ácido clorídrico (HCl) 0,2 N. A quantidade de Pi liberado foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Taussky & Shorr (1953).

Em outros experimentos, extrato total de tegumento foi solubilizado com o detergente não iônico triton X-100 ou detergente aniônico SDS numa proporção de 2:1 (μg de detergente: μg de proteína), submetido ou não à centrifugação ($100.000 \times g$) por 1 hora a 4°C. O sobrenadante resultante da centrifugação ou a amostra sem centrifugação foram então submetidos à medida de atividades como descrito acima. O tempo de incubação e a concentração de proteína no meio de reação foram determinados visando assegurar a linearidade na velocidade de formação de produtos. Medidas de atividades foram realizadas rotineiramente para testar a integridade das amostras durante a extração do tegumento de *S. mansoni*.

3.9 – Imunoprecipitação de citoqueratina em amostras de apirase semi-purificada por gel não desnaturante

Amostras contendo apirase foram semipurificadas em gel não desnaturante de acordo com Materiais e Métodos item 3.6. Estas amostras foram incubadas com anti-citoqueratina (clone KL1, 126,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, da Immunotech) na proporção de 1 μl de anticorpo:10 μl de apirase semipurificada, em tampão Laemmli 1X (Tris 0,025 M; glicina 0,192 M; pH 8,3 e SDS 0,1%, por 3 horas e 30 minutos a 4 °C. A precipitação dos complexos anticorpo-proteína alvo foi feita pela adição de Proteína G-agarose 10%, equilibrada em tampão Laemmli 1X seguida de centrifugação por 4 minutos, a 2500 rpm e temperatura de 4°C. Amostra do sobrenadante contendo apirase foi reservada.

3.10 – Purificação em colunas da proteína com atividade ADPásica de amostras de tegumento de vermes adultos de *S. mansoni*

A solubilização das proteínas totais do tegumento de cerca de 8.000 vermes adultos (~7 mg de proteína total) foi feita com tritonX-100 numa proporção de 2:1 (detergente : proteína), onde as amostras foram homogeneizadas em *poter* e incubadas por 30 minutos, a 4 °C e sob agitação leve.

Após solubilização a amostra foi submetida a centrifugação a 100.000 g, 4°C por 1 hora. O sobrenadante foi recuperado e esta amostra foi aplicada em uma coluna de troca iônica Mono-Q (carregada positivamente) equilibrada com tampão N-metildietanolamina 20 mM, Triton-X 100 0,1%, pH 8,8. As proteínas foram eluídas em frações de 1 ml em um gradiente de 0 a 100% de tampão N-metildietanolamina 20mM, Triton-X 100 0,1 % e NaCl 2M, pH 8,8.

Para determinação das frações com atividade de apirase, foi feito ensaio de atividade ADPásica das frações, de acordo com o descrito no item 3.8 de Materiais e métodos. Inicialmente todas as amostras foram analisadas e depois de estabelecida a região de eluição da atividade ADPásica passou-se a ensaiar apenas as amostras adjacentes desta região pré-determinada.

A atividade foi ensaiada em 40 µl de cada amostra. Estas eram adicionadas à solução contendo tampão de atividade MOPS 50mM, pH 7,4 ou 8,9; CaCl₂ 5mM; MgCl₂ 2mM; NaCl 150mM; KCl 5mM; ouabaina 1mM; azida sódica 10mM). As reações foram disparadas com solução de ADP pH 7,0 para concentração final de 3mM. Após 30 minutos, as reações foram interrompidas com adição de HCl para concentração final 0,1 N. A quantidade de fosfato livre liberada pela hidrólise do ADP foi medida de acordo com Tauski & Shorr, 1953.

As amostras ativas foram unidas em uma única preparação, acidificadas com HCl 1N para pH próximo de 6,0 e aplicadas em coluna de troca iônica Mono-S equilibrada com tampão MES 50 mM pH 6,0 e triton X-100 0,1%. A eluição foi feita com tampão MES 50mM; NaCl 2M pH 6,0 e triton X-100 0,1% em um gradiente de 0 a 100 %. Os picos foram coletados automaticamente pelo aparelho FPLC levando em conta diferenças de inflexão de 3% e 50 µl de cada amostra foi utilizado para medir atividade ADPásica, como descrito anteriormente.

O conjunto de amostras com atividade ADPásica recuperado da coluna Mono-S foi ajustado para pH 7,0 e aplicado manualmente na coluna Hi-Trap Blue Sefarose (Amersham/Pharmacia Biotech). Esta é uma coluna de cromatografia de afinidade que contém o ligante denominado Cibacron®Blue 3 G-A, utilizada para separação de proteínas que requerem adenil-cofatores como NAD⁺ e NADP⁺, sendo também eficiente para ligar proteínas com alta afinidade pra ATP ou ADP. A coluna foi equilibrada e eluída com o mesmo tampão utilizado para a coluna Mono-S, porém o pH foi acertado para 7,0. Foram recolhidas a amostras de 500µl que foram analisadas quanto á atividade ADPásica (100µl) e perfil proteico em SDS-PAGE.

3.11 - “Western blots”

Foi utilizada a técnica de “immunoblotting” para observar a ocorrência de reações cruzadas entre a ATP difosfohidrolase do tegumento de *S. mansoni* e o soro imune contendo anticorpos anti-ATP difosfohidrolase de batata. A apirase pura de batata var. Desirée, obtida em sua conformação nativa, foi usada para imunização de camundongos.

Para realização de “Western blots”, as amostras foram solubilizadas em tampão de amostra [Tris 62,5mM pH 6,8; glicerol 20%; SDS 2% (p/v); β-mercaptoetanol 5%; ditiotretitol 42mM; corante azul de bromofenol] e fracionadas em gel de poliacrilamida 10% com dodecil sulfato de sódio 0,1% (SDS-PAGE), por tempos variáveis segundo o método descrito por Laemmli (1970). Em paralelo foram aplicados 10 µl de padrão de peso molecular pré-corado da Biolabs, contendo a seguinte mistura de proteínas: proteína ligadora de maltose-β-galactosidase de *E. coli* (175.000 Da), proteína ligadora de maltose-paramiosina de *E. coli* (83.000 Da), desidrogenase glutâmica de fígado de boi (62.000 Da), aldolase de músculo de coelho (47.500 Da), triose-fosfato isomerase de músculo de coelho (32.500 Da), β-lactoglobulina A de leite bovino (25.000 Da), lisozima de ovo de galinha (16.500 Da) e aprotinina de pulmão bovino (6.500 Da), ou da Gibco BRL (BenchMark Prestained Protein Ladder), contendo uma mistura de 10 proteínas diferentes variando o peso molecular de 10 a 220 kDa.

As bandas protéicas do gel foram coradas pelo *Coomassie Blue* ou eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham, poros de 0,45 μm).

Para transferência empregou-se o método contínuo de acordo com o manual do aparelho "Multifor II" (Pharmacia). O sistema foi montado fazendo-se um sanduíche com 9 folhas de papel de filtro 3 MM, 1 folha de membrana de nitrocelulose, o gel contendo amostras a serem transferidas e mais 9 folhas de papel de filtro 3MM, todos embebidos no tampão de transferência contínua descrito no manual.

As bandas proteicas do gel que não foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose foram visualizadas através de coloração pelo método da prata (item 3.7 deste tópico) ou coomassie blue.

As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas eletrotransferidas foram bloqueadas em solução tampão PBS (tampão fosfato salino) acrescida de leite desnatado 5% e azida sódica 0,05%, sendo incubadas sob leve agitação por 1 hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio foram incubadas com soro policlonal anti-apirase de batata nativa de *S. tuberosum* var. Desirée (diluição 1:1.000) em PBS, por 15 horas a temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas em solução tampão PBS em 4 etapas de 5 minutos sob leve. As membranas foram, então, incubadas durante 1-2 horas com anticorpo secundário anti-IgG acoplado à peroxidase (Sigma ou BioRad) na diluição de 1:3000 em PBS. Após incubação, as membranas foram novamente lavadas como já descrito acima e o excesso de solução foi retirado. As membranas foram colocadas sobre película de plástico e incubadas durante 1 minuto a temperatura ambiente com o substrato Luminol do Kit ECL da Amersham-Pharmacia. Após retirar o excesso de solução, as membranas foram envolvidas em películas de plástico e reveladas por quimioluminescência e exposição em filmes de raio-X, como recomendado pelo fabricante (Kit ECL-Amersham, UK).

3.12 – Obtenção de antisoro policlonal anti-apirase de batata

A apirase de batata foi purificada no laboratório anteriormente, pela então aluna de doutorado Eveline Vasconcelos. Esta proteína foi extraída em sua forma nativa de *Solanum tuberosum*,

variedade Desireé, de acordo com Traverso-Cori et al., 1970. A proteína nativa foi usada para imunização de um coelho fêmea de aproximadamente 6 meses de idade. Dez dias antes da imunização, cerca de 5 ml de sangue foram retirados pela veia marginal da orelha, incubado a 37°C por 30 minutos e centrifugado 10 minutos a 2500rpm numa centrífuga de mesa, para a separação do coágulo. O soro pré-imune foi recolhido e congelado em alíquotas a -20°C.

A primeira injeção foi feita com cerca de 500 µg de proteína em 0,5 ml de tampão PBS pH 7,0 adicionado de 0,5 ml de adjuvante de Freund completo (Sigma), subcutaneamente, nos gânglios linfáticos inguinais e no dorso do animal. Após 20 dias, a imunização foi repetida nas mesmas condições, exceto pelo uso de adjuvante de Freund incompleto. Cerca de 10 ml de sangue foram retirados após uma semana e tratados como descrito para o soro pré-imune. O soro obtido foi utilizado em ensaios de *Western blot*.

3.13 - Extração de DNA genômico de *S. mansoni*

A extração do DNA genômico (DNAg) foi feita a partir de 3.000 vermes adultos (machos e fêmeas), totalizando aproximadamente 0,8 g de material. Os vermes foram macerados com nitrogênio líquido em cadinho de porcelana e ressuspensos em tampão de digestão (NaCl 100mM; Tris.Cl 10mM pH 8,0; SDS 0,5% e proteinase K 0,1mg/ml). A digestão foi feita por 18 horas à 50°C, sob agitação. O DNAg foi extraído pela adição de 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 24:24:1, após centrifugação de 10 minutos à 1700 x g. A fase aquosa superior foi recuperada e o DNAg purificado por precipitação pela adição de ½ volume de acetato de amônio 7,5M e 2 volumes de etanol 100%. A recuperação do DNAg foi feita por centrifugação de 2 minutos a 1700 x g, este foi lavado com etanol 70% e recolhido por centrifugação novamente e ressuspenso em TE.

3.14- Extração de RNA total de vermes adultos de *S. mansoni*

Esta extração do RNA total (RNA_t) foi feita com "Trizol" (Gibco). Os vermes foram homogeneizados em solução de "trizol" (Gibco) em aparelho DIAx 900 (Heidolph) sendo a solução submetida a extração do RNA_t de acordo com o manual do fabricante.

3.15 - Extração de RNA_m de vermes adultos e tegumento de *S. mansoni*

As extrações de RNA_m foram feitas diretamente por separação magnética ou a partir de RNA total extraído com TRIZOL (Gibco-BRL) seguida da extração do RNA_m com kit "Oligotex mRNA" (Qiagen) que utiliza oligonucleotídeos de timina acoplados a resina de poliestireno para separar as moléculas poliadeniladas de RNA_m.

A extração por separação magnética foi feita de acordo com o "Kit μ MACS mRNA Isolation" (Miltenyi Biotec). Os vermes adultos ou o tegumento foram macerados e homogeneizados no tampão de lise em DIAx 900 (Heidolph) em velocidade 1. A separação do RNA_m é feita pela ligação das moléculas de RNA_m em oligonucleotídeos de timina (oligo dT) ligados em resina magnética.

3.16 - PCR de colônia

As colônias de bactérias transformadas foram crescidas separadamente em placas de 96 poços em meio TB (bacto-triptona 1,2%; extrato de levedura 2,4%; glicerol 0,4%; KH₂PO₄ 0,017M e K₂HPO₄ 0,072M) suplementado com ampicilina 100 μ g/ml, por 12-16 horas a 250 rpm, 37°C e estocadas no mesmo meio acrescido de 15% de glicerol. Os estoques das colônias foram usados como alvo ("template") para as reações de PCR..

As reações de PCR foram feitas em meio contendo uma mistura de deoxinucleotídeos (dNTP) contendo 0,125 mM de cada; MgCl₂ 1,5mM; 0,5 unidade de enzima (Biolase ou Taq Gold) por reação, 1X o tampão da enzima e 0,166 mM de cada primer flanqueador do sítio de clonagem

do vetor usado (T3 e T7 para plasmídeo Bluescript ou T7 e SP6 para plasmídeo pGEM-T) em reações de 50µl.

As amostras dos clones estoques foram inoculadas nas reações através de replicador de 96 canais. E submetidas ao seguinte programa em máquina 9700 da Perkin Elmer: 95°C por 4 minutos, 95°C por 45 segundos 55°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, repetindo-se este ciclo 40 vezes seguido de 72°C por 5 minutos. Após o PCR 5 µl de cada reação foram analisados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo.

3.17 - Sequenciamento dos clones em aparelho ABI-377 (Perkin Elmer)

Para o sequenciamento foram utilizadas mini-preparações plasmidiais ou PCR de colônia dos clones de interesse.

As reações de sequenciamento foram feitas de acordo com o método de dideoxinucleotídeos (Sanger), porém com utilização de dideoxinucleotídeos fluorescentes diferentes para cada base nitrogenada (Kit Big Dye- Perkin Elmer). A metodologia utilizada foi a descrita pelo fabricante sendo que apenas 1/4 do mix de sequenciamento foi utilizado em cada reação. O programa utilizado para as máquinas 9700 da Perkin Elmer foi: 94°C por 30 seg, 56°C por 30 seg e 60°C por 3 minutos, repetindo-se o ciclo 40 vezes.

O DNA foi precipitado com acetato de sódio 3M pH 5,2; etanol 70% e glicogênio (1µg/reação). Após precipitação o DNA foi ressuspenso em tampão desnaturante contendo formamida do Kit Big Dye, desnaturado por 5 minutos à 95°C e submetido a eletroforese em gel de sequenciamento como descrito no manual do ABI377 (Perkin Elmer).

3.18 - Mini-preparações plasmidiais ("Mini-preps")

As minipreps foram feitas pelo método de lise alcalina porém com algumas modificações. As colônias de bactérias transformadas foram crescidas por 12 horas, à 37°C em 2 ml TB (bactotripton 1,2%; extrato de levedura 2,4%; glicerol 0,4%; KH₂PO₄ 0,017M e K₂HPO₄ 0,072M)

suplementado com ampicilina 100 µg/ml. O precipitado de bactérias foi recolhido por centrifugação e ressuspenso em solução de glicose 0,5M; Tris.Cl 25mM pH 8; EDTA 7,5mM e RNase A 0,25mg/ml. As células foram então lisadas por 5 minutos, pela adição de 2 volumes de SDS 1% e NaOH 0,2N. As proteínas, restos celulares e substâncias indesejadas foram precipitadas pela adição de 2/3 do volume de acetato de potássio 3 M pH 4,8 e incubação por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo os DNAs plasmidiais foi recuperado após centrifugação por 20 minutos a 14.000 rpm e precipitado pela adição de 1/3 do volume de isopropanol. Sendo novamente recuperado por nova centrifugação, lavado com etanol 70% e ressuspenso em Tris.Cl 10 mM pH 8. Todas as amostras foram analisadas em gel de agarose 1,2% para quantificação e utilização nas reações de sequenciamento.

3.19- Extração de plasmídeos por fervura ("*boiling-prep*") para sequenciamento

Foram utilizados os clones de colônias de bactérias transformadas estocados em placas de fundo redondo de 96 poços. As células foram repicadas em 1 ml de TB (bacto-triptona 1,2%; extrato de levedura 2,4%; glicerol 0,4%; KH₂PO₄ 0,017M e K₂HPO₄ 0,072M) suplementado com ampicilina 100 µg/ml com auxílio de replicador tipo "ouriço (*hedgehog*)", transferindo-se o inóculo duas vezes. O inóculo foi crescido por 24 horas e as células recolhidas por centrifugação a 3000 rpm por 8 minutos. Todo o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 25 µl de água milli-Q estéril em aparelho de vortex. Em seguida foi adicionado em cada poço 70 µl de MW/STET/TWEEN (Tween-20 5%; NaCl 100mM; Tris.Cl 16mM pH8 e EDTA 1mM pH 8) seguido de homogeneização e incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. As células foram lisadas por fervura em microondas e homogeneizadas com 300 µl de água milli-Q estéril e incubadas por 10 minutos no gelo. O sobrenadante (50 µl) foi recuperado após centrifugação por 20 minutos à 6000 rpm e estocado a -20°C. Uma alíquota de 5 µl foi analisada em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo 0,1 mg/ml e 2-4 µl foram utilizados em reações de sequenciamento como descrito no item 3.17.

3.20- Ligação de Fragmentos de DNA a plasmídeos

As ligações foram feitas utilizando-se 10 ng do vetor (plasmídeo *bluescript*) e aproximadamente 100 ng dos insertos de interesse quando possível a quantificação. Para as bibliotecas de cDNA a quantidade utilizada não pode ser determinada devido à escassez de material. As reações continham ainda o tampão da ligase 1X (Tris.Cl 200mM pH 7,5; MgCl₂ 50mM; DTT 50mM e BSA 500µg/ml e 5U de T4 DNA ligase em volume final de 13 µl e foram incubadas a 16 °C por 16 horas.

As ligações dos fragmentos RACE foram feitas com o kit pGEM-T (Promega) de acordo com manual do fabricante.

3.21 - Obtenção de células competentes para transformação por eletroporação

Foi feito pré-inóculo de uma colônia de *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ em 5 ml de meio SOC (bacto-triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 20mM, MgSO₄ 20mM e glicose 20mM) e incubada a 37°C por 12-16 horas 250 rpm. Este pré-inóculo foi utilizado para iniciar uma cultura em 500 ml de meio SOC, incubado a 37°C e 200rpm de agitação. As células foram coletadas por centrifugação por 10 minutos, a 5.800 g e 4°C, quando a cultura atingiu 0,45-0,6 de D.O._{600nm}. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com 500 ml de água milli-Q estéril gelada. Em seguida as células foram recolhidas por nova centrifugação e ressuspensas em 100 ml de glicerol 10% estéril gelado. Esta suspensão foi novamente centrifugada agora por 10 minutos, 4°C e 3000 x g e o precipitado foi ressuspensão em 1 ml de glicerol 10%. Aliquotas de 40µl foram separadas e congeladas à -70°C até utilização em transformações. Foi testado o título de transformação das células, a média alcançada foi de 10⁷ transformantes.

3.22 - Experimentos de transformação

As ligações de fragmentos de DNA a plasmídeos foram dialisadas contra água por 2 horas em membranas de nitrocelulose de 0,025 μm (Millipore), para retirada de sal das amostras. Em seguida uma alíquota variável destas reações foi utilizada em transformações da cepa de *E. coli* XL1-blue MRF preparada como descrito no item 3.21. As células eletrocompetentes estocadas a 70°C foram descongeladas em gelo, misturadas com as ligações e em seguida submetidas a eletroporação de 2,5 volts (Gene Pulser- Bio Rad). As células foram então recuperadas por 1 hora em meio SOC (bacto-triptona 2%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,01M; glicose 20 mM) líquido a 37°C sem agitação. Estas células foram plaqueadas em meio sólido LB (bacto-triptona 1%; extrato de levedura 0,5%) suplementado com ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ e adicionado ainda de 30 μl de IPTG 100 mM (isopropil-tiogalactopianosídeo) e X-gal 2% (5-bromo-4cloro-3indolil- β -D-galactosídeo). As placas foram incubadas por 12-16 horas a 37°C em estufa. Após o crescimento das colônias, foram selecionadas várias colônias brancas aleatoriamente. A verificação dos insertos foi feita por PCR de colônia ou sequenciamento de mini-preps ou *boiling-preps*.

3.23 - Construção das bibliotecas de cDNA com *primers* híbridos e PCR de baixa estringência

O RNAm foi extraído pelos métodos descritos anteriormente, submetido à tratamento com DNase livre de RNase (1U/10 μl) por 15 minutos à temperatura ambiente, a enzima foi então inativada por aquecimento a 65°C por 10 minutos. A integridade do RNAm extraído foi rotineiramente determinada por ensaios de PCR para genes controle (actina, catepsina C e receptor retinóico), como visto em 4.3.4.1., utilizando-se pares de *primers* desenhados para a região 5' destes genes. Os RNAm integros (250 ng) foram submetidos à transcrição reversa com diferentes *primers* híbridos (consenso-degenerados). A reação foi feita a 42°C, por 60 minutos com 200 U de Superscript (Gibco) e 20 pmol do primer desejado (primers híbridos consenso degenerados) em um volume de 20 μl como recomendado pelo fabricante do kit de transcrição

reversa (Superscript II- Gibco). As amostras foram então incubadas com RNase H por 20 min à 37°C e alíquotas de 0,5 µl foram submetidas a reações de PCR utilizando-se AmpliTaq-Gold (Perkin Elmer), os parâmetros experimentais individuais estão descritos no decorrer da apresentação dos resultados de construção das bibliotecas de cDNA (na sessão 4.3.4 do item Resultados e Discussão).

3.24 - Coloração dos perfis de cDNA pelo método de impregnação pela prata (Sanguinetti et al., 1994)

Parte das reações de RT-PCR (usualmente 5 µl) foram homogeneizadas em tampão de corrida para DNA 1X (6x concentrado- bromofenolblue 0,25%; xilenocianol FF 0,25% e glicerol 30% em água). As amostras então foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 6% por tempos variáveis. O gel foi então mergulhado em solução de fixação por 3 minutos (etanol 10% e ácido acético glacial 0,5%), lavado rapidamente com água milli-Q e incubado em solução de coloração por 5 minutos (etanol 10%, ácido acético glacial 0,5% e nitrato de prata 12mM). Em seguida foi feita uma lavagem de 2 minutos com água milli-Q e o gel foi então mergulhado em solução de desenvolvimento (NaOH 0,75M e formaldeído 38% a 2,6 µl/ml) pelo tempo necessário para visualização do DNA corado. A coloração foi interrompida pela adição da solução de fixação por 5 minutos e posterior lavagem com água milli-Q.

3.25 - Reações de amplificação das extremidade gênicas 5' e 3' do provável gene CD39 de *S. mansoni* (RACE-PCR)

O RACE-PCR foi feito com o kit "SMART-RACE cDNA" (Clontech) de acordo com manual do fabricante, em amostras de RNAm de tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* extraído pelo método de separação magnética descrito no item 3.15. Os primers utilizados para as reações 3' foram denominado TEG2-FW (5'-TCT CAC ACC AAC TTG TAC ACT TAC AAG TGG-3') e TEG3-FW (5'-AAG GTG GTG AAT GTT AGT GAA CTC TAC G-3'), para a reação 5' o primer foi

denominado TEG2-RV (5'-GTA GAT GTA CAA GTT GGT GTG AGA AGA GCC-3'). A primeira reação de PCR foi feita com desnaturação inicial à 95°C por 1 minutos, 5 ciclos de 95°C por 15 seg e 72°C por 4 minutos, 5 ciclos de 95°C por 15 minutos e 70°C por 4 minutos e 25 ciclos de 95°C por 15 seg e 68°C por 4 minutos. Estas reações foram diluídas 50 vezes e utilizadas como alvo em reações de NESTED-PCR utilizando-se os mesmos primers específicos TEG2-FW e TEG2-RV em combinação com o primer interno do kit SMART-RACE cDNA em programa com desnaturação inicial à 94°C por 1 minutos e 25 ciclos de 94°C por 5 seg, 65°C por 30 seg e 72°C por 3 minutos. Uma alíquota das reações foi analisada em gel de agarose para recuperação das bandas amplificadas e subclonagem em plasmídeo PGEM-T.

3.26 - Isolamento dos fragmentos amplificados em RACE-PCR para ligação em vetor

As reações de RACE-PCR foram corridas em gel de agarose 1,2% e visualizadas por coloração com brometo de etídeo sob luz U.V. As bandas de interesse foram excisadas e o DNA foi recuperado com Kit "NucleoTrap- nucleic acid purification" (Clontech) de acordo com manual do fabricante.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Purificação de uma enzima com atividade ATP-difosfohidrolásica

Uma das abordagens usadas com objetivo de clonar o gene da ATP-difosfohidrolase do tegumento do *Schistosoma* foi a purificação desta proteína para posterior obtenção de sequências de peptídeos internos que seriam utilizados no desenho de *primers* degenerados. O Objetivo era isolar uma proteína com atividade apirásica (ATPDásica) similar à família do CD39 (Vasconcelos et al., 1996 e Handa & Guidot, 1996).

Inicialmente, devido à dificuldade de obtenção de quantidades adequadas de material parasitário, para purificação de proteínas por métodos convencionais, tentamos utilizar a proteína parcialmente purificada em gel não desnaturante, técnica esta já utilizada no laboratório e descrita em Vasconcelos et al., 1996 (materiais e métodos item 3.5). Amostras de proteínas extraídas de gel não desnaturante, (**FIGURA 5A**) foram enviadas para análise no centro de sequenciamento e análise de proteínas da Universidade de Yale, Connecticut, USA (W.M.Keck Foundation).

Através da análise do tamanho de peptídeos gerados pela digestão da amostra com proteinases, pelo método chamado LCQ (*LCQ quadrupole ion trap mass spectrometer*) e fragmentação dos picos mais uniformes e intensos (MS/MS), um *software* acoplado pesquisou todos os peptídeos possíveis de serem gerados a partir das sequências das proteínas depositadas no banco de dados (GenBank) e que tinham massa predita compatível com a massa observada nos picos eluídos. A amostra de apirase semi-purificada analisada desta maneira mostrou alguns picos de MS/MS muito similares a citoqueratina humana do tipo II (encontrada em citoesqueleto). Pelos cálculos dos analisadores da Keck Foundation outras proteínas componentes da amostra enviada correspondiam a 10% do material.

Inicialmente, a suspeita foi de contaminação de queratina humana, porém verificamos que na literatura havia uma referência sugerindo a presença de citoqueratina em amostras de material protéico de tegumento de *S. mansoni*, (Diogo M. C. et al., 1993). Este trabalho mostra uma reatividade cruzada entre um anticorpo monoclonal anti-citoqueratina humana (KL1) e uma

proteína do tegumento de *S. mansoni* com peso molecular estimado em 63 kDa. O trabalho mostra também por imunofluorescência que a proteína reconhecida pelo anticorpo anti-KL1 está localizada por todo o tegumento do parasita.

O tamanho da proteína reconhecida nos extratos de tegumento é compatível com a amostra enviada para análise, o que nos fez suspeitar que existia uma **copurificação** destas duas proteínas na amostra mandada para análise. Esta purificação conjunta nos diz que as duas proteínas têm carga aparente muito próximas em pH 8,8 (utilizado no gel não desnaturante) e por isto são recuperadas conjuntamente ao fazermos a excisão da banda de atividade ATPásica. Maior coincidência ainda é que as duas têm também peso molecular muito próximo e por isto não podem ser separadas por SDS-PAGE.

Para comprovarmos a presença de citoqueratina na amostra de apirase semipurificada foi feito um ensaio de *Western blot* com o monoclonal anti-citoqueratina contra amostra de apirase semipurificada, **FIGURA 5B**.

Vê-se então que apesar da pouca quantidade de proteína utilizada no ensaio, existe uma forte reação cruzada com o monoclonal anti-citoqueratina (KL1) na amostra de purificação parcial da apirase de *S. mansoni*, tendo a banda reconhecida cerca de 63-65 KDa. Tentamos separar a proteína reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti-citoqueratina através de imunoprecipitação, (**FIGURA 6**).

O experimento da **FIGURA 6** corresponde à condição supostamente otimizada de imunoprecipitação com anti-citoqueratina KL1, a fim de tentar imunodepletar a citoqueratina da preparação contendo apirase. Não foi possível imunodepletar pois, toda a amostra de sobrenadante da imunoprecipitação (**FIGURA 6, canaleta 3B**) ainda continha proteína que era reconhecida pelo anticorpo KL1.

FIGURA 5 – Imunoreatividade cruzada de amostras de apirase semipurificada em gel não desnaturante com anticorpo monoclonal anti-citoqueratina humana. A- (Canaleta 2) Amostra com quantidade não conhecida de apirase semi-purificada foi obtida através da separação em gel não desnaturante e atividade ATPásica em gel. A banda ativa foi extraída do gel por eletroeluição, separada em gel de SDS-PAGE 8% de acrilamida e corada com Coomassie Blue; (canaleta 1) padrão de peso molecular. **Em B-** (canaleta 3) gel de poliacrilamida 8% corado com prata contendo 20 µl de amostra de apirase semipurificada do tegumento de *S. mansoni*. (Lane 4) *Western blot* com 20 µl da mesma amostra aplicada na canaleta 3, revelado com anticorpo anti-citoqueratina humana (KL1) e anti- IgG de camundongo conjugado à peroxidase. A seta indica a banda reativa com anti-citoqueratina.

FIGURA 6 – Ensaio de tentativa de depleção de citoqueratina de amostras de apirase semipurificada em gel não desnaturante através de imunoprecipitação. Amostras de apirase semi-purificada foram obtidas através da separação em gel não desnaturante e atividade ATPásica em gel. As bandas ativas foram extraídas do gel por eletroeluição e separadas por SDS-PAGE 8% de acrilamida. Em **(A)** o gel foi corado com prata: 1- amostra com apirase semi-purificada do tegumento de *S. mansoni*, 2 – sedimento (*pellet*) imunoprecipitado com anticorpo monoclonal anti-citoqueratina humana (KL1) e proteína G-agarose, 3- sobrenadante inicial após imunoprecipitação. Em **(B)** as proteínas referentes ao gel A, foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas a *western blot* usando-se anticorpo monoclonal anti-citoqueratina (clone KL1) 1: 500.

Diante destes resultados concluímos que a amostra contendo apirase semipurificada contém outras proteínas em maior quantidade, estando a apirase pouco representada. Portanto, era necessário que a apirase de tegumento de *S. mansoni* estivesse em maior grau de pureza para ser submetida ao microsequenciamento.

Com estes resultados partimos para uma purificação mais analítica da apirase do tegumento do *Schistosoma*, iniciando então um novo processo de purificação através de cromatografia de troca iônica e afinidade.

Vasconcelos et al. (1993) descreveram a necessidade do uso de detergentes para a solubilização da ATP-difosfohidrolase do tegumento do *Schistosoma*. Os experimentos em gel não desnaturante utilizavam para solubilização os detergentes Triton X-100 e DOC (deoxicolato de sódio), e estes não pareciam afetar drasticamente a atividade enzimática. Por isto utilizamos o Triton-X 100, que por ser um detergente não iônico não interferiria no processo de purificação por cromatografia em colunas de troca iônica.

A sensibilidade das apirases a detergentes é variável, e algumas ecto-ATPases são inativadas pelo uso de detergentes normalmente indicados para solubilização de proteínas ligadas à membrana (Plesner, 1995). Porém, estudos recentes mostram a utilização de Triton na solubilização de algumas apirases como a da parede dos vasos sanguíneos (Sévigny, et al., 1997) e de rim de porco (Lemmens et al., 2000).

Inicialmente foi feita a solubilização de proteínas do tegumento com o detergente não iônico Triton X-100. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis no detergente foi submetido à reação de medida de atividade de hidrólise de ADP, o que comprovou a presença de uma atividade ADPásica característica de apirase, isto é, não inibida por ouabaína, azida sódica e vanadato (presentes no tampão de atividade), como mostrado na TABELA 1.

TABELA 1 – Atividade ADPásica em amostra de proteínas do tegumento de vermes adultos de *S. mansoni*

Amostra	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (nmoles Pi.mg⁻¹.min⁻¹)	Enriquecimento (número de vezes)
Extrato de proteínas do tegumento	5,94	106,7	1
sobrenadante 100.000 g (proteínas solúveis em Triton-X 100)	1,06	665,0	6,23

Podemos ver pela tabela acima que aproximadamente 18% das proteínas presentes no tegumento dos vermes adultos foram solubilizadas nas condições testadas, e que a atividade específica aumentou em quase 7 vezes, o que sugere um enriquecimento da apirase bastante considerável em apenas em um passo da purificação.

O sobrenadante obtido por centrifugação 100.000 g, foi então submetido à fracionamento de proteínas em coluna de troca aniônica (Mono-Q); ensaios de atividade de hidrólise de ADP determinaram um conjunto de amostras ativas eluídas com cerca de 0,2 M de NaCl, **FIGURA 7**.

A)

B)

FIGURA 7 - Gráficos resultantes da primeira etapa de purificação da proteína com atividade ADPásica do tegumento de *S. mansoni*, a partir das proteínas solúveis em triton X-100. Tegumento de 8.000 vermes adultos, cerca de 10 mg de proteína, foi solubilizado com triton X-100, numa proporção de 2:1 (detergente:proteína), centrifugado a 100.000 g por 1 hora a 4°C e o sobrenadante fracionado em coluna de troca iônica Mono-Q, pH 8,8, em aparelho de FPLC. (A) Gráfico da intensidade de absorção a 280 nm, que corresponde a absorção de proteínas (linha preta), e porcentagem do tampão de eluição contendo NaCl 1M (linha vermelha). (B) Gráfico mostrando atividade ADPásica (linha azul) em relação ao perfil de eluição protéico (linha preta) mostrando apenas a região onde são eluídas as amostras contendo atividade (referente ao intervalo de 12 a 18 ml) . A atividade ADPásica foi feita através da determinação de Pi livre de acordo com Tauski e Shorr, (1953), em 40 µl de cada amostra.

O próximo passo da purificação foi aplicar as amostras ativas eluídas da coluna anterior em uma coluna de troca catiônica (Mono-S). Para isto o conjunto de amostras com atividade ADPásica teve o pH acidificado para 6,0 o mesmo pH usado no tampão de eluição da coluna Mono-S, e foi realizada a segunda cromatografia (**FIGURA 8**). Esperávamos que a proteína que a pH 8,8 estava carregada negativamente, neste pH mais ácido pudesse adquirir carga parcial positiva e se ligar à coluna Mono-S (carregada negativamente) e assim ser separada de outras contidas na amostra. A análise da atividade ADPásica nas amostras eluídas da coluna Mono-S mostrou que havia apenas um pico de atividade, e este correspondia à amostras não retidas na coluna coletadas antes do início do gradiente de NaCl 2M. Este dado nos mostrou que a proteína com atividade provavelmente não possui cargas positivas suficientes, neste pH, para interagir com a coluna, tendo ponto isoelétrico abaixo de pH 6. (**FIGURA 8**).

O passo seguinte foi a separação das proteínas, recuperadas da coluna Mono-S em coluna de afinidade Hi-trap Blue. O Pool ativo da Mono-S foi ajustado para pH 7,0 e aplicado manualmente na coluna Hi-Trap Blue Sepharose (Amersham/Pharmacia Biotech). Esta é uma coluna de cromatografia de afinidade que contém o ligante denominado Cibacron®Blue 3 G-A, utilizada para separação de proteínas que requerem adenil-cofatores como NAD⁺ e NADP⁺, sendo também eficiente para ligar proteínas com alta afinidade para ATP ou ADP.

A coluna foi equilibrada e eluída com o mesmo tampão utilizado para a Mono-S porém o pH foi acertado para 7,0. Foram recolhidas amostras de 500 µl que foram analisadas quanto à atividade ADPásica e perfil protéico em SDS-PAGE, **FIGURA 9**. As amostras ativas, recuperadas deste passo da purificação, foram reunidas e concentradas em colunas Ultrafree-4 Biomax-30 e 1/10 da amostra foi analisado em SDS-PAGE junto com o conjunto de amostras das outras colunas (**FIGURA 10**).

FIGURA 8 - Gráficos resultantes da segunda etapa de purificação da proteína com atividade ADPásica do tegumento de *S. mansoni*, a partir das proteínas solúveis em triton X-100 . O conjunto de amostras com atividade ADPásica eluídas da coluna Mono-Q foi acertado para pH 6,0 e fracionado em coluna de troca iônica Mono-S, em aparelho de FPLC. (A) Gráfico mostrando intensidade de absorção a 280 nm, que corresponde a absorção de proteínas (linha preta), e porcentagem do tampão de eluição, contendo NaCl 2M (linha vermelha). A seta indica a região do espectro de absorção a 280 nm onde se encontram as amostras com atividade. (B) Gráfico mostrando atividade ADPásica (linha azul) em relação ao perfil de eluição protéico (linha preta) mostrando apenas a região onde são eluídas as amostras contendo atividade (referente ao intervalo de 0 a 15 ml) . A atividade ADPásica foi feita através da determinação de Pi livre de acordo com Tauski e Shorr (1953), em 50 μ l de cada amostra.

A)

B)

FIGURA 9 – Terceira etapa de purificação da proteína com atividade ADPásica do tegumento de *S. mansoni*, a partir das proteínas solúveis em tritonX-100. (A) O conjunto de amostras com atividade ADPásica recuperada da coluna Mono-S teve o pH acertado 7,0 e aplicado manualmente em coluna de afinidade *Hi-Trap Blue*. A eluição foi feita pela adição de tampão contendo NaCl 2M. Foram recolhidas amostras de 500 μ l dos quais 100 μ l foram usados no ensaio de hidrólise de ADP. O gráfico é referente a atividade ADPásica das amostras recolhidas. **(B)** SDS-PAGE 10% de acrilamida, corado com prata, referente a 40 μ l das amostras do gráfico da figura 5-A. **PoolQ**- 20 μ l de amostra de um total de 1 ml do conjunto de frações ativas eluídas da coluna Mono-Q. **Pool S**- 40 μ l de amostra de um total de 600 μ l do conjunto de frações ativas eluídas da coluna Mono-S. **Lanes 1 a 18**, 40 μ l de cada amostra eluída da coluna Hi-Trap Blue. As amostras 1 e 2 correspondem ao volume de tampão de equilíbrio da coluna que foi deslocado pela adição da amostra (conjunto vindo da Mono-S); o volume de lavagem após aplicação da amostra corresponde ao intervalo entre as frações 4 e 11 ; as frações restantes equivalem a região de eluição com tampão contendo 2 M de NaCl. O lane não identificado, ao lado do lane 12 corresponde ao padrão de peso molecular.

FIGURA 10 – Análise dos passos de purificação através de SDS-PAGE. Uma alíquota do conjunto de amostras, contendo atividade ADPásica, de cada passo da purificação foi analisado através de gel de acrilamida 10% corado com prata. **Pool 1** - 20 ul de amostra de um total de 1 ml do conjunto de frações ativas eluídas da coluna Mono-Q . **Pool 2** - 40 ul de amostra de um total de 600 ul do conjunto de frações ativas eluídas da coluna Mono-S. **Pool 3** – 15 ul de amostra de das frações 4 e 5 eluídas da coluna *Hi-Trap Blue* e concentradas até 120 μ l em colunas centricon 30 kDa (Millipore). A seta indica a banda protéica encontrada ao final da purificação.

O processo de purificação final pode ser sumarizado pelo esquema abaixo:

Pode-se notar, pela **FIGURA 10**, que ao final do processo de purificação obtivemos um perfil protéico contendo majoritariamente uma banda com cerca de 60 kDa. Esta amostra apresenta atividade ADPásica de cerca de 0,5 nmol de ADP hidrolisado/min por ml.

Pelos dados obtidos podemos ver que a proteína com atividade ADPásica interage somente com a primeira coluna de purificação (Mono-Q) e que nas colunas Mono-S e Hi-Trap blue a proteína ativa sai no volume de lavagem da coluna, antes do início da adição dos tampões de eluição. Apesar desta purificação por “exclusão” a proteína parece bastante purificada, porém a quantidade final recuperada é muito pequena.

Para obtermos uma amostra com mais proteína, fizemos a purificação até a passagem pela primeira coluna (Mono-Q), pois a proteína de 60 kDa parecia bastante nítida e via-se aparentemente uma banda única em torno de 60 kDa (**FIGURA 10, pool 1**). Foi corrido um gel SDS-PAGE 10 % , corado com Coomassie blue e após descoloração a banda de 60 KDa foi excisada, seca em vácuo (*speed-vac*) e enviada ao centro de análises de microsequenciamento

de proteínas da W.M. Keck Foundation da Universidade de Yale, USA. Por comparação com outras proteínas a quantidade aproximada enviada para análise foi de 5 picomoles.

A amostra foi analisada por MALDI-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry*). Para esta análise, a amostra de proteína enviada foi submetida à digestão com tripsina. A mistura de peptídeos obtida foi ionizada e acelerada em um campo elétrico, o tempo de caída da ionização dos peptídeos é medido e este dado é associado à massa molecular do peptídeo. Em geral o limite de detecção é 10-50 fmol de proteína e a precisão das massas moleculares calculadas é de $\pm 0,1\%$.

Os picos de massa bem caracterizados têm então uma massa molecular que pode ser associada a uma dada combinação de aminoácidos (peptídeo). Estes peptídeos preditos são submetidos à pesquisa das possíveis sequências, presentes no banco de dados (GenBank) que apresentam a mesma combinação de peptídeos, ou seja, maior número de peptídeos coincidentemente presentes na amostra e em dada proteína do banco de dados ("*Peptide Search*"). Os critérios mínimos para identificação através da pesquisa de peptídeos são: 1) a diferença de pelo menos 2 pontos entre o número de peptídeos similares encontrado para a proteína de maior similaridade em relação à segunda sequência listada e 2) a massa dos peptídeos preditos deve apresentar uma cobertura de pelo menos 20% da sequência da proteína. A proteína do banco que apresentar o maior número de picos coincidentes é dita como majoritária na amostra.

Outro programa de análise usado é o "*ProFound*" que dá a probabilidade de cada proteína encontrada ter peptídeos internos similares aos analisados. O valor de probabilidade determinado, pela Keck Foundation, como necessário para que o dado fosse significativo foi de 1 (100%).

A análise pelo "*ProFound*" mostrou valor de probabilidade de 1 com um precursor de carboxilesterase. Tendo uma cobertura de 31% desta proteína. O "*Peptide Search*" levou ao mesmo resultado, indicando a presença de uma proteína precursora de carboxilesterase na amostra.

De acordo com swiss-prot (<http://www.expasy.ch.sprot>), as carboxilesterases estão provavelmente envolvidas no metabolismo de xenobióticos e substratos naturais, tendo como atividade catalítica a hidrólise de um éster-carboxílico resultando em um álcool mais um ânion carboxílico. Sendo proteínas de cerca de 560 aminoácidos e peso molecular próximo a 62 kDa.

Estes dados são compatíveis com a purificação feita. Porém não está descrito que esta proteína hidrolise ADP ou ATP. Sendo esta atividade o controle de toda a nossa purificação partimos para a procura de outra proteína listada nos resultados do MALDI-MS que pudesse apresentar como função a utilização destes nucleotídeos, visto que outras proteínas podem estar presentes na amostra.

Foi feita a reanálise dos dados do espectro de massa pelo programa "ProFound", após retirados os picos correspondentes a carboxilesterase. Nos picos restantes foi encontrado um conjunto que corresponde a uma Helicase de *Schizosaccharomyces pombe* de 66 kDa, com uma cobertura de 16%. Na pesquisa com *Peptide Search*, observou-se também uma similaridade de 9 picos de massa com uma nucleosídeo trifosfatase de *Vaccinia virus*, também uma proteína da família das helicases.

As helicases participam do processo de transcrição, processamento de RNA, tradução e replicação de DNA e RNA, (Gorbalenya, A.E. et al., 1989) acoplado com a hidrólise de NTP.

Suspeitamos que a proteína obtida do tegumento de *S. mansoni* seja também representante das helicases, embora não existam estudos que demonstrem que as helicases hidrolisam nucleotídeos difosfatados (ADP) como substrato. Como utilizamos sempre a hidrólise de ADP como fator determinante da purificação, ainda é necessária a confirmação destes dados.

Recentemente, alguns estudos têm mostrado proteínas com atividade nucleosídeo difosfatase que não fazem parte da família das apirases caracterizada por Vasconcelos et al. em 1996, tais como as acilfosfatases, EC 3.6.1.7 (Paoli et al., 2000). Estas enzimas são conhecidas por hidrolizarem as ligações carboxil-fosfato em metabólitos como acetilfosfato, 1,3-bisfosfoglicerato e carbamoil fosfato (Stefani et al., 1995), bem como em proteínas como as que formam intermediários β -aspartil fosfato durante o ciclo catalítico, caso das bombas de Na^+/K^+ e Ca^{2+} (Nediani et al., 1991; Nassi et al., 1991).

Um outro tipo de enzima ligadora de nucleotídeo, que possui atividade apirásica, foi caracterizada na saliva do percevejo *Cimex lectularius* (Valenzuela, J.G. et al., 1998), uma enzima capaz de inibir a agregação plaquetária mediada por ADP.

Os genes que codificam para estas proteínas não parecem ter similaridade, a nível de similaridade de sequência primária, com a família das apirases mostrada na **FIGURA 3** (no item 1 Introdução) e mostram que existem famílias de proteínas diferentes e que apresentam algumas funções em comum, provavelmente por evolução convergente e que somente o fato da enzima hidrolizar nucleotídeo difosfato não é suficiente para a determinação da família da proteína purificada.

Durante a purificação descrita, algumas características enzimáticas foram analisadas e estão descritas nos tópicos seguintes.

4.2 - Caracterização da atividade apirásica do tegumento de vermes adultos de *S. mansoni*, presente na fração de proteínas solúveis em Triton X-100

4.2.1. Determinação das atividades de hidrólise de ADP e ATP em vermes machos e fêmeas

Utilizando amostras de proteínas do tegumento de *S. mansoni*, fizemos a caracterização da atividade apirásica presente no sobrenadante 100.000 g correspondente à fração de proteínas solúveis em Triton X-100 (2:1).

Inicialmente, foi feita uma determinação das atividades ADP e ATPásicas de vermes adultos machos e fêmeas separadamente. Para isto, os vermes foram separados por sexo (procedimento feito no Instituto Adolfo Lutz) e a extração do tegumento foi feita pelo método usual. Solubilizamos cada amostra com Triton X-100 e o sobrenadante 100.000 g foi utilizado nos experimentos de medida de hidrólise de ADP e ATP, (**FIGURA 11**).

O experimento mostrado na **FIGURA 11-A**, foi feito todo em duplicata. Os resultados sugerem que, no tegumento total, não há diferença significativa de atividade ADP ou ATPásica nem entre machos e fêmeas. Porém curiosamente podemos notar que, nas amostras

solubilizadas em Triton X-100, a atividade ADPásica aumentou bastante em relação à hidrólise de ATP; isto pode sugerir uma ativação da hidrólise de ADP ou uma inibição da atividade ATPásica pela presença do detergente.

Para verificarmos qual das hipóteses é correta, fizemos o mesmo ensaio em amostra de tegumento total homogeinizado em Triton-X100, sem separação do material solúvel e insolúvel.

FIGURA 11-B.

A)

B)

FIGURA 11- Efeito do detergente Triton X-100 na hidrólise ADP e ATP. Vermes fêmeas e machos foram separados para análise isolada das atividades ATP e ADPásicas. As amostras da fração solúvel em Triton foram obtidas como descrito em materiais e métodos item 3.8. Os ensaios foram feitos com 20µg ou 5µg de proteína, para respectivamente amostras de tegumento total ou sobrenadante solúvel em Triton-X 100. Em (A) temos: **TegF e TegM** -tegumento total de vermes fêmea e macho, respectivamente, na ausência de detergente e **SobF e SobM** – sobrenadante solúvel em Triton 1% (p/p) para vermes fêmea e macho, respectivamente. Em (B) temos a análise da relação de hidrólise ADP/ATP para amostras de vermes fêmea e macho, isoladamente ou não, frente à presença ou ausência de Triton, como indicado nas legendas.

Vemos pela **FIGURA 11**, que a adição de Triton X-100 1% resulta em significativo aumento da relação hidrólise de ADP sobre ATP, passando de uma relação ADP/ATP de aproximadamente 1:1 (colunas A e B, painel B) para 2:1 (colunas C, D, e E, painel B). A **TABELA 2** mostra a atividade específica de cada componente. Podemos concluir que na realidade o que faz com que a relação ADP/ATP aumente com a adição de Triton 1% é uma diminuição em cerca de 50 % na atividade de hidrólise do ATP.

TABELA 2- Efeito do Triton X-100 nas atividade ATP e ADPásica em extratos de tegumento de vermes adultos

Amostra	Atividade específica nmoles ATP.min⁻¹.mg⁻¹	Atividade específica nmoles ADP.min⁻¹.mg⁻¹
tegumento total – fêmeas (sem Triton)	89,5	74,6
tegumento total – machos (sem Triton)	124,6	127,22
tegumento total machos e fêmeas em Triton 1 %	48,7	92,82

Este efeito pode ser consequência da inibição da hidrólise de ATP da apirase ou de alguma outra proteína que hidrolise ATP no extrato total de proteínas do tegumento.

4.2.2 - Efeito do pH na atividade ADPásica do sobrenadante 100.000 g

Amostras de tegumento de vermes adultos foram solubilizadas com Triton X-100 como descrito anteriormente e amostras do sobrenadante 100.000 xg foram submetidas a teste de atividade de hidrólise de ADP em tampão de atividade com diferentes valores de pH (**FIGURA 12**).

FIGURA 12 - Efeito do pH na atividade ADPásica de amostras de proteínas do tegumento de *S. mansoni*, solúveis em Triton-X 100 1% (p/p). Os experimentos foram feitos em duplicata. Amostras de proteínas do tegumento, solúveis em TritonX-100, foram obtidas de acordo como descrito em Materiais e Métodos, item 3.8. O tampão de atividade enzimática foi ajustado para os pHs descritos e foi feito o ensaio de hidrólise de ADP.

Os dados da **FIGURA 12** indicam que a atividade ADPásica é muito afetada pela variação de pH6 a 9, e que em valores de pH mais alcalinos, como próximo de nove a atividade é máxima dentro da faixa testada. Para complementar estes dados, devem ser feitos testes de atividade ADP e ATPásicas em um intervalo de pH maior.

Era importante testarmos se, na amostra purificada, alguma proteína possuía imunoreatividade cruzada com apirase da família descrita em 1996, já que procurávamos por uma enzima desta família.

Como não tínhamos soros com bom título de anticorpos, que pudessem identificar a imunoreatividade cruzada com apirase, produzimos um antisoro anti-apirase de batata, usando como antígeno apirase de batata que havia sido purificada no laboratório.

O antisoro foi utilizado em ensaios de *Western blot* das amostras da purificação descrita anteriormente e de extrato de tegumento (**FIGURA 13**). Os resultados mostram reatividade cruzada com uma banda protéica de 55 kDa, majoritariamente reconhecida no extrato total de proteínas do tegumento (**canaletas 3**). Esta reação é negativa na amostra de proteínas solúveis em Triton X-100 (sobrenadante 100.000g, **canaletas 4**). Também nada é reconhecido no pool de

amostras ativas eluído da coluna Mono-Q (primeiro passo de cromatografia de troca iônica da purificação), dados não mostrados. O pellet de 100.000g, contendo proteínas insolúveis em Triton X-100, apresenta forte reação com anti-apirase (**canaletas 5, FIGURA 13**).

Os dados de *Western blot* sugerem que a enzima, purificada do tegumento com Triton X-100, que apresenta atividade de hidrólise de ADP, não possui epítomos em comum com as proteínas da família da apirase de batata. Os resultados das análises por MALDI-MS parecem sugerir que esta proteína seja similar às helicases. Ainda é necessária a total confirmação deste dado, através dos resultados de MALDI-MS da amostra purificada usando todo o processo descrito, e através de ensaio de atividade enzimática com alguma outra helicase conhecida.

Para iniciar a purificação agora de uma enzima de *Schistosoma* com atividade apirásica similar à família das CD39/GDA1/Hsp70 (*Heat shock protein*), onde se insere a apirase de batata, foram feitos testes de solubilização da proteína de *Schistosoma* reconhecida pelo soro policlonal, anti-apirase de batata. Testamos o detergente não iônico C₁₂E₈, e os detergentes iônicos lisofosfatidilcolina (LPC) e SDS. O tegumento do *Schistosoma* foi solubilizado com estes detergentes e submetido à centrifugação 100.000g, para separação do material solúvel e insolúvel. Estas amostras foram submetidas à *Western blot* com antisoro anti-apirase de batata, o que revelou que, nas concentrações usadas, somente o SDS foi capaz de solubilizar uma proteína que foi reconhecida pelo antisoro, tendo este peso molecular aproximado de 55 kDa (**FIGURA 14**).

FIGURA 13 – Immunoreatividade das amostras da purificação da apirase do tegumento de *Schistosoma*, com antisoro policlonal anti-apirase de batata. Uma amostra contendo aproximadamente 720 μ g de proteína de tegumento foi solubilizada com triton-X 100, numa proporção de 2:1 (detergente:proteína). Após a solubilização, a amostra foi centrifugada a 100.000xg por 1 hora para separação do material solúvel do insolúvel. A presença de proteína com epítipo similar a apirase de batata foi detectada por *western blot*, utilizando antisoro policlonal anti-apirase de batata 1:1.000. Amostra de 100 ng de apirase de batata (lane 2) foi usada como controle positivo. Em (A) gel de SDS-PAGE corado com coomassie blue e (B) membrana de nitrocelulose hibridada com antisoro anti-apirase e revelada por quimioluminescência com anti-IgG de coelho acoplado à peroxidase. O lanes 3 contém 30 μ g de proteínas totais de tegumento; lane 4 contém as proteínas solúveis em Triton (sobrenadante 100.000g) e o lanes 5 contém o material insolúvel em Triton, pellet 100.000g que foi solubilizado com SDS para ser aplicado no gel.

FIGURA 14 – Ensaio de solubilização da apirase do tegumento de *Schistosoma* similar a apirase de batata. Amostras de 200 μ g de proteína do tegumento foram solubilizadas separadamente com os detergentes indicados, na proporção de 2:1 (μ g de detergente: μ g proteína). Após homogeneização em *potter*, as amostras foram incubadas a 4°C por meia hora, sob leve agitação, e submetidas a centrifugação a 100.000g por 1 hora. As amostras solúveis (sobrenadante) e insolúveis (*pellet*), foram homogeneizadas em tampão de corrida, separadas em frações de aproximadamente 30 μ g e submetidas a SDS-PAGE, 10% de acrilamida. Um dos géis foi corado com coomassie blue e o outro foi submetido a *western blot* com antisoro anti-apirase de batata (1:1000). A canaleta Apy batata corresponde ao controle positivo e contém 100 ng de apirase de batata purificada, as canaletas Pellet se referem à frações insolúveis nos detergentes indicados, e Sob à frações solúveis nos detergentes indicados. A numeração à esquerda mostra a altura da migração das bandas protéicas do padrão de peso molecular em kDa.

Os resultados mostram que apesar do LPC solubilizar bastante as proteínas do tegumento, não é capaz de solubilizar a apirase similar a de batata. Com exceção do SDS, os outros detergentes testados não conseguem solubilizar uma boa fração de proteínas e também não solubilizam a apirase. O SDS além de ser um bom agente solubilizante, consegue solubilizar a apirase similar a de batata e dentre os detergentes testados, deve ser o escolhido para os processos de purificação posteriores.

Devido à possibilidade de utilização do SDS nos processos de purificação desta proteína, resolvemos testar a influência deste detergente na atividade ADPásica. Amostras de proteína de tegumento de *Schistosoma* foram incubadas com SDS nas proporções de 0,1 à 1 μg de detergente por μg de proteína, a atividade ADPásica foi medida, e os dados obtidos podem ser vistos na FIGURA 15.

FIGURA 15 – Gráfico mostrando o efeito da adição de SDS na atividade ADPásica. Amostras de 40 μg de tegumento foram misturadas com o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS), nas proporções indicadas, e submetidas ao ensaio de hidrólise de nucleotídeos como descrito em materiais e métodos item 3.7.

Os resultados mostram que o aumento da concentração de SDS no ensaio leva a uma diminuição gradativa da atividade ADPásica, chegando a um patamar de inibição de cerca de 25-30% com concentrações de 0,5 – 1,0 μg de detergente por μg de proteína. Este experimento nos mostra que é possível a utilização do SDS para solubilizar a apirase e mantê-la ativa. Esta fração poderia ser submetida a processos de purificação posteriores.

4.3 – Clonagem do gene codificante da ATP-difosfohidrolase de *S. mansoni*

Este trabalho foi iniciado com a tentativa de clonagem do gene da apirase de *S. mansoni* através de varredura (*screening*) de bibliotecas de cDNA de vermes adultos, utilizando como sonda fragmentos dos genes das apirases de *Saccharomyces cerevisiae* (GDA1) e *Toxoplasma gondii* (NTP_TOXGO), ambas pertencentes a família CD39/GDA1/Hsp70. Foi feita a varredura em mais de 2 milhões de clones. Foram isolados alguns clones positivos, mas o sequenciamento revelou que não eram genes codificantes da família das apirases.

A abordagem da tentativa de clonagem foi modificada. Foram desenhados oligonucleotídeos degenerados, feitos a partir do alinhamento da sequência de aminoácidos das apirases clonadas até aquele momento. No início eram 9 as proteínas desta família no banco de dados (GenBank) e as regiões mais homólogas denominadas ACR1, ACR2, ACR3 e ACR4 (FIGURA 16), que foram usadas como referência para o desenho manual dos *primers* degenerados (com cerca de 18 bases). As reações de PCR foram feitas inicialmente em amostras de DNA genômico de vermes adultos. Obtivemos padrões multibanda mas o sequenciamento de alguns dos clones não revelou similaridade com a família das apirases (dados não mostrados).

FIGURA 16- Alinhamento dos 9 representantes iniciais da família das apirases (Vasconcelos et al., 1996). Os blocos circundados por linhas interrompidas indicam as regiões de aminoácidos conservados (vermelho-ACR1; amarelo-ACR2; verde-ACR3; azul-ACR4). Os blocos circundados por linhas inteiras indicam sequências idênticas entre apirase de batata e ervilha. *potato apyrase* corresponde a sequência de três peptídeos obtidos no trabalho de Vasconcelos et al., 1996. Outras sequências e seus números de acesso no banco de dados são: Yeast GDPase, *Saccharomyces cerevisiae* (P32621); pea NTPase, *Pisum sativum* nucleosídeo trifosfatase (S48859); mouse lymph, CD39 de camundongo (gi765257); human lymph, CD39 humano (S73813); *C. elegans* R07E4, cosmídeo R07E4 (gi1049394); *C. elegans* C33H5, cosmídeo C33H5 (gi086594); Yeast GDA1 homolog, proteína hipotética de 71,9-kDa protein na região intergênica PMI40-PAC2 (P40009) e *Toxoplasma* NTPase, nucleosídeo trifosfatase de *T. gondii* (L39077).

yeast GDPase	1	mapifrnryrf	aigafavImL	ILlIkttssig	pPsiartvtp	nasIpktPeD	iSiIipvnepd	gylqdsKteq	nypeladAVK	sqtsqtcsEe	90	
pea NTPase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
mouse lymph		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
human lymph		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
C. elegans R07E4		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
C. elegans C33H5		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
yeast GDAl homolog		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Toxoplasma NTPase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
potato apyrase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Consensus		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
yeast GDPase	91	hKYV.....	SGG.....	SGG.....	RvhiYK	Fd.....	vctSPptLLd	.....	ekFD.....	.....	180	
pea NTPase		ssYa.....	VVF.....	SGG.....	RihVhY	Fn.....	qnlDLLH	IgkvVeyYn	.....	.....	.....	
mouse lymph		VKY.....	VLD.....	SSh.....	tnLIYK	W.....	PaEkeN	dtgVVqQLEK	CqVK.gPGIS	KYAqK	.....	
human lymph		VKY.....	VLD.....	SSh.....	tnLIYK	W.....	PaEkeN	dtgVVHqVKE	CRVK.gPGIS	kFvqK	.....	
C. elegans R07E4		rsY.....	VLD.....	SSG.....	TRLFVYn	Wist.....	SdsELiQ	IepVIYdnkp	vmkKisPGLS	tFgtK	.....	
C. elegans C33H5		IKY.....	VLD.....	SSG.....	TRLFVYt	Lkpl.....	Sgg.LtN	IdtLIHesEp	vvhKvtPGLS	SFGdK	.....	
yeast GDAl homolog		drY.....	VLD.....	SSG.....	RihVFK	WqdTeSILha	tnqdsqslILQ	svphIHQeKd	WtFkLnPGLS	SfakK	.....	
Toxoplasma NTPase		lqalV.....	VLD.....	SSG.....	RtnVF	LakTrScpnar	grsidpDair	lirdgkrFtg	LRVvLEewLd	tYagKdweasr	.....	
potato apyrase		ehYa.....	VLD.....	SSG.....	RtnVF	LakTrScpnar	grsidpDair	lirdgkrFtg	LRVvLEewLd	tYagKdweasr	.....	
Consensus		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
yeast GDPase	181	LdPLLkVAmn	yVPikaRsc	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	270	
pea NTPase		LiPLLEqAED	VVPdldqpk	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
mouse lymph		LaechELste	LIPTSkhhq	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
human lymph		LTdcMERArE	VIPeSqhqE	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
C. elegans R07E4		LrPLMELEAr	hIPEekRpy	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
C. elegans C33H5		LTPLLEFAEE	hIPyeQLgE	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
yeast GDAl homolog		ikPLLDFAkn	IIPESHwss	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Toxoplasma NTPase		LmqLLEedtv	aILDSQInEe	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
potato apyrase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Consensus		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
yeast GDPase	271	GvF.....	WIT.....	LLGniGan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	360	
pea NTPase		CaY.....	WIT.....	LLGniGKk	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
mouse lymph		CaY.....	WIT.....	LLGniGKk	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
human lymph		CaY.....	WIT.....	LLGniGKk	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
C. elegans R07E4		GIY.....	WIT.....	LLGniGKk	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
C. elegans C33H5		GIY.....	WIT.....	LLGniGKk	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
yeast GDAl homolog		GIY.....	WIT.....	LLGniGKk	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Toxoplasma NTPase		GIY.....	WIT.....	LLGniGKk	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
potato apyrase		GIY.....	WIT.....	LLGniGKk	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Consensus		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
yeast GDPase	361	qfShLGYGk	eGRnKvnsVL	Venaikdcki	lkgDntkthq	LssPCLppkv	naTnekvtLE	skEtytidFi	gpd.....	.....	450	
pea NTPase		VHSYlhFgE	asR.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
mouse lymph		tHSFLCYGkd	qalW.....	QKL	akdiQvsSGG	VlkDPCFhPG	YkKvvnvSDI	ykTPCtKFE	.....	.....	.....	
human lymph		tHSFLCYGkd	qalW.....	QKL	akdiQvaSne	IlrDPCFhPG	YkKvvnvSDI	ykTPCtKFE	.....	.....	.....	
C. elegans R07E4		VtTFIGYGVn	eGIRKYEahm	lslklkqmqT	ViqpDCMpln	LhKtvtleng	en.....	.....	.....	.....	.....	
C. elegans C33H5		stTFIGYGVn	eGIRKYEahm	lslklkqmqT	ViqpDCMpln	LhKtvtleng	en.....	.....	.....	.....	.....	
yeast GDAl homolog		VstWLGYGan	qARRRYlaql	Intlpentnd	yeNDdfeTrn	LMDPCmrgs	st.....	.....	.....	.....	.....	
Toxoplasma NTPase		svSFMqLGma	ssagILFLkeL	csndeflqGG	IcsnPCLFkG	FqqscsagEv	evrPdgsasv	nEDVrkznLK	platycshn	peisfkvtne	.....	
potato apyrase		VHSYlnYqql	aGR.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Consensus		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
yeast GDPase	451	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	540	
pea NTPase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
mouse lymph		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
human lymph		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
C. elegans R07E4		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
C. elegans C33H5		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
yeast GDAl homolog		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Toxoplasma NTPase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
potato apyrase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Consensus		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
yeast GDPase	541	plg.....	Mpls	ftlnELndLa	rIVcK.geet	WnsVFsGiag	s.....	ldelEs	dShFLdlSF	qVSLLEtGY	.....	630
pea NTPase		dtg.....	Mvda	stpnfilrpv	DIetK.akea	calnFEdaKs	Typfldkknv	aSYvCmldiY	qVLLVdGF	gLD..plQki	tsGkeieYQd	.....
mouse lymph		FFk.....	kvak	nsvisqEKMT	EitknFCSKs	WaEt.....	K	TsYpsVkeKY	LSEYCFsgAY	ILS.LlgGY	nftd.....	.....
human lymph		FLn.....	ltse	k.vsqEKvt	EmmkKFCaqp	WaEt.....	K	TsYagVkeKY	LSEYCFsgAY	ILS.LlgGY	hfta.....	.....
C. elegans R07E4		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
C. elegans C33H5		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
yeast GDAl homolog		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Toxoplasma NTPase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
potato apyrase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Consensus		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
yeast GDPase	631	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	720	
pea NTPase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
mouse lymph		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
human lymph		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
C. elegans R07E4		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
C. elegans C33H5		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
yeast GDAl homolog		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Toxoplasma NTPase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
potato apyrase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Consensus		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
yeast GDPase	721	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	810	
pea NTPase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
mouse lymph		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
human lymph		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
C. elegans R07E4		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
C. elegans C33H5		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
yeast GDAl homolog		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Toxoplasma NTPase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
potato apyrase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Consensus		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
yeast GDPase	811	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	830	
pea NTPase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
mouse lymph		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
human lymph		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
C. elegans R07E4		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
C. elegans C33H5		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
yeast GDAl homolog		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Toxoplasma NTPase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
potato apyrase		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Consensus		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

O alinhamento mostrado na **FIGURA 16** mostra apenas os nove primeiros representantes da família das apirases, que foram inicialmente postulada por dois grupos em 1996 (Vasconcelos et al., e Handa & Guidotti). Hoje esta família é usualmente chamada de família CD39, talvez por esta proteína ser uma das mais estudadas da família.

Os blocos homólogos ACR1, ACR2 e ACR4 foram utilizados como base para o desenho de *primers* degenerados. O esquema abaixo mostra a direção e localização dos *primers* desenhados, em relação ao tamanho e posicionamento médio das regiões conservadas na família descrita:

4.3.1 - CODEHOP (*Consensus degenerate Oligonucleotide Primer*)

Através de pesquisa bibliográfica sobre PCR com *primers* degenerados encontramos um artigo descrevendo o desenho desses como “híbridos cosenso-degenerados” (Rose et al., 1998). Este trabalho mostra um novo método computacional disponível na Web (<http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>), que desenha conjuntos de *primers* híbridos tendo como informação inicial blocos de sequência de aminoácidos conservados obtidos a partir do alinhamento de proteínas de uma mesma família. Os *primers* são chamados híbridos porque contém uma pequena região 3' degenerada, chamada núcleo (“core”) (com 9 a 12 bases) e uma região maior 5' não degenerada denominada de grampo (“clamp”). A região 3' é desenhada a partir de 3 a 4 aminoácidos altamente conservados. A região 5' é desenhada levando-se em conta qual o aminoácido mais frequente naquela posição e qual o códon mais representado deste aminoácido. Esta técnica foi denominada CODEHOP (*Consensus Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer*).

Os *primers* são geralmente grandes, com cerca de 40 bases e temperatura de “anelamento” alta, o que favorece PCR do tipo “touch down”, com temperaturas de

“*anelamento*” decrescentes durante a evolução dos ciclos. Estas características, de acordo com o trabalho de Rose et al., favoreceriam a amplificação de fragmentos de genes distantemente relacionados, sendo que o uso da diminuição gradual da temperatura de “*anelamento*” favoreceria alvos mais específicos não tendo utilização preferencial de *primers*. Este fato seria explicado pela presença do grampo, região não degenerada, igual para todos os oligonucleotídeos da mistura degenerada e que estabilizaria o “*anelamento*” a partir do segundo ciclo de PCR, fazendo com que todos fossem gastos igualmente. Esta seria a principal vantagem destes *primers* em relação aqueles degenerados comuns (**FIGURA 17**).

A partir desta referência desenhamos novos *primers* para clonagem da apirase de *S. mansoni*. Todos eles representantes das regiões conservadas ACR1, 2 e 4 e com alta degeneração (de 512 a 1092), devido a presença de aminoácidos conservados porem não idênticos nos domínios homólogos na família das apirases e à alta degeneração dos códons das regiões conservadas, ricas em glicina, serina e treonina.

A) PCR com primer degenerado **B) Primers híbridos consenso-degenerados**

FIGURA 17- Comparação esquemática entre PCR com *primers* degenerados usuais (A) e *primers* CODEHOP (B). Ilustração mostrando as regiões sem pareamento no anelamento entre *primer:alvo* durante os primeiros ciclos de PCR e o anelamento entre *primer:produto* durante os ciclos subsequentes. As linhas verticais indicam pareamento de nucleotídeo entre primers (seta) e o alvo (*template*) ou produto sintetizado. A degeneração total é o produto das degenerações em cada posição, a fração que hibrida dos primers é igual a 1/degeneração, Rose et al., 1998.

4.3.2 - Desenho dos *Primers* Híbridos Consenso-Degenerados

Para o desenho foi feito o alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos das proteínas da família das apirases disponíveis no banco de dados. Este passo foi feito através do programa CLUSTALW, (<http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>). O alinhamento então foi analisado por outro programa (*BlockMarker*) que define blocos de similaridade dentro das sequências alinhadas; estes programas estão incluídos na estratégia CODEHOP. Estes blocos são utilizados no desenho dos *primers*. São necessários apenas 3 a 4 resíduos de aminoácidos altamente conservados para o desenho da região degenerada (“core”).

Inicialmente desenhamos pares de *primers* CODEHOP baseado nos blocos de similaridade da FIGURA 16, detalhados agora na FIGURA 18, que contém um número maior de sequências alinhadas.

FIGURA 18- Alinhamento múltiplo parcial das sequências de aminoácidos das seguintes proteínas classificadas como apirases:

gi3004932 *H. sapiens*; gi1732249 *G. gallus*; gi2921585 *M. musculus*; gi2707342 *M. musculus*; gi2499219 *M. musculus*; gi2135580 *H. sapiens*; gi2648049 *R. norvegicus*; gi2240205 *Bos taurus*; gi1754710 *R. norvegicus*; sp|Q21815|YBU4_CAEEL *C. elegans*; gi1049394 *Mus musculus*; P32621, *S. cerevisiae*; gi3153211 *H. sapiens*; gi2935640 *Mus musculus*; gi2499222YY4E_CAEEL, *C. elegans*; gi2280488 *H. sapiens*; gi2129890, *Garden pea*; pir|S50463, *S. cerevisiae*. Os aminoácidos em vermelho correspondem ao bloco ACR1, em verde ACR2 e em amarelo ACR4. Os asteriscos (*) representam os aminoácidos idênticos em todas as sequências alinhadas; os dois pontos (:) representam aminoácidos conservados (da mesma subfamília).

P32621| *S. cerevisiae* ISILFVNDEPGYLQDSKTEQNYPELADAVKSQTSQTCSEEHKYVIMIDAG 100
 Q21815 *C. elegans* RVSLRFTILAVSAMIFFPVIVFIYVVEAHTSPKVIADDQERSYGVICDAG 51
 1049394 *M. musculus* RVSLRFTILAVSAMIFFPVIVFIYVVEAHTSPKVIADDQERSYGVICDAG 51
 2499222 *C. elegans* -----MSGSSSERVQSRVS-----VVEKNNIKYGVICDAG 32
 3153211 *H. sapiens* LYFSVVIIRNKYGRLLTRDKKFORYLARVTDIEATDTNNPNVNYGIVVDCG 97
 2280488 *H. sapiens* -----GRLTRDKKFORYLARVTDIEATDTNNPNVNYGIVVDCG 38
 2921585 *M. musculus* -MAGKLVSLVPPILLAAVGLAGLILLCLVP--TQDVREPPALKYGIVLDAG 47
 2648049 *R. novergicus* -MAGKLVSLVPPILLAAAGLTGLILLCLVP--TQDVREPPALKYGIVLDAG 47
 1732249 *G. gallus* -MARRAAVL--LLALGCLLGILLCLG--SGDARGPPSFKYGIVLDAG 45
 2707342 *M. musculus* SKVKRFCSKNILIIILGFTSILAVIALIAVGLTQNKPLPENVKYGIVLDAG 56
 2499219 *M. musculus* SKVKRFCSKNILIIILGFTSILAVIALIAVGLTQNKPLPENVKYGIVLDAG 56
 g1754710 *R. novergicus* SKVKRFCSKNILIIILGFTSILAVIALIAVGLTQNKPLPENVKYGIVLDAG 56
 2135580 *H. sapiens* SNVKTFCCKNIIAILGFSSIIAVIALIAVGLTQNKALPENVKYGIVLDAG 56
 2240205 *B. taurus* SELKVFCCKNIIILGFTSIIAVIALIALGLTQNKALPENVKYGIVLDAG 56
 3004932 *H. sapiens* LKALYRTPITIALVVLVSVIVLVSITVIQIHQEVLPPLKYGIVLDAG 64
 S50463 *S. cerevisiae* -----MLIENTNDRFGIVIDAG 17
 2935640 *M. musculus* GAVFMIIACVGSTVFYREQQTWFEQVFLSSMCPINVSAGTFYGMIFDAG 55
 2129890 *G. pea* ELLIKLITFLFESMPAITSSQYLGNNLLTSRKIFLQKEISSYAVVFDAG 51
 : : : *

P32621| *S. cerevisiae* STGSRVHIYKFDVCTSPF---TLLDEKFD-----MLEPGLS 133
 Q21815 *C. elegans* STGTRLFVYNWISTSDSE--LIQIEPVIYDN-KPVMK-----KISPGLS 92
 1049394 *M. musculus* STGTRLFVYNWISTSDSE--LIQIEPVIYDN-KPVMK-----KISPGLS 92
 2499222 *C. elegans* SSGTRLFVYTLKPLSGG--LTNIDTLIHES-EPVVK-----KVTPGLS 72
 3153211 *H. sapiens* SSGSRVFVYCWPRHNGNPHDILLDIRQMRDKNRKPKVVM-----KIKPGIS 141
 2280488 *H. sapiens* SSGSRVFVYCWPRHNGNPHDILLDIRQMRDKNRKPKVVM-----KIKPGIS 82
 2921585 *M. musculus* SSHTSMFVYKWPADKEND---TGIVGQHSSC---D-----VRGGGIS 83
 2648049 *R. novergicus* SSHTSMFVYKWPADKEND---TGIVGQHSSC---D-----VQGGGIS 83
 1732249 *G. gallus* SSHTAVFIYKWPADKEND---TGVVSEHSMC---D-----VEGPGIS 81
 2707342 *M. musculus* SSHTNLIIYKWPADKEND---TGVVQLEEC---Q-----VKGPGIS 92
 2499219 *M. musculus* SSHTNLIIYKWPADKEND---TGVVQLEEC---Q-----VKGPGIS 92
 g1754710 *R. novergicus* SSHTNLIIYKWPADKEND---TGVVQLEEC---Q-----VKGPGIS 92
 2135580 *H. sapiens* SSHTSLIIYKWPADKEND---TGVVQVEEC---R-----VKGPGIS 92
 2240205 *B. taurus* SSHTSLIIYKWPADKEND---TGVVQVEEC---R-----VKGPGIS 92
 3004932 *H. sapiens* SSRTTVVYQWPAEKENN---TGVVSQTFKC---S-----VKSGGIS 100
 S50463 *S. cerevisiae* SSGSRIVHVFKQDTEILLHATNQDSQSILQSVPHIQEKDWTFKLNPGLS 67
 2935640 *M. musculus* STGTRIHVYTFVQKTAGQ--LPFLEGEIFDS-----VKPGLS 90
 2129890 *G. pea* STGSRIVHYHFNQNLDLL--HIGKGVYYN-----KITPGLS 86
 *: : : : : *

P32621| *S. cerevisiae* SFDTDSV-GAANSLDPLLKVAMNYVPIKARSCTPVAVKATAGLRLLGDA- 181
 Q21815 *C. elegans* TFGTKPA-QAAEYLRPLMELAEHRHPEEKRPYTPVFIFATAGMRLIPDEY 141
 1049394 *M. musculus* TFGTKPA-QAAEYLRPLMELAEHRHPEEKRPYTPVFIFATAGMRLIPDEY 141
 2499222 *C. elegans* SFGDKPE-QVVEYLTPLLRFAEHIPYEQGETDLLIFATAGMRLIPDEY 120
 3153211 *H. sapiens* EFATSPE-KVSDYISPLLNFAAEHVPRAKHKEPTLYILCTAGMRLIPES- 189
 2280488 *H. sapiens* EFATSPE-KVSDYISPLLNFAAEHVPRAKHKEPTLYILCTAGMRLIPES- 130
 2921585 *M. musculus* SYANDPS-RAGQSLVCEQLALRDVPRDRHASTPLYLGATAGMRLNLNT- 131
 2648049 *R. novergicus* SYANDPS-RAGQSLVCEQLALRDVPRDRHASTPLYLGATAGMRLNLNT- 131
 1732249 *G. gallus* SYSSKPP-AAGKSLEHCLSQAMRDVPKEKHADTPLYLGATAGMRLTLTA- 129
 2707342 *M. musculus* KYAQKTD-EIGAYLAECMELSTELIPTSKHHQTPVYLGATAGMRLLRME- 140
 2499219 *M. musculus* KYAQKTD-EIGAYLAECMELSTELIPTSKHHQTPVYLGATAGMRLLRME- 140
 g1754710 *R. novergicus* KYAQKTD-EIAAYLAECMKMSTERIPASKQHQTTPVYLGATAGMRLLRME- 140
 2135580 *H. sapiens* KFYQKVN-EIGIYLTDCMERAREVIPSQHQTTPVYLGATAGMRLLRME- 140
 2240205 *B. taurus* GFAKKVN-EINVYLTACMERAKVIPSQHMETPVYLGATAGMRLLRME- 140
 3004932 *H. sapiens* SYGNPQ-DVPRAFECMQKVKQVPSHLHGSTPIHLGATAGMRLRLQ- 148
 S50463 *S. cerevisiae* SFEKKPDAYKSHIKPLLDFAKNIIPESHWSQPVFIQATAGMRLLPQD- 116
 2935640 *M. musculus* AFVDQPK-QGAETVQELLEVAQDSIPRSHWERTPVVLKATAGLRLLPEQ- 138
 2129890 *G. pea* SYANNPE-QAAKSLIPLEQAEDVVPDDLQPKTPVRLGATAGLRLLNGD- 134
 : . : : *

P32621| *S. cerevisiae* ----KSSKILSAVRDHLKDYPPFVVEGDG-VSIMGGDEEGVFAWITTY 226
 Q21815 *C. elegans* VLIQKEAVLKNLRNKLPKITSMQVLKEH--IRIIEGKWEIGYISWIAVNY 189
 1049394 *M. musculus* VLIQKEAVLKNLRNKLPKITSMQVLKEH--IRIIEGKWEIGYISWIAVNY 189
 2499222 *C. elegans* ----QKDAIKNLQNLKSVTALRVSDSN--IRIIDGAWEGYISWIAVNY 164
 3153211 *H. sapiens* ----QKDAIKNLQNLKSVTALRVSDSN--IRIIDGAWEGYISWIAVNY 233
 2280488 *H. sapiens* ----QKDAIKNLQNLKSVTALRVSDSN--IRIIDGAWEGYISWIAVNY 174
 2921585 *M. musculus* ----SPEATKVLAEVQTTLTRYPFDFRG--ARILSGQDEGVFGWVTANY 175
 2648049 *R. novergicus* ----SPEATKVLAEVQTTLTRYPFDFRG--ARILSGQDEGVFGWVTANY 175
 1732249 *G. gallus* ----DPFS-QTCLSAVMATLKSYPFDFRG--AKILSGEEGVFGWVTANY 172
 2707342 *M. musculus* ----SEQSADEVLAAVSTSLKSYPFDFRG--AKIITGQEEGAYGWITTY 184
 2499219 *M. musculus* ----SEQSADEVLAAVSTSLKSYPFDFRG--AKIITGQEEGAYGWITTY 184
 g1754710 *R. novergicus* ----SKQSADEVLAAVSRSLKSYPFDFRG--AKIITGQEEGAYGWITTY 184
 2135580 *H. sapiens* ----SEELADRVLDVVERSLSNYPFDFRG--ARIITGQEEGAYGWITTY 184
 2240205 *B. taurus* ----NKQMAKILAAVASSISEYPFDFRG--ARIISGQEEGAYGWITTY 184
 3004932 *H. sapiens* ----NETAANEVLESIQSYFQSQPFDFRG--AQIISGQEEGVFGWITTY 192


```

850463 S. cerevisiae  ----IQSSILDGLCQGLKHPAEFLVEDCSAQIQVIDGETEGLYGWLGLNY 162
2935640 M. musculus  -----KAQALLLEVEEIFKNSPFLVPDGSVSI MDGSGYEGILAWVTVNF 181
2129890 G. pea       ----ASEKILQSVRDMLSNRSTFNVQPD--VSIIDGTQEGSYLWVTVNY 178
      :               .               :: * ** *: *:

```



```

P32621| S. cerevisiae  LLGNIGANG-----P-----KLPTAAVFDLGGGSTQIVF 255
Q21815 C. elegans     ALGKFNKTATLD-----FPGTSP-AHARQKTVGMIDMGGASAQIAF 229
1049394 M. musculus   ALGKFNKTATLD-----FPGTSP-AHARQKTVGMIDMGGASAQIAF 229
2499222 C. elegans     ILGRFDK-----ENDSKVGMIDMGGASVQIAF 191
3153211 H. sapiens      VLGRFEHIEDDD EAVVEVNIPGSESSE-AIVRKRRTAGILDMGGVSTQIAY 282
2280488 H. sapiens      VLGRFEHIEDDD EAVVEVNIPGSESSE-AIVRKRRTAGILDMGGVSTQIAY 223
2921585 M. musculus     LLENFIKY-----GWVGRWI--RPRKGTLGAMDLGGASTQITF 211
2648049 R. novergicus    LLENFIKY-----GWVGRWI--RPRKGTLGAMDLGGASTQITF 211
1732249 G. gallus         LLENFIKR-----GWLGEWI--QSKKRTLGAMDFGGASTQITF 208
2707342 M. musculus    LLGRFTQEQ-----SWLSLIS-DSQKQETFGALDLGGASTQITF 222
2499219 M. musculus    LLGRFTQEQ-----SWLSLIS-DSQKQETFGALDLGGASTQITF 222
g1754710 R. novergicus LLGRFTQEQ-----SWLN FIS-DSQKQATFGALDLGGSSSTQVTF 222
2135580 H. sapiens         LLGKFSQKT-----RWF SIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTF 223
2240205 B. taurus       LLGKFTQKL-----SWFNLKPSKDDTQETYGALDLGGASTQITF 223
3004932 H. sapiens       LMGNFLEKN-----LWHMWVH--PHGVETTGALDLGGASTQISF 229
850463 S. cerevisiae  LYGHFN DYN-----P-EVSDHFTFGFMDMGGASTQIAF 194
2935640 M. musculus    LTGQLHGRG-----QETVGTLDLGGASTQITF 208
2129890 G. pea         ALGNLGKKY-----TKTVGVIDLGGGSVQMAV 205
      .:               . . :*: ** *: *: :

```

Abaixo temos a lista dos primeiros *primers* desenhados, sendo que foram feitos dois *primer*s para cada bloco descrito: (Y= C ou T; K= G ou T; S= G ou C; B= C, G ou T e V= A, C ou G; I= inosina). A região em vermelho corresponde a parte degenerada dos *primers*.

BLOCO ACR1

APYBAFI- 5'CAGAACGTGTTAAATATGGTATTGTGAT^C^D ^A ^G ^S **NGAYKSNGGNTC** 3'

APYBAF2- 5'CAGAACGTGTTAAATATGGTATTGTGAT^C^D ^A ^G ^S **NGAYKSNGGNAG** 3'

BLOCO ACR2

APYBCF1- 5'CTGAAACTCCAGTTTTTATATGTGCTAC^T ^A ^G ^M **NGCIGGNATG** 3'

APYBCF2- 5'CTGAAACTCCAGTTTTTATATGTGCTAC^T ^A ^G ^L **NGCIGGNBT** 3'

BLOCO ACR4

APYBFR1- 5'AAAAGCAATTTGAGTAGAAGCA^F ^L ^M ^D ^F **CCICCN**AVNTCNA 3'

APYBFR2- 5'AAAAGCAATTTGAGTAGAAGCA**CCICCN**AVNTC 3'

4.3.3 – Identificação no DNAg de novos genes de *S. mansoni* através PCR com *Primers* Híbridos desenhados para Apirase

Inicialmente as reações foram feitas utilizando-se DNA genômico de *S. mansoni* como alvo. Os vermes foram macerados em gelo seco, lisados em tampão de digestão contendo proteinase K e SDS, o DNA foi extraído com fenol:clorofórmio e purificado por precipitação com acetado de amônio e etanol, **FIGURA 19**.

FIGURA 19 - Amostra de DNA genômico extraído de vermes adultos de *S. mansoni*. Em (1) temos 500 ng de padrão de peso molecular λ BstE II, a seta indica a banda de 20 kb; em (2) 300 ng de DNAg utilizado como alvo nas reações de PCR com *primers* CODEHOP para apirase.

Foram feitas várias reações de PCR utilizando-se o abaixamento da temperatura de “*anelamento*” de grau em grau (“*touch-down*”), o que favoreceria a amplificação de templates mais específicos e em maior quantidade.

Várias reações de PCR foram feitas em meio contendo tampão próprio da enzima usada, 2 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 300 ng de DNA genômico e 5 unidades de Taq DNA polimerase (Gibco ou Perkin Elmer). O programa utilizado para amplificação incluía abaixamento de 1°C na temperatura de “*anelamento*” a cada ciclo, variando então de 63 a 55°C e mantendo a última temperatura até completar 35 ciclos. Uma fração de cada amostra foi analisada em gel de agarose

corado com brometo de etídeo, mostrando pouca ou nenhuma amplificação (**FIGURA 20, painel A**).

Foram feitas então reações de NESTED-PCR, com *primers* internos (região ACR2), naquelas reações em que inicialmente foi utilizado o par de *primers* referente as regiões ACR1 e ACR4. As reações inicialmente amplificadas com os *primers* da região ACR2 e ACR4, foram re-amplificadas com os mesmos pares de *primers* (**FIGURA 20, painel B**).

As bandas mais evidentes foram excisadas do gel, recuperadas com Kit QIAEXII (Qiagen) e os fragmentos purificados foram ligados em plasmídeo Bluescript. Vários clones foram selecionados de forma aleatória e parcial ou totalmente sequenciados.

FIGURA 20 – PCR com primers CODEHOP para apirase, em DNA genômico de *S. mansoni*. Gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídeo. As reações foram feitas em meio contendo tampão próprio da enzima, 2mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 300 ng de DNA g e 5 unidades de Taq Gold (Perkin Elmer). O programa utilizado para amplificação inclui abaixamento de 1°C na temperatura de anelamento em cada ciclo, variando de 63-55°C e mantendo a última temperatura até completar 35 ciclos (touch-down). (A) 15 ul de cada reação do PCR inicial, com os primers indicados. (B) 15 ul do nested-PCR ou re-amplificação, feitos a partir de 1 ul das reações iniciais. (MW) corresponde ao padrão de peso molecular utilizado e (controle) indica as reações feitas em plasmídeo contendo a apirase de levedura, GDA1.

Para produção dos templates para sequenciamento utilizamos: PCR de colônia ou minipreparação plasmidial. Para o PCR de colônia foram feitas reações individuais de PCR utilizando como template separadamente várias colônias obtidas na transformação e os *primers* T3 eT7 flanqueadores dos sítios onde foram inseridos os fragmentos. As minipreps de DNA plasmidial foram feitas pelo método descrito em Sambrook, 1989; com algumas modificações descritas em materiais e métodos. Vários fragmentos foram sequenciados pelo método de Sanger, com dideoxinucleotídeos fluorescentes em instrumento para sequenciamento automático ABI 377 (Perkin Elmer). A análise das sequências foi feita através de BlastX utilizando-se para isto o programa GCG (Wisconsin Package). As sequências foram analisadas primeiramente no próprio programa de sequenciamento da máquina ABI 377 (Perkin Elmer), onde foram retiradas as regiões do plasmídeo. Com o fragmento amplificado isolado foram feitas as análises da sequência: inicialmente foi feito o mapeamento de cada clone mostrando a tradução da sequência nos 6 *frames* possíveis, analisamos quais o *primers* CODEHOP amplificaram o clone, e fizemos pesquisa de similaridade no bando de dados (GeneBank) de proteína e DNA.

Nenhum clone apresentou similaridade significativa com proteínas da família das apirases, porém alguns novos prováveis genes de *S. mansoni* foram identificados.

Foram analisados 56 clones; destes 15 mostraram similaridade com proteínas de outros organismos, sendo então classificados como prováveis genes novos em *S. mansoni* e um clone mostrou similaridade com uma proteína conhecida de *S. mansoni*. O restante das sequências não apresentaram similaridade com nenhuma sequência conhecida (através de BlastX). A TABELA 3 mostra os resultados desta análise para as sequências que apresentaram alguma similaridade com outras sequências conhecidas. As sequências sem similaridade não foram colocadas nesta análise porque, por serem sequências genômicas curtas, não foi possível avaliar se são regiões codificantes ou não.

TABELA 3- Clones Homólogos a Genes Conhecidos de Outras Espécies (novos em *S. mansoni*)

CLONE	SIMILARIDADE- BLASTX
1	(D64052) Citocromo P 450 – <i>Nicotiana tabacum</i> - E= 2e-13
2	(M69157) Colesterol esterase – <i>Rattus norvegicus</i> - E= 1e-26
3	(L43592) Protocaderina – <i>Rattus norvegicus</i> - E= 2e-36
4	(d1033423) MEGF4 - <i>Rattus norvegicus</i> - E= 2e-06
5	(2649806) Diaminopimelato decarboxilase- <i>Archaeoglobus fulgidus</i> - E= 4e-08
6	(U89492) Arilsulfatase – <i>Neurospora crassa</i> - E= 8e-04
7	(P37709)Tricohialina – Rabbit – E=1,8e-05
8	(Q60283)mjec124- proteína hipotética- <i>Methanococcus jannaschii</i> E= 5,6e-04
9	(P14404) EVI1 – <i>Mus musculus</i> - E= 4,6e-07 (ecotropic virus integration 1 site protein)
10	(P70670) alpha-nac, gp220- <i>M. musculus</i> - E= 1,1e-06
11	(O15020) <i>Homo sapiens</i> Kiaa0302- E= 8,3e-04
12	(P25558) BUD3_Yeast – <i>S. cerevisiae</i> - E= 1,3e-05
13	(Q90840) a variant of tsc-22- <i>Gallus gallus</i> - E= 1,0e-07
14	(o00508) latent tgf-beta binding protein-4- <i>Homo sapiens</i> - E=1,2e-05
15	(o087950) alfa glicosidase- <i>M. musculus</i> - E= 1,5e-04

Esses dados foram obtidos por pesquisa de similaridade através de BlastX das sequências produzidas por PCR em DNAg de *S. mansoni* em relação ao banco de dados não redundantes do NCBI.

Frente a identificação de 15 novos prováveis genes de *S. mansoni* resolvemos utilizar a abordagem dos *primers* CODEHOP, para a descoberta de novos genes em maior escala, utilizando-se o cDNA de vermes adultos como template. O cDNA é obtido através da transcrição reversa do RNA mensageiro e representa diretamente a sequência codificante do gene. Apenas as extremidades do RNAm não são regiões codificadoras. As sequências assim obtidas são ditas sequências expressas (EST – *Expressed Sequence Tag*). Uma grande vantagem de se utilizar esta abordagem é que as sequências produzidas, em sua maioria, podem ser classificadas como codificantes, mesmo aquelas que não possuem similaridade com outra sequência, sendo estas classificadas como novos genes descobertos.

4.3.4 - RT-PCR com *primers* híbridos (CODEHOP)

A utilização de cDNA é bem mais adequada para a identificação de genes diversos, pois o DNA genômico contém introns que dificultam a identificação da região codificante dos genes.

A caracterização do cDNA através da análise de ESTs é uma técnica que facilita o rastreamento de muitos genes em muito menos tempo e menor custo que o sequenciamento de genomas completos, podendo inclusive auxiliar na montagem dos genomas, já que as ESTs indicam quais regiões codificam proteínas. Esta técnica em larga escala foi introduzida por Adams et al., em 1991.

Inicialmente as Ests de organismos eucariotos eram produzidas principalmente através da transcrição reversa das moléculas de RNAm com *primers* poliT. Estes anelam principalmente na extremidade 3' do RNAm onde se encontra a região PolidA (poliadenilada), característica exclusiva dos RNAm de organismos eucariotos. A clonagem de todas as moléculas de cDNA produzidas e o sequenciamento das extremidades geraram muitos dados importantes, porém muito das regiões sequenciadas com esta abordagem correspondem à regiões 5' e 3' não codificantes, o que se mostra como um empecilho para a análise de similaridade com outras espécies, já que estas regiões não são conservadas entre diferentes genes ou espécies.

Uma limitação desta técnica é a repetitividade, ou pouca complexidade das bibliotecas geradas. Os genes mais abundantemente expressos no material usado vão ser sempre mais representados na biblioteca e os genes menos expressos estão sempre muito menos representados, sendo estes últimos os mais importantes para a caracterização da diversidade de genes expressos em uma dada amostra. Esta problemática pode ser melhor avaliada analisando-se a TABELA 4.

TABELA 4 - Frequência das diferentes classes gênicas em uma célula eucariótica típica, de acordo com Bishop, 1974.

<i>Classe</i>	<i>Nº de diferentes genes/célula</i>	<i>Nº de cópias de cada gene/célula</i>
Abundante	17	8000
Intermediário	370	440
Raro	33.000	8

Vê-se que a grande maioria dos genes está representada na classe de genes raros, porém o número de cópias destes genes é muito pequeno. Em uma biblioteca de cDNA comum, feita com poliT e ligação de todos os cDNAs produzidos, todos os RNAm raros estariam representados em um título de 10^7 recombinantes, porém a identificação individual destes é muito difícil pois a frequência de aparecimento dos RNAm raros individualmente pode ser tão baixa quanto 2×10^{-6} ou 10^{-7} para tecidos muito complexos como cérebro (Bento Soares, 1994). Por isto quando se quer analisar o perfil do transcriptoma de um organismo é vantajoso que se normalize a representação dos RNAs mensageiros, ajustando a frequência das moléculas menos e mais representadas em um patamar mais igualado (a geração de quantidades equimolares destas moléculas é praticamente impossível atualmente), esta abordagem é denominada normalização.

A normalização pode ser conseguida de maneiras diferentes: 1) através de hibridação saturante com DNA genômico (Weissman, 1987), porém esta abordagem é quase impraticável de se conseguir pois é necessária uma quantidade muito grande de cDNA raros para a reação (Bento Soares, 1994); 2) através da reassociação cinética, onde assume-se que as moléculas mais abundantes se reassociem mais rapidamente que as menos abundantes, e assim as fitas simples não aneladas vão sendo normalizadas durante a reação (Patanjali, S.R., 1991). O desenvolvimento de processos simples de reassociação levou a melhora desta técnica. Bento Soares e colaboradores (1994) usaram uma biblioteca de cDNA em fagomídeo (este pode ser facilmente transformado em plasmídeos fita simples), e a partir da fita simples sintetizaram

controladamente uma pequena fita complementar que foi usada na hibridação tendo uma velocidade de reassociação mais rápida e facilitando a normalização.

Uma abordagem mais recente para construção de mini-bibliotecas de cDNA normalizadas foi descrita por Dias Neto, et al., em 1997. Esta técnica produz um pequeno perfil diverso (aproximadamente 20 sequências) de cDNAs através de amplificação por RT-PCR de baixa estrigência com *primers* aleatórios. O cDNA pode ser produzido com *primers* PoliT ou aleatórios não degenerados. A utilização de baixa temperatura de “*anelamento*” nos primeiros ciclos permite a amplificação de diversos fragmentos em uma mesma reação. Esta técnica foi inicialmente chamada de RAP-PCR. Posteriormente viu-se que o uso desta técnica levava a amplificação preferencial do centro dos genes e a técnica foi redenominada ORESTES (ORF ESTs- *open reading frames of expressed sequence tags*) e submetida à patente (Dias Neto et al., 2000 e U.S. Letters Patent application N°196,716- Ludwig Institute for Cancer Research).

Como a técnica é baseada no uso de PCR são necessários poucos nanogramas de RNAm, ao passo que para a construção de bibliotecas de cDNA apenas com transcrição reversa é necessário o uso de microgramas de RNAm, o que torna esta última técnica difícil de ser aplicada em casos de escassez de material mensageiro, como no caso de parasitas com ciclos de vida complexos (onde o material genético é limitante) e em casos de tumores humanos (Dias Neto et al., 1997).

Uma variante do método ORESTES para a construção de mini-bibliotecas de cDNA é a utilização dos *primers* híbridos consenso degenerados (CODEHOP) em RT-PCR, técnica que foi objeto de estudo desta tese.

4.3.4.1 - Integridade do RNA

A construção das minibibliotecas de ESTs com *primers* híbridos foi iniciada com a extração do RNA mensageiro de vermes adultos de *S. mansoni*. Para isto foi usado um Kit de extração baseado na separação magnética dos RNAm ligando-os a oligonucleotídeos de timina (PoliT) acoplados a uma resina imobilizada em coluna (mRNA isolation Kit- QIAGEN).

Um passo determinante para o sucesso dos RT-PCRs é a obtenção de RNAm integro para confecção dos cDNAs. Para a determinação da integridade dos RNAs mensageiros, foram feitas reações de transcrição reversa com *primers* específicos para 3 genes conhecidos de *S. mansoni* (actina, receptor-x-retinóico e catepsina C). Os pares de *primers* foram desenhados através do programa *Primer 3* (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi>) e abrangem cerca de 500 bases na região 5'codificadora dos genes. Eles foram utilizados em reações de RT-PCR e amplificaram, como esperado, fragmentos de 502, 479 e 479 pares de bases respectivamente para actina, receptor-x-retinóico e catepsina C, sendo que os dois últimos tem um fragmento com o mesmo número de pares de bases, garantindo a integridade do RNAm (**FIGURA 21**). Abaixo temos a lista dos *primers* utilizados:

Actina (número de acesso no GenBank - U19945)

RNAm – 1538 bp comprimento total

Actinfw - *Primer* 5'- início base 133 (CAGTGTTCCCTTCCATCGTTG)

Actinrv - *Primer* 3'- início base 634 (CGTTCCGTCAGGATCTTCAT)

Receptor-x-retinóico (número de acesso no GenBank - AF158102)

RNAm – 4211 bp comprimento total

Retrecpfw –*Primer* 5'- início base 120 (TTAGCCGCTTAATCGATGCT)

Retrecprv –*Primer* 3'- início base 598 (AAGTGGGCCAAGATCATCAG)

Catepsina C (número de acesso no GenBank - Z32531)

RNAm total – 1652 bp comprimento total

Cathepfw –*Primer* 5'- início base 68 (TGCGGTTTACATGTGCTGAT)

Catheprv –*Primer* 3'- início base 546 (ATAAATTTCTCCCGCCAAG)

FIGURA 21 – RT-PCR controle. RT-PCR feito com os *primers* específicos para os genes controle (actina, receptor retinóico e catepsina), em amostra de RNAm e RNAr total, extraídos de vermes adultos. As canaletas controle correspondem à reação de RT-PCR sem utilização da transcriptase reversa, mostrando ausência de amplificação de DNA genômico contaminante (amostras tratadas com RNase).

4.3.4.2 - Influência do *Touch-down* PCR

A partir de amostras de RNAm testadas como mostra a **FIGURA 21**, foram feitas reações de transcrição reversa com diferentes *primers* híbridos, desenhados a partir do alinhamento das apirases.

Para facilitar o passo de clonagem dos produtos amplificados por RT-PCR os 10 nucleotídeos 5' de cada *primer* foram substituídos por uma sequência de 10 nucleotídeos contendo um sítio da enzima de restrição EcoRI.

O *primer* "APYAF1EcoRI" foi utilizado em reação de RT-PCR para estudo da influência do *touch-down*. Ele foi desenhado baseado na região ACR1 das apirases e apresenta uma degeneração de 512. Em vermelho temos a região degenerada e em azul o sítio EcoRI adicionado.

"APYAF1EcoRI"- 5'-CGGAATTCGGTGTTAAATATGGTATTGTGATNGAYKSNGGNTC-3'

Foi feita uma reação de transcrição reversa seguida de PCR sem *touch-down*, com procedimento de PCR descrito para a técnica ORESTES (Dias Neto et al., 1997 e 2000), que resultou em praticamente nenhuma amplificação de cDNA (**FIGURA 22A**). A reação foi repetida usando *touch-down* PCR no passo de "anelamento", o que gerou a amplificação de perfil contendo tamanhos diversos de cDNA, porém com um certo padrão bandeado que significa predominância de alguns fragmentos específicos (**FIGURA 22B**).

Este resultado mostrou que o uso do *touch-down* é importante para melhora de amplificação com os *primers* híbridos, porém a reação deveria ainda ser otimizada, para evitar o bandejamento.

FIGURA 22 - Influência do *touch-down* nas reações de RT-PCR com *primers* híbridos. Amostras contendo 250 ng de RNAm foram submetidas à transcrição reversa com o primer APYAF1EcoRI. Aliquotas de 1/20 (1 μ l) da reação foram submetidas a PCR. Uma fração dos produtos foi analisada em gel de acrilamida 3%, corado com prata. (A) Utilização do programa padrão da técnica ORESTES (Dias Neto et al., 2000), os parâmetros padrão utilizados foram: 95°C por 5 min, 37°C por 2 min, e 72°C por 2 min seguido de 35 ciclos de 95°C por 45 seg, 45°C por 1 min e 72°C por 90 seg. (B) Reação igual a do gel A, porém com os parâmetros de PCR: 95°C por 9 min, 95°C por 1 min, 60°C por 30 seg, e 72°C por 1 min, decrescendo 0,5°C na temperatura de anelamento a cada ciclo, desde 60°C até 45°C, sendo mantida a temperatura em 45°C até um total de 35 ciclos, seguido de 72°C por 5 min.

4.3.4.3 - Influência da Diluição do Tampão e Diminuição da Velocidade de Rampa de “anelamento”

Foi demonstrado que a diminuição do conteúdo de sal na reação de PCR, feita através da diluição do tampão da enzima para menos que 0,8X da condição usual (1X) leva a um acréscimo na eficiência de amplificação de produtos longos em Multiplex-PCR (Henegariu et al., 1997). A fim de melhorar a eficiência de amplificação do RT-PCR com *primers* híbridos e *touch-down* foi testada então a influência da diluição do tampão da Taq Polimerase (Taq Gold- Perkin Elmer) no perfil de amplificação. Um padrão de amplificação com forte arrastamento (“*smear*”) e menor bandejamento tende a representar um perfil mais diverso de sequências, sendo mais adequado para construção de bibliotecas com diversidade. As reações foram feitas com *primer* APYAF1EcoRI, todos os componentes da reação foram mantidos como no experimento anterior e somente os reagentes presentes no tampão da enzima (Tris-HCl 10 mM pH 8,3 e KCl 50 mM) sofreram modificação, sendo o magnésio mantido em 2,5 mM em todos os procedimentos.

Pode ser visto pela **FIGURA 23** que a diluição do tampão de 1X para 0,7X promove uma redução na amplificação de bandas específicas, resultando em um perfil mais arrastado, que corresponde a uma maior complexidade de fragmentos amplificados. O perfil também mostra que moléculas maiores, em torno de 700 bases, foram amplificadas com 0,7X de tampão e que a diluição de 0,4X associada ao *touch-down* não foi eficiente, diminuindo muito o perfil de amplificação.

Recentemente foi descrito na literatura (Ellinghaus et al., 1999) que o uso de temperatura de rampa lenta aumenta a eficiência de amplificação em PCR com *primers* arbitrários. Foi feita então uma combinação da diluição do tampão com a introdução de rampa lenta entre o passo de “*anelamento*” e extensão. A rampa lenta corresponde a uma diminuição na velocidade com que a temperatura de “*anelamento*” aumenta até atingir a temperatura de extensão. Passamos a usar esta velocidade em 15% da velocidade máxima da máquina utilizada (GeneAmp PCR System 9700- PerkinElmer). Pode ser visto na **FIGURA 23 B** que esta combinação de modificações leva a um aumento da complexidade e melhor amplificação do perfil.

FIGURA 23 - Efeito da diluição do tampão no perfil de amplificação dos *primers* híbridos em RT-PCR com *touch-down*. 250 ng de RNAm foram submetidos a transcrição reversa com o *primer* "APYAF1EcoRI". Aliquotas de 1/20 da reação foram submetidas a PCR e uma fração dos produtos foi analisada em gel de acrilamida 6%, corado com prata. (A) Produtos do RT-PCR usando diferentes concentrações de sal (1X, 0,7X e 0,4X referentes a concentração de sal recomendada para TaqGold). Os controles se referem a reações de RT-PCR sem o uso da transcriptase reversa. (B) Produtos do RT-PCR usando diferentes concentrações de sal e rampa lenta entre os passos de anelamento e extensão. A concentração de sal é referida como 1X, 0,7X e 0,4X em relação a recomendada para TaqGold. Os controles se referem a reações de RT-PCR sem o uso da transcriptase reversa.

Como visto na **FIGURA 23** a combinação da diluição do tampão com a diminuição da velocidade de rampa (painel B, canaleta 0,4X) leva a um aumento grande da quantidade de material amplificado e a uma diminuição do bandeamento, o que sugere um aumento na complexidade do perfil. Observa-se como a combinação é mais eficiente comparando-se o painel A com o B. Para a amostra feita em tampão 1X já é possível notar uma melhora do perfil amplificado pela diminuição do bandeamento, porém este efeito é bem mais pronunciado se compararmos as canaletas com tampão 0,4X onde no painel A, praticamente não houve amplificação e já no painel B foi dentre todas as reações a com um perfil mais fortemente corado e com menor bandeamento.

Acreditamos que a diminuição da velocidade de rampa favoreça mais o “*anelamento*” dos *primers* e aumente o tempo de extensão da enzima fazendo com que a reação se torne mais eficiente.

4.3.4.4 - Influência do *touch-down* na Combinação de Diluição do Tampão e Diminuição da Velocidade de Rampa

Foi investigada qual a contribuição do *touch-down* no RT-PCR feito com os *primers* híbridos consenso degenerados em reações feitas nas condições ótimas definidas anteriormente (diluição do tampão da enzima de 0,4X e velocidade de rampa em 15% da máxima).

O *primer* usado foi “HIB8”. Este difere do inicialmente usado para clonar a apirase (APYAF1EcoR1) pela mudança das duas últimas bases de TC para AG.

HIB8- (5'-CGGAATTCCGTGTTAAATATGGTATTGTGATNGAYKSNGGNAG-3').

Foi feita uma reação nas condições ótimas de diluição do tampão e rampa lenta, associada com o *touch-down* descrito anteriormente (**FIGURA 24 canaleta A**) e outra reação utilizando o protocolo do método padrão de PCR em baixa estrigência descrito para a técnica ORESTES

(Dias Neto et al., 1997 e 2000) onde não se usa o *Touch-down* no programa de PCR (**FIGURA 24 canaleta B**).

Podemos ver pela **FIGURA 24**, que o uso do *touch-down* leva a uma amplificação muito mais significativa, com produtos maiores que 1 Kb (canaleta A) enquanto que utilizando-se o outro programa a amplificação foi menos eficiente, tendo produtos menores, variando de 150 a 450 bases tendo ainda um perfil bandeado em torno de 500 bases, fato este não desejado para a construção das mini-bibliotecas, pois pode levar a uma maior redundância (canaleta B).

FIGURA 24- Efeito do *touch-down* na combinação de diluição do tampão e diminuição da velocidade de rampa. Uma amostra contendo 250 ng de RNAm foi submetido a transcrição reversa com o *primer* “Hib 8”. Aliquotas de 1/20 da reação foram submetidas a PCR com o mesmo *primer*, nas condições padrão (0,4X tampão da enzima e rampa de 15% da velocidade máxima entre os passos de “*anelamento*” e extensão). Uma fração dos produtos foi analisada em gel de acrilamida 6%, corado com prata. Em (A) reação feita com *touch-down* (95°C por 9 min, 95°C por 1 min, 60°C por 30 seg, e 72°C por 1 min, decrescendo 0,5°C na temperatura de “*anelamento*” até 45°C, sendo mantida a temperatura de 45°C até um total de 35 ciclos, seguido de 72°C por 5 min). Em (B) reação feita sem *touch-down*, 95°C por 5 min, 37°C por 2 min, e 72°C por 2 min seguido de 35 ciclos de 95°C por 45 seg, 45°C por 1 min e 72°C por 90 seg.

4.3.4.5 - Caracterização dos Produtos Amplificados (Mini-bibliotecas)

A caracterização dos produtos amplificados foi feita através da clonagem e sequenciamento dos melhores perfis obtidos. Inicialmente, foram analisados os produtos das reações “canaleta 0,4X da FIGURA 23 (b)” e “canaleta A da FIGURA 24”. As mini-bibliotecas feitas a partir destas reações foram denominadas **F24I** e **HIB8**, respectivamente.

As reações foram aplicadas em gel de agarose 1,2% e a região a ser clonada foi excisada (seleção de tamanho). Os cDNAs foram extraídos do gel e clonados no sítio EcoRI do vetor plasmidial Bluescript. Esta ligação foi utilizada para transformar a cepa de bactéria *E. coli* XL1-BLUE MRF'. Os clones positivos foram selecionados e estocados em forma de duas bibliotecas distintas. Os insertos dos clones foram sequenciados e os dados obtidos foram comparados com o banco de dados público (GenBank), através do algoritmo “BLAST” que procura por similaridade de sequência de DNA (BLASTN) ou proteína (BLASTX). As sequências obtidas foram agrupadas de acordo com as classes:

1) Sequências novas de *S. mansoni*

- Totalmente novas (sequências que não apresentaram similaridade com nenhuma sequência conhecida).
- Homólogas a ESTs de *S. japonicum*
- Homólogas a sequências de outros organismos

2) Sequências parcial ou totalmente conhecidas

- Homólogas a uma região de EST de *S. mansoni*
- Homólogas a sequências totalmente conhecidas de *S. mansoni*

De acordo com esta classificação foram feitas tabelas resumindo o conteúdo sequenciado das bibliotecas F24I e HIB8. A análise de redundância significa a percentagem de sequências únicas, representadas apenas uma vez na biblioteca. As **TABELAS 5 e 6** resumem os dados obtidos.

TABELA 5 - Biblioteca F24I

401 sequências = 54,6 % não-redundante

290 sequências válidas (sem contaminante de RNAr) = 71,3 % não-redundante

Sequências parcial ou totalmente conhecidas (70.4 %)

Homólogas a ESTs de <i>S. mansoni</i>	32,9 %
Homólogas a sequências totalmente conhecidas de <i>S. mansoni</i>	38,5 % (24,9 % rRNA)

Sequências novas de *S. mansoni* (28.6 %)

Homólogas a EST de <i>S. japonicum</i>	1,7 %
Totalmente novas	15,7 %
Homólogas a sequências de outros organismos	10,9 % (1,7 % by BLASTN, 9,2 % by BLASTX)

TABELA 6 – Biblioteca HIB8

306 sequências = 53,9 % não-redundante

209 sequências válidas (sem o RNAr) = 76,5 % não-redundante

Sequências parcial ou totalmente conhecidas (70.7 %)

Homólogas a ESTs de <i>S. mansoni</i>	30,8 %
Homólogas a sequências totalmente conhecidas de <i>S. mansoni</i>	39,9 % (31,7 % rRNA)

Sequências novas de *S. mansoni* (29.1 %)

Totalmente novas	23,9 %
Homólogas a sequências de outros organismos	5,2 % (BLASTX)

Analisando os dados das tabelas anteriores observa-se que cerca 29% das sequências analisadas correspondem a sequências novas de *S. mansoni*. A biblioteca F24I apresentou uma não redundância de 55% depois de 401 sequências, sendo que a maioria dos genes redundantes (86 das 401 sequências) correspondem ao RNA ribossomal da subunidade 28S, que além de ser contaminante da reação de RT-PCR mostrou complementariedade considerável com a região 3'do *primer* degenerado utilizado. Isto demonstra que este fragmento não foi amplificado ao acaso. Já a biblioteca HIB8, que foi obtida com *primer* diferente da F24I nas duas últimas bases, apresentou um resultado similar de redundância, porém outro RNA ribossomal foi o principal fragmento presente na biblioteca. Este problema foi amenizado pela utilização de preparações de RNA mensageiro isolado com separação por Oligo dT acoplado a moléculas magnéticas, diminuindo a porcentagem de RNAr amplificado para aproximadamente 10% (dados não mostrados).

Foi feita a análise de redundância de cada biblioteca durante o processo de obtenção das sequências, gerando um gráfico de redundância cumulativa. Este dado, visto na **FIGURA 25**, mostra a porcentagem de não-redundância das sequências tomada a cada 25 sequências válidas (excluindo-se RNAr). Os dados mostram que com cerca de 300 sequências o nível de não-redundância está em torno de 75%. Estes dados são muito importantes porque mostram que com o uso de um *primer* degenerado gera-se cerca de 8-10 vezes mais sequências diferentes que os processos tradicionais utilizados na técnica ORESTES.

As modificações estudadas aqui (*touch-down* PCR, rampa lenta e *primers* híbridos) podem facilitar enormemente os projetos de sequenciamento de transcriptomas em larga escala, pois reduzem em até 20 vezes o número de mini-bibliotecas a serem construídas, facilitando este passo limitante.

FIGURA 25 - Análise de não redundância acumulativa das mini-bibliotecas F24I e HIB8. Esta análise acumulativa foi obtida a cada novo conjunto de 25 sequências ao longo do processo de coleta dos dados.

Seria importante fazer uma análise da normalização destas bibliotecas. Este tipo de análise costuma ser feita através da comparação da localização das sequências obtidas em relação aos conjuntos de ESTs depositadas no GenBank (UniGene). O número de sequências repetidas nestes conjuntos pode ser relacionado ao número de vezes em que este gene foi clonado e sequenciado por outros grupos o que espera-se que seja proporcional a abundância relativa da mensagem.

Para analisar se a técnica de construção de mini-bibliotecas de cDNA com RT-PCR em baixa estrigência e *primers* híbridos leva a dados normalizados, foi sequenciada uma biblioteca feita com o *primer* híbrido usando-se RNAm de tumor humano de mama (material produzido pelo Projeto Genoma do Câncer Humano da FAPESP/ILCR, gentilmente cedido pelo Dr. A. Simpson do Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer). Foram analisados 138 clones dos quais 25 apresentaram similaridade no UniGene. A **FIGURA 25** mostra o tamanho dos grupos *Unigene* nos quais foram adicionadas as 25 sequências feitas com os *primers* híbridos e *touch-down* PCR.

Quanto maior o número de representantes no grupo, mais abundante deve ser a mensagem que originou os respectivos clones.

A **FIGURA26** mostra que a maioria das sequências aqui obtidas e analisadas (80%) pertenciam aos agrupamentos (*clusters*) com poucos representantes presentes no *UniGene* (com até 64 ou 128 respectivamente). Esta figura indica que as modificações feitas no protocolo tradicional do ORESTES, ou seja, a introdução do *Touch-down* e uso de *primers* s híbridos consensu-degenerados mantém a normalização dos dados, sendo muito similar senão idêntico aos resultados obtidos com a técnica ORESTES gerada com o método padrão da técnica de RT-PCR de baixa estringência (Dias Neto et al., 2000). As mensagens raras continuam então sendo geradas apesar das modificações introduzidas no RT-PCR de baixa estringência.

FIGURA 26 – Análise de normalização no UniGene. Uma minibiblioteca foi feita com RNAm de tumor de mama humano utilizando-se a técnica de RT-PCR de baixa estringência com *primers* híbridos e *touch-down* PCR. Os 25 clones mostraram similaridade com sequências presentes nos grupos do UniGene e foram analisadas de acordo com o tamanho do grupo (número de representantes).

Foi feita uma análise detalhada das sequências obtidas para as bibliotecas de *S. mansoni*, para caracterização da contribuição relativa das bases degeneradas e não degeneradas da região 3' do *primer* em relação à seleção das sequências alvo. Para esta análise foram separados os

clones de nossas bibliotecas que apresentaram alta similaridade com ESTs de *S. mansoni* depositadas no GenBank. As sequências do GenBank foram consideradas como “verdadeiras” e as bases encontradas no clone amplificado na região do *primer* (nas duas extremidades dos *primers* híbridos) foram comparadas com a sequência dita verdadeira. Se a base encontrada na sequência “verdadeira” foi igual a base encontrada naquela posição do nosso clone o “*anelamento*” foi considerado “perfeito” entre o *primer* selecionado e o mRNA ou cDNA alvo. O gráfico da **FIGURA 27** mostra a percentagem de coincidência entre a base que foi sequenciada em nossos clones e a base considerada “verdadeira” (presente no GenBank).

FIGURA 27 – Análise da contribuição relativa das bases do *primer* na seleção das sequências alvo. Este gráfico mostra a percentagem de coincidência entre a base “verdadeira” e a sequência selecionada na amplificação dos clones das bibliotecas F24I (f24i) e HIB8 (h8-1). As linhas azuis indicam a percentagem de coincidência esperada (25%) se uma base não degenerada do *primer* pareasse com qualquer uma das 4 bases possíveis, aleatoriamente em qualquer mRNA ou cDNA. As posições com barras horizontais azuis em 50% correspondem a bases parcialmente degeneradas. As posições 3, 6 e 12 não possuem barras de dados pois são totalmente degeneradas.

Podemos ver, pela análise da **FIGURA 27**, que as posições 1, 2 e 4 (começando da região 3' do *primer*) apresentaram uma coincidência de 80-100% entre a base verdadeira e a selecionada, o que indica que estas bases tendem a anelar corretamente com o alvo de amplificação sendo então importantes na seleção dos clones. A posição 3 é totalmente degenerada e parece não afetar as bases não degeneradas vizinhas (2 e 4), pois estas ainda mantêm “*anelamento*” preferencialmente correto.

Chegando na posição 5, em relação à extremidade 3' do *primer*, a seleção começa a diminuir passando para aproximadamente 60% de “*anelamento*” correto o que demonstra um efeito menos seletivo nesta posição e que tende a continuar diminuindo quanto mais se caminha para a região 5'. Porém a posição 6, que é novamente totalmente degenerada, não parece influenciar a continuidade da seleção no patamar de 60% na vizinhança da posição 5. Isto indica que a introdução das bases degeneradas nas posições 3 e 6 parece criar um bom balanço entre o grupo de diferentes *primers* degenerados que, mantém um direcionamento preferencial de “*anelamento*” entre esses e os alvos, levando a um número limitado de sequências geradas (amplificação não randômica), ao mesmo tempo permitindo a produção de um perfil diversificado de amplificação gerando bibliotecas de baixa redundância e alta complexidade.

Para verificar se nossas modificações da estratégia ORESTES mantinham o fator de amplificação preferencial da porção central dos genes, foi feita uma análise, de um total parcial de 2021 clones, através de *BLAST* contra os genes de *S. mansoni* totalmente conhecidos depositados no banco público GenBank. Devido ao fato de este banco conter aproximadamente apenas 13.000 sequências de *S. mansoni* e destas somente 340 corresponderem a genes completamente sequenciados, somente 57 das nossas sequências puderam ser analisadas.

Através da análise da posição relativa dos 57 clones em relação aos genes totalmente conhecidos relacionados, observamos que nossa estratégia de construção de minibibliotecas de cDNA mantém a amplificação preferencial do centro dos genes, o que pode ser visto pela **FIGURA 28**.

FIGURA 28- Avaliação da distribuição posicional dos clones gerados pelas mini-bibliotecas de cDNA feitas com RT-PCR de baixa estringência, *primers* híbridos e *touch-down*. O ponto zero corresponde a região 5' dos genes e o ponto 100 à 3' dos genes analisados. A comparação foi feita através de BLASTN.

Neste trabalho, foram geradas até o momento 2.771 ESTs. A TABELA 7A resume os dados obtidos e mostra que cerca de 25% das sequências são totalmente novas, não possuindo qualquer similaridade com sequências conhecidas. Aproximadamente 9% são similares a sequências de outros organismos (proteínas, ESTs ou DNA), sendo novas em *S. mansoni*.

Finalmente utilizando a ferramenta de pesquisa do BLASTX tentamos correlacionar funções possíveis a nossos clones que apresentaram similaridade com proteínas conhecidas. A TABELA 7B mostra alguns dos clones que selecionamos como prováveis proteínas de *S. mansoni* através de similaridade de sequência (com Valor de *E* esperado menor que 10^{-10}).

TABELA 7A – Análise de similaridade das ESTs geradas pela técnica de produção de bibliotecas de cDNA com primers híbridos e PCR de baixa estringência. As sequências produzidas por todas as bibliotecas foram analisadas conjuntamente através de BlastN e BlastX e separadas nas classes descritas na primeira coluna.

<i>Classificação das sequências</i>	<i>Número absoluto</i>	<i>Porcentagem do total</i>
ESTs de <i>S. mansoni</i>	1003	36,2
Gene de <i>S. mansoni</i>	396	14,3
Proteínas de outros organismos	189	6,8
Sequências novas (sem similaridade no GenBank)	643	23,2
RNAr	463	16,7
DNA de <i>S. mansoni</i>	33	1,2
Genes de outros organismos	24	0,9
ESTs de <i>S. japonicum</i>	15	0,5
Contaminantes (camundongo)	5	0,2
total	2771	100

TABELA 7B – Genes homólogos a ESTs geradas nas mini-bibliotecas.

<i>Genes conhecidos com similaridade com ESTs das mini-bibliotecas geradas com primers híbridos consenso degenerados e RT-PCR de baixa estringência</i>	<i>Valor E</i>
pre-mRNA cleavage factor 1m (25kD) [<i>Homo sapiens</i>]	6e-34
gamma-tubulin [<i>Homo sapiens</i>]	2e-43
multiple myeloma oncogene 1 [<i>Homo sapiens</i>]	3e-22
thimet oligopeptidase [<i>Sus scrofa</i>]	2e-35
RNA polymerase III second-largest subunit [<i>Drosophila melanogaster</i>]	8e-50
histone deacetylase dHDAC3 [<i>Drosophila melanogaster</i>]	1e-38
myotubularin related protein 1 [<i>Mus musculus</i>]	3e-20
ubiquitin-conjugating enzyme HR6A [<i>Mus musculus</i>]	1e-33
60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P0[<i>Caenorhabditis elegans</i>]	1e-44
clathrin heavy chain [<i>Rattus norvegicus</i>]	2e-19
diaphanous 1 [<i>Homo sapiens</i>]	1e-16
myotubularin related protein 1 [<i>Mus musculus</i>]	3e-20
INOSINE-5'-MONOPHOSPHATE DEHYDROGENASE 2[<i>Mus musculus</i>]	1e-16
phosphoethanolamine cytidyltransferase [<i>Homo sapiens</i>]	7e-24
carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1 [<i>Homo sapiens</i>]	2e-28

O procedimento de construção de minibibliotecas de cDNA, descrito nesta tese, se assemelha muito à técnica ORESTES (U.S. Letters Patent application N°196,716- Ludwig Institute for Cancer Research) que foi inicialmente descrita por Dias Neto et al., em 1997, que mostra a amplificação de cerca de 20 diferentes sequências de cDNA de *S. mansoni* por mini-biblioteca através de RT-PCR com *primers* não degenerados e em condições iniciais de baixa temperatura de “anelamento”. Mais tarde os pesquisadores observaram que esta abordagem amplificava preferencialmente a porção central dos cDNA, o que facilita muito a identificação, já que em sua maioria os genes homólogos de diferentes organismos se assemelham na porção central codificante. A grande diferença entre o ORESTES e a nossa nova técnica é a utilização de *primers* híbridos (consensu-degenerados) e o uso de *touch-down* PCR.

O *touch-down* PCR testado em nosso laboratório foi incluído como rotina nos procedimentos da técnica ORESTES (Dias Neto et al., 2000), melhorando o perfil de amplificação e o número de sequências obtidas, passando de 20 para uma média de 40 sequências diferentes por biblioteca. Estes resultados deram suporte a um pedido de adendo à patente original da técnica ORESTES (Fietto et al., Construction of ORESTES cDNA Libraries using *Touch-down* PCR, Addendum to Patent application #196,716 filed on november, 2000), cujos dados estão anexados ao final da tese.

Os dados apresentados aqui indicam que foi possível a introdução de modificações na técnica padrão ORESTES que levaram a uma melhora significativa de eficiência na geração de dados, em relação ao número de sequências diferentes obtidas em cada biblioteca. Nesta tese foram apresentadas somente as análises detalhadas de duas mini-bibliotecas produzidas, porém várias outras foram feitas e estão sendo analisadas em colaboração com o doutorando Ricardo de Marco.

Até o momento foram produzidas cerca de 3000 ESTs de *S. mansoni* através da técnica de construção de minibibliotecas de cDNA com *primers* híbridos. Se formos comparar este dado ao número de ESTs deste organismo presente no banco de dados (13.000 ESTs) podemos ver que a deposição de nossas sequências no GenBank corresponde a um aumento de 23% no número de sequências depositadas. Estes dados fazem parte de um manuscrito que está sendo

escrito e será submetido à publicação (Fietto, J.L.R., DeMarco, R and Verjovski-Almeida, S. cDNA Libraries constructed with Arbitrary Consensus-degenerate hybrid Oligonucleotide *Primers* an Low-Stringency RT-PCR). Este manuscrito também está anexado ao final da tese.

4.3.5 - Clonagem de um Gene Codificando uma Apirase em Tegumento de *S. mansoni*

Similar à CD39 de Camundongo

4.3.5.1 – RT-PCR com *primers* sem “grampo” (clamp) em RNAm de Tegumento de vermes adultos

Apesar das cerca de 3000 novas ESTs terem em parte sido geradas a partir de RT-PCR com *primers* híbridos desenhados para as regiões homólogas da família das apirases, não encontramos similaridade com nenhuma apirase conhecida entre as ESTs geradas.

Estudando mudanças nos *primers* híbridos, verificamos que aqueles com 35 bases não são eficientes para amplificar genes específicos, e que a reação se torna mais específica se diminuirmos o tamanho para 25 bases (praticamente abolindo a região do grampo, já que destas 25 bases, 14 correspondem ao “core” degenerado da porção 3’ e 8 correspondem a um sítio de restrição colocado na extremidade 5’ para facilitar o passo de clonagem).

Isto pode ser visto pela análise de uma biblioteca de cDNA feita com um *primer* sem a região do “clamp” (hib19) que mostrou baixa não-redundância quando comparada com outra biblioteca feita com o *primer* maior (hib11), (FIGURA 29).

Como pode ser visto abaixo, os *primers* utilizados diferem somente pela ausência do “grampo” (em azul) :

hib19

5'-CGGAATTCCGGATNGAYKSNGWNTC- 3' (25 bases)

hib11

5'-CGGAATTCCGTGTTAAATATGGTATTGTGATNGAYKSNGWNTC- 3' (43 bases)

FIGURA 29 - Análise da não-redundância de bibliotecas feitas com *primer* híbrido longo ou curto. A biblioteca H11-2 foi feita com *primer* híbrido h11 padrão (43 bases) e a H19-1 foi feita com híbrido h19 curto (25 bases), onde foi retirada a região do “grampo”. A análise de não redundância foi feita em relação ao número cumulativo de sequências de cada biblioteca.

Esta análise mostra que um *primer* mais longo favorece a amplificação de produtos diversos, dado interessante no caso da construção de minibibliotecas de ESTs descrita anteriormente. Porém para o uso na tentativa de clonagem do gene da apirase seria mais interessante usarmos o menor, que amplifica mais especificamente. Por isto voltamos à tentativa de clonagem do gene da apirase de *S. mansoni* através de RT-PCR com os *primers* desenhados para as regiões conservadas das apirases usando primers com 25 bases.

Foi feita uma importante nova modificação na estratégia de clonagem. Passamos a utilizar como template RNA mensageiro extraído do **tegumento isolado de vermes adultos**, algo nunca descrito na literatura. Até então utilizávamos sempre RNAm de vermes adultos inteiros.

Resolvemos fazer esta modificação depois de constatarmos experimentalmente que amostras protéicas de vermes adultos sem tegumento não possuem atividade apirásica (dados não mostrados) e que existem células chamadas sub-tegmentares que estão aparentemente

associadas ao tegumento e que devem ser responsáveis pela síntese dos RNAs mensageiros expressos no tegumento, já que este está isolado do corpo do parasita por uma membrana interna.

Foram feitas reações de RT-PCR utilizando o RNAm do tegumento e os *primers* de 25 bases desenhados para as regiões ACR1(APYAF1⁻) e ACR4 (APYR3⁻), em condições de “*anelamento*” estridentes (65-60°C *touch-down*). Para amplificação mais específica e em maior quantidade, procedemos ao NESTED-PCR, a partir das reações de RT-PCR, com *primer* interno (região conservada ACR2 – APYCF1⁻ E 2⁻). De acordo com o esquema abaixo:

Obtivemos um padrão de cDNA com um leve bandeamento em torno de 600 pares de bases e um arrastamento no fundo da reação, (**FIGURA 30**).

Toda a reação foi corrida em gel de acrilamida 1,2% e a região da banda de 600 pb foi isolada e clonada em plasmídeo pGEM-T.

Como os fragmentos amplificados tinham tamanhos diversos, foi parcialmente sequenciada uma placa com 96 clones. A análise através de *BLASTX* revelou similaridade entre um dos clones (44C) e várias apirases de organismos diferentes, sendo a maior similaridade com CD39 de camundongo, (**FIGURA 31**).

Apesar de termos feito a ligação com os fragmentos de aproximadamente 600 pb, constatamos que o clone sequenciado não estava completo, pois apenas um dos *primers* usados no RT-PCR foi encontrado em uma das extremidade do clone. Além disto o clone 44C estava ligado a outros clones distintos formando um concatâmero. Por isto o fragmento correspondente a apirase possui apenas 130 bases. Este dado demonstra que houve uma modificação no cDNA usado durante o processo de ligação que levou a perda de parte do clone. Acreditamos que isto seja devido a um tempo excessivo de ligação.

FIGURA 30 – NESTED RT-PCR em RNAm de tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* com primers para apirase sem a região do grampo. Gel de agarose 1,2% contendo 1/5 do produtos das reações de RT-PCR com o primer APYAF1⁻ e APYR3⁻, seguidas de reação de nested-PCR com os primers internos APYCF1⁻ e APYCF2⁻, respectivamente descritas nas canaletas indicadas.

Resultado do BLASTX para o clone 44C	Valor E
ref NM_009848.1 <i>Mus musculus</i> CD39 antigen (Cd39)	1e-019
gb AF041814.1 HOMOLAA3 <i>Mus musculus</i> lymphoid activation antigen	1e-019
gb AF037366.1 AF037366 <i>Mus musculus</i> ecto-apyrase CD39 mRNA	1e-019
gb BE374834.1 BE374834 601226653F1 NCI_CGAP_Mam1 <i>Mus musculus</i>	1e-019
gb AW258617.1 AW258617 uq37e04.y1 NCI_CGAP_Mam5 <i>Mus musculus</i>	1e-019
gb U81295.1 RNU81295 <i>Rattus norvegicus</i> ecto-apyrase mRNA	3e-011
gb BE127693.1 BE127693 DEPA1442 Rat	3e-011
emb AJ133746.1 SSC133746 <i>Sus scrofa</i> mRNA for ATP-diphosphohydrolase	2e-006
emb AJ133133.1 HSA133133 <i>Homo sapiens</i> mRNA	7e-006
gb AA361565.1 AA361565 EST70884 T-cell lymphoma <i>Homo sapiens</i>	7e-006

>ref|NM_009848.1|| *Mus musculus* CD39 antigen (Cd39), mRNA
Length = 2312

Score = 101 bits (51), Expect = 1e-019
Identities = 66/71 (92%)
Strand = Plus / Minus

Query: 35 aactgttgcaccaccccggtgtcattctccttcttggctggccacttgtagatgtacaag 94
||||| ||||||||| ||||||||| ||| ||||||||| ||
Sbjct: 308 aactgctgcaccacccctgtgtcattctccttctcggccggccacttgtagatgtacagg 249

Query: 95 ttggtgtgaga 105
|||||||
Sbjct: 248 ttggtgtgaga

FIGURA 31 - Análise por BLASTX E BLASTN do clone 44C. A tabela mostra o resultado da pesquisa por BLASTX onde o Valor E significa a probabilidade da similaridade ser casual. O alinhamento mostra o resultado do primeiro alinhamento de sequência de DNA com CD39 de camundongo.

Analisando a região da família da apirases onde o Clone 44C apresenta similaridade (FIGURA 32) podemos notar que esta compreende uma região amino da proteína traduzida, sendo que o *primer* usado no RT-PCR apesar de ter sido desenhado para amplificar pela região ACR2 anelou na região ACR1. Este resultado nos mostrou que os *primers* desenhados para as

regiões ACR1 e ACR2 são bastante complementares na região 3', sendo esta a mais importante para a seleção das sequências alvo.

```

1 medikdskvk rfcsknliii lgftsilavi aliavgltn kplpenvkyg ivldagssht
61 nlyiykwpae kndtgvvqq leecqvkpgp iskyaqkte igaylaecme lsteliptsk
121 hhqtpvylga tagmrllrme seqsadevla avstslksyp fdfqgakiit gqegaygwi
181 tinyllgrft qeqswslis dsqkqetfga ldlggastqi tfvpqnstie spenslqfrl
241 ygedytvyth sflcygkdqa lwqklakdiq vssggvlkdp cfnpgyekvv nvselygtpc
301 tkrfekklpf dqfriqgtgd yeqchqsile lfnshcpys qcafngvflp plhgsfgafs
361 afyfvmddf k vaknsvisq ekmtetknf csksweetkt sypsvkeky l seycfsgayi
421 lsllqgynft dssweqihfm gkikdsnagw tlgymnltn mipaeqplsp plphstyigl
481 mvlfslllva vai tglfiys kpsyfwkeav

```

FIGURA 32 – Análise do posicionamento dos *primers* utilizados na amplificação do clone 44C. A sequência de aminoácidos representa a proteína mais homóloga ao clone 44C, encontrada no banco de dados através de BLASTX, CD39 de *Mus musculus* (NM_009848.1). A região em itálico (azul) representa sequência homóloga ao clone 44C. As setas mostram as regiões dos *primers* usados, correspondentes as regiões conservadas das apirases ACR1 (vermelho), ACR2 (amarelo) e ACR4 (verde).

4.3.5.2 - Clonagem do Gene Homólogo a CD39 de camundongo através de RACE-PCR

O clone 44C foi usado como base para o desenho de 2 *primers* usados em PCR do tipo RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), normalmente usado para clonagem do cDNA total de genes parcialmente conhecidos.

Utilizamos o Kit SMART II (Clontech). Nesta abordagem as reações de PCR são feitas com *primers* internos (desenhados de acordo com uma sequência de 25-30 bases conhecidas no gene de interesse) e os do fabricante acoplados às extremidades do cDNA produzido. Faz-se uma reação para a região 3' e outra para a região 5' do gene. Conhecendo-se todo o clone consegue-se

amplificar o cDNA inteiro com *primers* desenhados para as extremidades do gene identificadas através dos clones RACE. A tecnologia SMART (Switching Mechanism At 5'end of RNA Transcript) auxilia na amplificação da região 5'.

Para a reação 3' o *primer* da extremidade do gene é adicionado por estar acoplado ao oligo dT que se liga a cauda poliA do RNAm para início da transcrição reversa. Para a reação 5' o *primer* da extremidade do gene é adicionado através do pareamento entre 3-5 resíduos de nucleotídeo de citosina adicionados à extremidade 3' do cDNA produzido na transcrição reversa e 3 nucleotídeos de guanina despareados, presentes na ponta 5' da sequência a ser adicionada na extremidade 5' (como mostra o esquema da **FIGURA 33**).

FIGURA 33 - Esquema geral da tecnologia SMART –RACE- PCR. UPM indica o primer Universal contido nas sequências adicionadas nas extremidades das moléculas de cDNA. UPM-nested é um *primer* um pouco interno ao UPM que pode ser utilizado em reações de NESTED-PCR. GS3' e GS5' são os *primers* gene específicos desenhados a partir de uma região conhecida do gene de interesse e utilizados nas reações de amplificação das extremidades 3' e 5' do gene.

Os *primers* gene específicos desenhados para clonagem do restante do gene homólogo a CD39 foram denominados 3'TEG e 5'TEG. Foram feitas as reações de transcrição reversa com primer PoliT e as fitas simples de cDNA foram usadas como template para as reações de RACE-PCR 3'(*primers* 3'TEG e UPM) e 5'(*primers* 5'TEG e UPM), separadamente.

Foram feitas reações com cada *primer* isoladamente, como controle da especificidade dos fragmentos amplificados. Como visto na **FIGURA 34 painel A**, houve amplificação inespecífica pois algumas reações feitas com os *primers* isoladamente amplificaram bandas iguais a algumas presentes em reações com os pares corretos. Para determinarmos a banda específica, foi feita reação de nested-PCR utilizando como alvo os produtos anteriores diluídos 1:50 e o *primer* UPM-nested com o par gene-específico.

Como pode ser constatado pela **FIGURA 34 painel B**, somente a reação do RACE 3'funcionou, revelando a presença de uma banda com aproximadamente 800 pares de bases. Esta banda foi isolada e recuperada com o Kit Nucleotrap (Clontech), sendo subclonada em plasmídeo pGEM- T de acordo com o manual do fabricante, fazendo a ligação por 1 hora a fim de evitarmos a formação de concatâmeros.

A ligação foi utilizada para transformar cepas de *E. coli* XL1-blue e alguns clones contendo fragmento do tamanho esperado foram submetidos a sequenciamento. A clone final foi denominado 44C.

FIGURA 34 - Gel de agarose 1,2% contendo amostras das reações de RACE-PCR do clone 44C. A partir do clone 44C foram desenhados *primers* para amplificação do gene inteiro por RACE-PCR. Foram feitas as reações 5' e 3' separadamente sendo que o sinal (+) indica reação feita com o par de *primers* correto e o sinal (-) indica as reações feitas com apenas um dos *primers* na ordem *primer* gene específico e UPM (*primer* universal). Para as reações 5' o par de *primers* correto foi 5'TEG e UPM (painel A) ou 5'TEG e UPM-nested (painel B). Para as reações 3' o par de *primers* correto foi 3'TEG e UPM (painel A) ou 3'TEG e UPM-nested (painel B).

O resultado do sequenciamento do clone 44C demonstrou que o *primer* poliT usado na transcrição reversa anelou em local interno ao gene de interesse, provavelmente devido a alguma região rica em nucleotídeo de adenina. A presença de duas bases degeneradas na porção 5' do *primer* poliT reforça a ligação à extremidade da região poliadenilada, porém neste caso parece ter favorecido o “*anelamento*” em uma região interna do RNAm.

O fragmento resultante deste “*anelamento*”, sendo menor que o fragmento que seria gerado se o *primer* poliT tivesse anelado ao início da região do poliA, passaria a ser favorecido na amplificação por PCR. Acreditamos que esta seja a explicação mais confiável para isolamento de um fragmento não correspondente a toda a região 3' do gene.

Para a clonagem dessa região foi desenhado um novo *primer* com base na sequência do clone CD-39TEG, referente a uma porção mais a 3' do gene sequenciado. Assim o fragmento a ser amplificado se o *primer* poliT anelasse na região correta seria um pouco menor facilitando a amplificação. Este *primer* foi denominado 3'TEG3 e foi utilizado em reação de RACE-PCR como descrito anteriormente.

Analisando uma fração da reação após NESTED-PCR com o *primer* interno do kit (UPM-nested) podemos observar que foram preferencialmente amplificadas duas bandas de cDNA, com aproximadamente 2,1 e 3,6 Kb respectivamente (**FIGURA 35, canaleta 2**).

Para clonagem da região 5' procedemos à transcrição reversa dos RNAm com o *primer* gene específico usado em PCR anterior (5'TEG), pois especulamos que a reação 5' não funcionou devido a uma dificuldade de pareamento do *primer* do Kit contendo GGG na extremidade do cDNA produzido. Como a adição dos CCCs na extremidade do cDNA só é efetiva quando o cDNA atinge a extremidade do RNAm, acreditamos que a transcriptase reversa talvez não esteja sendo eficiente em transcrever todo o cDNA. Com a utilização do *primer* mais perto da região 5' do gene na reação de transcrição reversa esperávamos que a transcrição atingisse efetivamente o final do RNAm favorecendo a introdução dos nucleotídeos de citosina na ponta do cDNA. Porém esta abordagem também não funcionou e outras abordagens devem ser analisadas, como *southern blot* genômico para isolamento de um clone genômico que contenha a região 5' do gene.

FIGURA 35 – RACE-Nested-PCR do clone 44C, homólogo à CD39 de camundongo. Gel de agarose 1,2% contendo uma fração das reações de RACE-PCR 5'(canaleta 1) e 3'(canaleta 2). Para a reação 5'a transcrição reversa foi feita com o primer gene específico 5'TEG, que foi usado também na reação de PCR subsequente com o primer UPM e na reação de nested-PCR com o primer UPM-nested. A reação 3'foi feita com o primer 3'TEG2, desenhado mais para a região 3' do clone CD39-TEG, associado ao UPM na reação de PCR e ao UPM-nested na reação seguinte.

As bandas amplificadas para a reação 3' foram recuperadas e ligadas em plasmídeo pGEM-T. As ligações foram utilizadas para transformar a cepa de *E. coli* XL1-blue. Vários clones foram selecionados e estocados em meio de cultura (TB- ampicilina). A análise dos insertos foi feita através de PCR de colônia com os *primers* flanqueadores da região de clonagem (SP6 e T7). Um fragmento de aproximadamente 2,1 Kb, denominado 44D foi parcialmente sequenciado revelando que aparentemente toda a região 3' do gene foi clonada, visto que apenas cerca de 700pb deste clone correspondem à região 3' codificante, sendo o restante região não codificante.

As sequências de DNA obtidas para os clones 44C (de 0,8kb) e 44D (de 2,1kb) foram traduzidas para sequência de aminoácidos pelo programa GCG. Essas foram então alinhadas com a sequência da proteína mais homóloga, CD39 de camundongo, obtida através de análise por BlastX. Como visto na **FIGURA 36**, quase todo o gene predito está contido nos clones 44C e 44D, faltando apenas a obtenção da região 5' do gene correspondente aos primeiros 57 aminoácidos.

FIGURA 36 – Alinhamento das sequências de aminoácidos preditas para o clone CD39-TEG com a proteína CD39 de camundongo. O alinhamento foi feito pelo programa PILEUP do GCG, com os parâmetros padrão. CD39_MOUSE corresponde a proteína de camundongo, P55772; CD39-TEG-A e CD39-TEG-C correspondem a tradução da sequência do clone 44C (de 0,8 kb), feita respectivamente com os primers SP6 e T7. CD39-TEG-B corresponde a tradução da sequência do clone 44D (de 2,1 kb), feita com o primer T7. As regiões em *itálico* indicam regiões traduzidas a partir de sequência obtida com qualidade, analisada pelo programa Phread, igual ou inferior a 15, enquanto o restante da sequência apresentou qualidade igual ou superior a 20 (1 erro a cada 100 bases). O símbolo (*) significa o códon de parada da sequência codificante e o símbolo (/) corresponde a uma região com erro de sequenciamento onde houve mudança de *frame* do clone CD39-TEG-B. Em **negrito e grifado** temos uma região rica em lisinas (K) referente ao início da sequência CD39-TEG-B e final da sequência CD-39-TEG-A

ser mantidos em cultura "*in vitro*", é usual a utilização de hamsters (*Mesocricetus auratus*) como hospedeiro definitivo para a manutenção do ciclo biológico dos parasitas e obtenção dos vermes adultos.

Para discussão sobre a possibilidade do gene isolado ser do hospedeiro (hamster) ou a alta similaridade ser comum na sub-família analisada, foi feito um alinhamento das proteínas CD39 de outros organismos que apresentaram maior similaridade com a sequência de aminoácidos predita para o clone de *Schistosoma* (CD39-TEG). O resultado do alinhamento mostra uma alta similaridade entre os CD39 desta subfamília (**FIGURA 37 e TABELA 8**). Esta alta similaridade de sequência de aminoácidos predita pode em parte explicar a alta similaridade entre a sequência isolada do tegumento do *S. mansoni* e de camundongo, podendo ser um fator comum nesta sub-família.

FIGURA 37 - Alinhamento entre CD39 de diferentes espécies e o clone CD39-TEG de *S. mansoni*. O alinhamento foi feito pelo programa PILEUP do GCG, com os parâmetros padrão. CD39-TEG-A e CD39-TEG-C correspondem a tradução da sequência do clone 44C (de 0,8 kb), feita respectivamente com os primers SP6 e T7. CD39-TEG-B corresponde a tradução da sequência do clone 44D (de 2,1 kb), feita com o primer T7. As outras sequências e seus números de acesso no GenBank são: CD39_MOUSE, P55772; CD39 de *Ratus norvegicus*, P97687; CD39_HUMAN, CD39 de *Homo sapiens* P49961 e 018956, CD39 de *Bos taurus*, 018956. O símbolo (*) significa o códon de parada da sequência codificante.

[illegible]

```

          491                      515
CD39_MOUSE LLLVAVAITG LFIYSKPSYF WKEAV*
P97687     LVLVAMVITG LFIFSKPSYF WKEAV*
CD39-TEG-A ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
CD39_HUMAN LVLETVAIIG LLIF KPSYF WKDMV*
CD39-TEG-C ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
O18956     LILLAVIIVG IVVF KPSYF WKDMV*
CD39-TEG-B ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~

```

TABELA 8 – Tabela de comparação de similaridade entre diferentes CD39 e o clone CD39-TEG de *S. mansoni*.

Sequências com maior similaridade com CD39-TEG de <i>S. mansoni</i> (BLASTP)	VALOR E
SW:CD39_MOUSE (P55772) <i>Mus musculus</i> (mouse)	2.0e-258
SP_RO:P97687 (P97687) <i>Rattus norvegicus</i> (rat)	2.3e-255
(P49961) <i>Homo sapiens</i> (human)	9.7e-225
O18956 <i>Bos taurus</i> (bovine)	2.9e-193
P79784 <i>Gallus gallus</i>	5.0e-133

Análise feita através de pesquisa de similaridade por BLASTP, da tradução para aminoácidos do consenso gerado pelo sequenciamento dos clones 44C e 44D.

Podemos ver, pela **FIGURA 37** e **TABELA 8**, que dentro da família denominada “apirases” (CD39/actina/HSP70), existe um sub-grupo bastante homólogo se comparadas as sequências de aminoácidos predita.

Há que se verificar também qual a similaridade de sequência de DNA entre os genes codificantes de CD39 mais similares ao gene isolado do tegumento do *S. mansoni* (CD39-TEG). Para isto foi feita uma análise através de BLASTN contra o banco de dados não-redundante que mostrou uma similaridade muito alta entre CD39 de diferentes espécies, incluindo camundongo, rato, humano e boi, (**FIGURA 38** e **TABELA 9**).

FIGURA 38 - Alinhamento parcial entre CD39 de diferentes espécies e o clone CD39-TEG de *s. mansoni*. O alinhamento foi feito pelo programa PILEUP do GCG e mostra apenas a região dos genes homóloga ao clone de *S. mansoni*. CD39-TEG-A e CD39-TEG-C correspondem a sequência do clone 44C (de 0,8 kb), feita com os primers SP6 e T7 respectivamente. CD39-TEG-B corresponde a sequência do clone 44D (de 2,1 kb), feita com o primer T7. As outras sequências correspondem aos genes com maior similaridade ao clone CD39-TEG, obtidos através de BLASTN da sequência do clone de *S. mansoni* contra o banco de dados não redundante, sendo estas: AF037366, CD39 de *Mus. musculus* ; RNU81295, CD39 ou ecto-apirase de *Rattus norvegicus*; HSU87967, ATP difosfohidrolase de humano; S73813, CD39 de humano e AF005940, ecto-apirase ou CD39 de *Bos taurus* .

	201							270
AF037366	TTTGCCAGAA	AATGTTAAGT	ATGGGATTGT	GTTGGATGCG	GGGTCATCTC	ACACCAACCT	GTACATCTAC	
CD39-TEG-A	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
CD39-TEG-B	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
RNU81295	ATTGCCAGAA	AATGTTAAGT	ATGGGATTGT	GCTGGATGCC	GGGTCGTCTC	ACACCAACCT	GTACATCTAC	
HSU87967	ATTGCCAGAA	AACGTTAAGT	ATGGGATTGT	GCTGGATGCG	GGTTCTTCTC	ACACAAGTTT	ATACATCTAT	
S73813	ATTGCCAGAA	AACGTTAAGT	ATGGGATTGT	GCTGGATGCG	GGTTCTTCTC	ACACAAGTTT	ATACATCTAT	
CD39-TEG-C	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~TCTC	ACACCAACTT	GTACATCTAC	
AF005940	ACTGCCAGAA	AATGTTAAGT	TTGGGATTGT	GCTGGATGCG	GGCTCCTCTC	ATACGAGTTT	GTACATCTAT	
	271							340
AF037366	AAGTGGCCGG	CCGAGAAGGA	GAATGACACA	GGGTGGTGTC	AGCAGTTAGA	GGAATGCCAA	GTGAAAGGTC	
CD39-TEG-A	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
CD39-TEG-B	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
RNU81295	AAGTGGCCGG	CTGAGAAGGA	GAATGATACA	GAGTGGTGTC	AGCTGTTAGA	AGAATGCCAA	GTGAAAGGTC	
HSU87967	AAGTGGCCAG	CAGAAAAGGA	GAATGACACA	GCGTGGTGTC	ATCAAGTAGA	AGAATGCAGG	GTTAAAGGTC	
S73813	AAGTGGCCAG	CAGAAAAGGA	GAATGACACA	GCGTGGTGTC	ATCAAGTAGA	AGAATGCAGG	GTTAAAGGTC	
CD39-TEG-C	AAGTGGTCAG	CCGAGAAGGA	GAATGACACC	GGGTGGTGTC	AACAGTTGCA	AGAATGTTCA	GTGAAAGGTC	
AF005940	AGATGGCCGG	CAGAGAAGGA	GAATGACACG	GGGTGGTGA	CTCAGATAGA	AGAATCGAAC	GTTAAAGGTC	
	341							410
AF037366	GCTGGAATCTC	AAAATATGCT	CAGAAAACAG	ATGAAATCGG	TGCGTACCTG	GCCGAATGCA	TGGAATGTC	
CD39-TEG-A	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
CD39-TEG-B	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
RNU81295	GCCGGAATCTC	AAAATACGCT	CAGAAAACAG	ATGAAATAGC	TGCATATCTG	GCTGAATGCA	TGAAAATGTC	
HSU87967	GCTGGAATCTC	AAAATTTGTT	CAGAAAGTAA	ATGAAATAGG	CATTTACCTG	ACTGATTGCA	TGGAAGAGC	
S73813	GCTGGAATCTC	AAAATTTGTT	CAGAAAGTAA	ATGAAATAGG	CATTTACCTG	ACTGATTGCA	TGGAAGAGC	
CD39-TEG-C	GCTGGAATTTT	AAAATATGCT	CAGAAAGCAA	ATGAACTAGA	CACATACCTG	GCTGAATGCA	TGGAATGTC	
AF005940	GCCGGAATCTC	AGGCTTTGCT	AAAAAAGTAA	ATGAAATCAA	TGTTTATCTG	ACGGCATGCA	TGGAAGAGC	
	411							480
AF037366	CACCGAAGTG	ATACCAACAT	CCAAGCATCA	CCAGACTCCT	TCTACCTGG	GAGCCACAGC	AGGCATGCGC	
CD39-TEG-A	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
CD39-TEG-B	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
RNU81295	CACCTGAGCGG	ATACCAAGCGT	CCAAACAGCA	CCAGACACCC	TGTACCTGG	GAGCCACCGC	GGGCATGCGC	
HSU87967	TAGGGAAGTG	ATTCCAAGGT	CCCAGCACCA	AGAGACACCC	TTTACCTGG	GAGCCACGGC	AGGCATGCGG	
S73813	TAGGGAAGTG	ATTCCAAGGT	CCCAGCACCA	AGAGACACCC	TTTACCTGG	GAGCCACGGC	AGGCATGCGG	
CD39-TEG-C	CACCTAAGTTG	ATCCCAGCAT	CTAAGCATCG	TGAAACACCT	TTTACCTGG	GAGCCACGGC	GGGCATGCGC	
AF005940	CCAGAAAGTG	ATTCCGTCAA	TCCAGCACAT	GGAAACACCT	TGTACCTGG	GAGCCACGGC	CGGCATGCGG	

	481						550
AF037366	GTTGCTTAGAA	TGGAAAGCGA	ACAATCGGCA	GACGAGGTCC	TGGCTGCAGT	GTCAACAAGC	CTTAAGAGCT
CD39-TEG-A	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CD39-TEG-B	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
RNU81295	GTTGCTCAGAA	TGGAAAGCAA	GCAATCGGCA	GACGAAGTCC	TGGCTGCAGT	GTCTAGGAGC	CTGAAGAGCT
HSU87967	GTTGCTCAGGA	TGGAAAGTGA	AGAGTTGGCA	GACAGGGTTC	TGGATGTGGT	GGAGAGGAGC	CTCAGCAACT
S73813	GTTGCTCAGGA	TGGAAAGTGA	AGAGTTGGCA	GACAGGGTTC	TGGATGTGGT	GGAGAGGAGC	CTCAGCAACT
CD39-TEG-C	GTTACTTAGAA	TGGAAAGTGA	ACAGTCGGCA	GACAGGGTCC	TGGCTGCAGT	GTCAAGAAGC	CTCAGCAGCT
AF005940	GTTGCTCCGGA	TGGAAATAA	ACAGATGGCA	GACAAGATCC	TGGCTGCAGT	TGCAAGCAGC	ATCAGCGAGT
	551						620
AF037366	ACCCCTTTGA	CTTCCAGGGT	GCCAAGATCA	TCACTGGACA	AGAGGAAGGT	GCCTATGGGT	GGATTACTAT
CD39-TEG-A	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CD39-TEG-B	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
RNU81295	ACCCCTTTGA	CTTCCAGGGC	GCCAAGATCA	TCACTGGGCA	GGAGGAAGGG	GCCTATGGGT	GGATTACTAT
HSU87967	ACCCCTTTGA	CTTCCAGGGT	GCCAGGATCA	TTACTGGCCA	AGAGGAAGGT	GCCTATGGCT	GGATTACTAT
S73813	ACCCCTTTGA	CTTCCAGGGT	GCCAGGATCA	TTACTGGCCA	AGAGGAAGGT	GCCTATGGCT	GGATTACTAT
CD39-TEG-C	ACCCCTTTGA	C~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
AF005940	ACCCCTTTGA	CTTCCAAGGT	GCCAGAAATCA	TCAGTGGCCA	GGAGGAAGGT	GCCTATGGCT	GGATTACTGT
	621						690
AF037366	TAACTATCTG	CTGGGCAGAT	TCACTCAGGA	CAGAGTTGG	CTAAGCCTCA	TCTCA...GA	CAGTCAGAAA
CD39-TEG-A	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CD39-TEG-B	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
RNU81295	TAACTATCTG	CTGGGCAGAT	TCACTCAGGA	CAGAGTTGG	CTAAACTTCA	TCTCA...GA	CAGCCAGAAA
HSU87967	CAACTATCTG	CTGGGCAAAAT	TCAGTCAGAA	ACAAGGTGG	TTCAGCATAG	TCCCATATGA	AACCAATAAT
S73813	CAACTATCTG	CTGGGCAAAAT	TCAGTCAGAA	ACAAGGTGG	TTCAGCATAG	TCCCATATGA	AACCAATAAT
CD39-TEG-C	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
AF005940	CAACTATTTG	CTGGGCAAAAT	TCACTCAGAA	TTGAGTTGG	TTTAACCTGA	AGCCAAGCAA	AGACGACACT
	691						760
AF037366	ACAGGAAACCT	TTGGCGCTTT	GGATCTCGGC	GGAGCCTCCA	CACAGATCAC	CTTCGTGCC	CAAAACAGCA
CD39-TEG-A	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~AGCA
CD39-TEG-B	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
RNU81295	ACAGGAAACCT	TTGGCGCTTT	GGATCTTGGC	GGCAGTTCTA	CACAAGTCAC	CTTCGTGCC	CTAAATCAGA
HS87967	ACAGGAAACCT	TTGGAGCTTT	GGACCTTGGG	GGAGCCTCTA	CACAAGTCAC	TTTTGTACCC	CAAAACCAGA
S73813	ACAGGAAACCT	TTGGAGCTTT	GGACCTTGGG	GGAGCCTCTA	CACAAGTCAC	TTTTGTACCC	CAAAACCAGA
CD39-TEG-C	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
AF005940	ACAGGAAACCT	ATGGAGCTTT	AGACCTTGGG	GGAGCCTCTA	CACAAATCAC	TTTTGTGCC	CAAAATGAAA
	761						830
AF037366	CTATAGAGTC	CCCAGAAAAC	TCTCTGCAAT	TCCGTCTCT	ATGGCGAGGAC	TATACTGTGT	ACACACACAG
CD39-TEG-A	CTATAGAGGC	CCCAGAAAAC	TCTCTGCAAT	TTCGCCTCT	ATGGTGAGGAC	TACTGTGT	ACACACACAG
CD39-TEG-B	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
NU81295	CTCTAGAGGC	CCCAGAAACC	TCCCTGCAAT	TCCGTCTCT	ACGGCACGGAC	TACACCGTGT	ACACACACAG
SU87967	CTATCGAGTC	CCCAGATAAT	GCTCTGCAAT	TTCGCCTCT	ATGGCAAGGAC	TACAAATGTCT	ACACACATAG
S73813	CTATCGAGTC	CCCAGATAAT	GCTCTGCAAT	TTCGCCTCT	ATGGCAAGGAC	TACAAATGTCT	ACACACATAG
CD39-TEG-C	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
AF005940	CGACCGAGTC	TCCAAACAAC	AACCTGTACT	TCCGCCTCT	ATGGCAAGAAC	TACAGTGTAT	ACACACACAG
	831						900
AF037366	CTTCTGTGTC	TATGGGAAGGATCAGGCTCT	CTGGCAGAAA	CTGGCCAAGG	ACATTAGGT	TTCAAGTGGT	
CD39-TEG-A	CTTCTGTGTC	TATGGGAAGGACCAAGCGCT	CTGGCAGAAA	CTAGCCAAGG	ACATTAGGT	TTCAAGTGGC	
CD39-TEG-B	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
RNU81295	CTTCTGTGTC	TATGGGAAGGATCAGGCACT	CTGGCAGAAA	CTGGCCCAGG	ACATTAGGT	TTCAAGTGGT	
HSU87967	CTTCTGTGTC	TATGGGAAGGATCAGGCACT	CTGGCAGAAA	CTGGCCAAGG	ACATTAGGT	TGCAAGTAAT	
S73813	CTTCTGTGTC	TATGGGAAGGATCAGGCACT	CTGGCAGAAA	CTGGCCAAGG	ACATTAGGT	TGCAAGTAAT	
CD39-TEG-C	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
AF005940	CTTCTGTGTC	TATGGGAAGGACCAAGCACT	TTTGCAGAAA	CTGGCCCTGG	GACTTCAGGG	TACAAATGGA	
	901						970
AF037366	GGCGTCCTTA	AG.....GA	CCCATGCTTT	AACCCAGGAT	ACGAGAAGGT	TGTGAATGTA	AGTGAGCTCT
CD39-TEG-A	GGGACTCTCA	GG.....GA	CCCATGCTTT	CACCCGGAT	ACAAGAAGGT	GGTGAATGTT	AGTGAACCTC
CD39-TEG-B	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~AAAGT	GGTGAATGTT	AGTGAACCTC
RNU81295	GGGATTCTCA	AG.....GA	CCCGTGCTTT	TACCCAGGAT	ATAAGAAGGT	TGTGAATGTA	AGCGAACCTC
HSU87967	GAAATTCTCA	GG.....GA	CCCATGCTTT	CATCCTGGAT	ATAAGAAGGT	AGTGAACGTA	AGTGACCTTT
S73813	GAAATTCTCA	GG.....GA	CCCATGCTTT	CATCCTGGAT	ATAAGAAGGT	AGTGAACGTA	AGTGACCTTT
CD39-TEG-C	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
AF005940	ATCATCCATG	AGCCATGCTT	TCACTCAAGA	TACATGAGGA	AAATAAAGAT	GAGCGTCTTA	AACGAAGGTT

	971						1040
AF037366	ATGGGCACTCC	CTGCACCAAA	AGATTCGAAA	GAAGCTACC	ATTTGATCAG	TTTCGAATCC	AGGGCACTGG
CD39-TEG-A	ACGGCACCCC	CTGCA~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CD39-TEG-B	ACGGCACCCC	CTGCACCAAG	AGATTTAAAA	GAAGCTACC	ATTTGATCAG	TTTCAAATCC	AGGGCACTGG
RNU81295	ATGGGCACTCC	CTGCACCAAG	AGATTTGAGA	GAAGCTACC	GTTTAATCAG	TTTCAAGTTC	AGGGCACTGG
HSU87967	ACAAGACCCC	CTGCACCAAG	AGATTTGAGA	GACTCTTCC	ATTCCAGCAG	TTTGAAATCC	AGGGTAITGG
S73813	ACAAGACCCC	CTGCACCAAG	AGATTTGAGA	GACTCTTCC	ATTCCAGCAG	TTTGAAATCC	AGGGTAITGG
CD39-TEG-C	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
AF005940	TCTGTACCAA	GAGACATGAG	TTGAATTCTT	ATTTTATCC	ACTCGTTGAC	ATTGAAATCC	GTGGCGCTGG
	1041						1110
AF037366	AAGACTACGAA	CAGTGCCACC	AGAGCATCCT	TGAGCTCTTC	AACAACAGCC	ACTGCCCTTA	CTCCCAGTGT
CD39-TEG-A	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CD39-TEG-B	AAAATACACA	CAGTGCCAAC	AGAGCATCCG	CCAGCTCTTC	AACAACAGCT	ACTGCCCTTA	CTCCCAGTGT
RNU8295	AAGATTACGAA	CAGTGCCACC	AGAGCATCCT	CAAGTTCTTC	AACAACAGCC	ACTGCCCTTA	CTCCCAGTGT
HSU7967	TAAACTATCAA	CAATGCCATC	AAAGCATCCT	GGAGCTCTTC	AACACCAAGT	ACTGCCCTTA	CTCCCAGTGT
S73813	TAAACTATCAA	CAATGCCATC	AAAGCATCCT	GGAGCTCTTC	AACACCAAGT	ACTGCCCTTA	CTCCCAGTGT
CD39-TEG-C	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
A005940	CAAACATCCAA	CGATGTCGGC	AAAGCATCAT	TCAACTCTTT	AACACCAAGT	ACTGCCCTTA	CTCCAGTGC
	1111						1180
AF037366	GCCTTCAATG	GCGTCTTCCT	GCCACCTCTC	CATGGGAGTT	TTGGGGCGTT	TTCTGCTTTC	TACTTTGTGA
CD39-TEG-A	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CD39-TEG-B	GCCTTCAATG	GTGTCTTTTT	GCCCCCTCTC	CATGGGAGTT	TTGGGGCATT	TTTCAAGTTC	TACTTTGTGA
RNU8125	GCCTTCAACG	GTGTCTTTTT	ACCCACCTCTC	CAGGGGAGTT	TTGGGGCATT	TTCTGCTTTC	TACTTTGTGA
HSU8767	GCCTTCAATG	GGATTTTCTT	GCCACCACTC	CAGGGGGATT	TTGGGGCATT	TTTCAAGTTC	TACTTTGTGA
S73813	GCCTTCAATG	GGATTTTCTT	GCCACCACTC	CAGGGGGATT	TTGGGGCATT	TTTCAAGTTC	TACTTTGTGA
CD39-TEG-C	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
AF05940	TCCTTCAATG	GGGTTTTCTT	GCCGCCACTC	CATGGGCAGT	TTGGGGCATT	TTTCAAGTTC	TACTTTGTGA
	1181						1250
AF037366	TGGATTTTTT	TAAGAAGGTA	GCGAAAAACA	GTGTCAICTC	TCAGGAGAAA	ATGACCGAGA	TAACAAAAAA
CD39-TEG-A	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CD39-TEG-B	TGGATTTTTT	TAAGAAGATG	GTAAGAAGACA	GTGTCTCCTC	TCCGGAAGAG	ATGACCGAGA	CCTTAAAAAT
RNU8125	TGGACTTTT	TAAGAAGATG	GCGAACGACA	GTGTCTCCTC	TCAGGAGAAA	ATGACTGAGA	TAACAAAAAA
HSU8767	TGAAGTTTTT	AAACTTGACA	TCAGAGAA..	.AGT...CTC	TCAGGAAAAG	GTGACTGAGA	TGATGAAAAA
S73813	TGAAGTTTTT	AAACTTGACA	TCAGAGAA..	.AGT...CTC	TCAGGAAAAG	GTGACTGAGA	TGATGAAAAA
CD39-TEG-C	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
AF05940	TGGAGTTTTT	AAACCTTACA	TCAGAGGAAT	CAGT...ATC	TGTGGAACAG	TTGACTGAGA	AGTTGGAAGA
	1251						1320
AF037366	TTTTTGCTCA	AAATCTTGGG	AAGAGACAAA	GACATCTTAT	CCTTCAGTAA	AGGAGAAGTA	CCTGAGTGAG
CD39-TEG-A	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CD39-TEG-B	TTTTTGCTCA	AAGCCTTGGG	AGGAGGTGAA	AACCGCTCAC	CCTACAGTAA	AGGAGAAGTA	CCTGAATGAG
RNU81295	CTTTTGCTCA	AAGCCTTGGG	AGGAGGTAAA	GGCATCTTAT	CCTACAGTAA	AGGAGAAGTA	CCTGAGTGAA
HSU87967	GTTCTGTGCT	CAGCCTTGGG	AGGAGATAAA	AACATCTTAC	GCTGGAGTAA	AGGAGAAGTA	CCTGAGTGAA
S73813	GTTCTGTGCT	CAGCCTTGGG	AGGAGATAAA	AACATCTTAC	GCTGGAGTAA	AGGAGAAGTA	CCTGAGTGAA
CD39-TEG-C	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
AF005940	GTTCTGCGCA	CAGCGTTGGG	AAGAGGTGCA	GAAGAATTTT	GGTGAAGTGA	AGGAGAAATA	CCTGAGTGAA
	1321						1390
AF037366	TACTGCTTCT	CGGGCGCCTA	CATCCTCTCT	CTC...CTGC	AAGGCTATAA	CTTCACAGAC	AGCTCCTGGG
CD39-TEG-A	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CD39-TEG-B	TACTGCTTCT	CGGGTGCTTA	CATCCTTACC	CTCCTTCTGC	AAGGCTATAA	CTTCACAGGC	AATTCCTGGG
RNU81295	TACTGTTTCT	CGGGGACCTA	CATCCTGTCT	CTCCTTCTGC	AAGGCTATAA	CTTCACGGGA	ACCTCCTGGG
HSU87967	TACTGCTTTT	CTGGTACCTA	CATTCTCTCC	CTCCTTCTGC	AAGGCTATCA	TTTCACAGCT	GATTCCTGGG
S73813	TACTGCTTTT	CTGGTACCTA	CATTCTCTCC	CTCCTTCTGC	AAGGCTATCA	TTTCACAGCT	GATTCCTGGG
CD39-TEG-C	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
AF005940	TACTGCTTTT	CTGGCACCTA	CATCCTGGTT	CTCCTCTGTA	ATGGCTACCA	TTTTACAGCT	GAGTCTTGGG
	1391						1460
AF037366	AACAGATTCA	TTTTATGGGC	AAGATCAAAG	ACAGCAACGC	GGGGTGGACT	TTGGGCTACA	TGCTGAACCT
CD39-TEG-A	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
CD39-TEG-B	ACCAGATTCA	TTTTATGGGC	AAGATCAAAG	ACAGCAATGC	AGGGTGGACT	TTGGGCTACA	TGCTG~~~~~
RNU81295	ACCAGATTCA	TTTTATGGGC	AAGATCAAAG	ACAGCAACGC	AGGGTGGACT	TTGGGCTACA	TGCTGAACCT
HSU87967	AGCACATCCA	TTTCATTGGC	AAGATCCAGG	GCAGCGACGC	CGGCTGGACT	TTGGGCTACA	TGCTGAACCT
S73813	AGCACATCCA	TTTCATTGGC	AAGATCCAGG	GCAGCGACGC	CGGCTGGACT	TTGGGCTACA	TGCTGAACCT
CD39-TEG-C	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
AF005940	AAAATATTCA	CTTCAITGAAC	AAGGTCGGGA	GCACCGACGT	TGGGTGGACT	TTGGGCTACA	TGCTGAACCT


```

1461                                     1500
AF037366 GACCAACA T G ATCCCAGCT G AACAGCCGTT GTCCCCGCCT
CD39-TEG-A ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
CD39-TEG-B ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
RNU81295 GACCAACA T G ATCCCAGCT G AACAGCCATT ATCCCCGCCT
HSU87967 GACCAACA T G ATCCCAGCT G AGCAACCATT GTCCACACCT
S73813 GACCAACA T G ATCCCAGCT G AGCAACCATT GTCCACACCT
CD39-TEG-C ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
AF005940 GACCAACAAG ATTCCAGCT G AAGAGCCAA T GTCCCCACCC

```

TABELA 9 - Tabela de comparação de similaridade de DNA entre diferentes CD39 e o clone CD39-TEG de *S. mansoni*.

Sequências com maior similaridade com CD39-TEG de <i>S. mansoni</i> (BLASTN)	Valor E CD39-TEG-A	Valor E CD39-TEG-B	Valor E CD39-TEG-C
U81295 <i>Rattus norvegicus</i>	2.7e-63	5.3e-158	1.2e-82
AF037366 <i>Mus musculus</i>	1.7e-67	4.6e-151	1.4e-88
U87967 Humano	1.5e-59	5.5e-121	4.0e-72
S73813 Humano	1.6e-59	6.4e-121	4.1e-72
AF005940 <i>Bos taurus</i>	8.2e-31	7.8e-76	4.2e-60

Análise feita através de pesquisa de similaridade por BLASTN das sequências CD39-TEG-A, CD39-TEG-B e CD39-TEG-C. O valor E corresponde à probabilidade da similaridade ser randômica, casual. Nota-se que os resultados variam para cada sequência.

Vê-se pelos dados do alinhamento das sequências de DNA e pelos valores de similaridade entre os diferentes representantes da sub-família CD39, que a semelhança entre as mensagens codificantes destes genes é muito grande. Este fator da suporte à hipótese de que a sequência parcial do gene homólogo a CD39 isolada a partir de RNAm de tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* pode ser efetivamente um gene do parasita, sendo muito similar ao de seus hospedeiros, o que pode caracterizar um tipo de “mimetismo molecular” do parasita em relação aos hospedeiros mais comuns.

As relações parasita-hospedeiro incluem uma íntima interação entre pelo menos dois sistemas genéticos, o do parasita e do hospedeiro. Em hospedeiros imuno-competentes uma das maneiras dos parasitas escaparem das respostas imunológicas é através da expressão de

antígenos apropriados, seja pela mudança muito rápida dos antígenos expressos dificultando seu reconhecimento ou pela expressão de epítomos muito similares, senão idênticos a aqueles presentes no hospedeiro (mimetismo antigênico), (Salzet et al., 2000).

Estudos com *Schistosoma* e depois com outros parasitas, demonstraram este tipo de mimetismo molecular através da caracterização de diversos antígenos comuns entre os parasitas e seus hospedeiros (Capron, 1995; Capron et al., 1989 e 1987; Maizels, et al., 1993 e Howell, 1985). A maioria das moléculas comuns entre hospedeiros e parasitas é encontrada na superfície dos parasitas, como é o caso do tegumento do *S. mansoni*. O tegumento do *Schistosoma* é a interface de contato entre o parasita e seu hospedeiro, por isto é alvo direto do sistema imunológico e hemostático.

Em certos casos, como para antígenos dos grupos sanguíneos ou moléculas de MHC, acredita-se que a aquisição seja do tipo passiva (Salzet et al., 2000), apenas uma adsorção de moléculas do hospedeiro à superfície do parasita. Porém recentemente, com a clonagem de milhares de genes de parasitas, foram evidenciados vários genes com alta identidade de sequência de nucleotídeos entre parasitas e mamíferos. Algumas proteínas estruturais como miosina e tropomiosina e também algumas enzimas regulatórias apresentam identidade distribuída em toda a sequência do gene (Dissous & Capron, 1995; Damian, 1991 e Shoemaker et al., 1992).

Alguns invertebrados de vida livre contém moléculas sinalizadoras altamente conservadas em relação aos mamíferos, o que contribui para a hipótese de que estas moléculas tenham se desenvolvido originalmente em organismos mais simples. Porém considerando os parasitas, estudos com a tropomiosina (Damian, 1991 e Shoemaker et al., 1992) têm revelado analogias, entre os *Schistosomes* e os moluscos (hospedeiros intermediários), mais evidentes que entre organismos filogeneticamente mais próximos a cada um individualmente, o que sugere que o mimetismo molecular esteja implícito na conservação molecular da espécie. Pode ser que as sequências altamente homólogas entre parasitas e hospedeiros apontem para a incorporação direta de parte do material genético do hospedeiro ao material genético do parasita (Salzet et al., 2000). Alguns estudos sugerem os retrovírus como responsáveis pela transferência da informação

genética do hospedeiro para o parasita, o que é suportado pela presença de sequências de genes virais (*vif* e *nef* de HIV-I) em vários genes de *S. mansoni* (Khalife et al., 1994) .

Diante das evidências de mimetismo molecular, onde são encontrados genes muito similares senão idênticos aos dos hospedeiros, acreditamos o gene homólogo a CD39 de camundongo, clonado em *S. mansoni* e mostrado nesta tese seja realmente um gene presente no genoma do parasita.

5 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Esta tese estudou três aspectos que surgiram nas diversas abordagens utilizadas para clonagem do gene codificante da ATP-difosfohidrolase (apirase) do tegumento do endoparasita sanguíneo *Schistosoma mansoni*: a purificação e caracterização de uma nova proteína com atividade apirásica no tegumento do *S. mansoni*; a construção de minibibliotecas de cDNA pelo uso de RT-PCR de baixa estringência, *primers* híbridos consenso degenerados e *touch-down* PCR (uma modificação da técnica ORESTES) e a clonagem parcial de um gene homólogo à CD39, uma apirase, no tegumento do *Schistosoma*.

5.1- Purificação e Caracterização de uma enzima com atividade apirásica no tegumento do *Schistosoma*.

Este estudo descreve a purificação de uma enzima com atividade apirásica (hidrólise de nucleosídeo tri e di-fosfatado) a partir de extratos de proteína do tegumento de vermes adultos de *S. mansoni*. O objetivo inicial era purificar uma apirase homóloga a família CD39 (*limphoid cell activation antigen*), descrita em 1996 por Vasconcelos et al., e Handa & Guidotti; e através de microsequenciamento de peptídeos internos da proteína, desenhar *primers* degenerados que pudessem ser usados na clonagem do gene codificante da proteína purificada.

A purificação foi essencialmente feita através da separação das proteínas por cromatografia de troca iônica em aparelho de FPLC e cromatografia de afinidade. A proteína com atividade apirásica foi selecionada através de ensaios de atividade de hidrólise de ADP. Poucas são as proteínas que hidrolisam nucleosídeos difosfatados descritas atualmente, sendo esta metodologia aparentemente suficiente na seleção da proteína de interesse.

Foram feitas três etapas de cromatografia para purificar a proteína com atividade ADPásica, inicialmente uma coluna de troca aniônica, em seguida uma coluna de troca catiônica e por fim uma coluna de ligação por afinidade.

Os passos finais da purificação separaram a enzima com atividade ADPásica por exclusão, pois esta foi encontrada em amostras recuperadas de pontos onde não ocorreu interação com a coluna de purificação (volumes de lavagem da coluna anteriores ao passo de eluição com o competidor da ligação).

A análise da amostra final da purificação, através de SDS-PAGE revelou a presença majoritária de uma banda com aproximadamente 62 kDa. Esta mesma banda, correspondente em um processo de purificação parcial (apenas com a primeira coluna de purificação) foi enviada para análise através de MALDI-TOF, (metodologia que analisa picos de massa referentes a fragmentação da amostra de proteína e os compara com a massa calculada para fragmentos das proteínas do GenBank). O resultado mostrou a presença majoritária de uma proteína similar a carboxil-esterase e outra similar a helicase. Como foi utilizada a hidrólise de ADP como controle positivo de atividade apirásica durante toda a purificação, suspeitamos que uma destas proteínas seja responsável pela atividade ADPásica. Como as helicases possuem atividade ATPásica sugerimos aqui que esta seja a proteína ativa da amostra. São necessários estudos futuros para confirmação deste dado, pois não existe na literatura nenhum dado sobre atividade de hidrólise de nucleotídeo difosfatado por helicases.

Durante o processo de purificação foi utilizado o detergente não iônico triton X-100 como agente solubilizante e estabilizante da mistura de proteínas do tegumento. Os ensaios de atividade ATP e ADPásica mostraram que a presença de triton X-100 nas amostras leva a uma inibição de aproximadamente 50% na atividade ATPásica. Ensaios de atividade em diferentes pHs mostraram que a fração solúvel em triton X-100 apresenta uma atividade ADPásica que tende a ter um pH ótimo alcalino.

Para averiguar se a proteína purificada se encaixava na família das apirases homólogas a CD39, foi feito um anti-soro policlonal anti-apirase de batata (proteína purificada em estudo anterior neste laboratório) que foi usado em ensaios de *Western blot*, demonstrando não haver imuno-reatividade cruzada na amostra aplicada nas colunas de purificação. Este dado evidencia que a proteína de 62 kDa com atividade ADPásica purificada não apresenta epítomos comuns às apirases da família de CD39.

Estes dados indicam que a utilização de ensaios de atividade ADPásica não é um bom controle para o processo de purificação da apirase de *S. mansoni*, visto que aparentemente proteínas de famílias diferentes são capazes de hidrolizar esta molécula.

Porém uma imuno-reatividade positiva foi evidenciada no material insolúvel no detergente triton X-100 utilizado para solubilizar as proteínas do tegumento do parasita no início do processo de purificação. Com o auxílio do anti-soro anti-apirase de batata foi estudada a capacidade de solubilização de outros detergentes em relação à apirase do tegumento homóloga à de batata. Foram testados os detergentes: SDS, C₁₂E₈ e LPC. Somente o detergente aniônico SDS foi capaz de solubilizar a proteína de interesse.

Visando a utilização deste detergente em processos posteriores para purificação desta proteína, foi ensaiada a influência deste detergente na atividade de hidrólise de ADP. Os resultados mostram que numa faixa de 0,1 a 1 ug de detergente por ug de proteína a inibição da atividade é pequena chegando ao máximo de 25-30%, o que evidencia que o SDS pode ser eventualmente utilizado na purificação da proteína. Temos como perspectiva de continuidade deste estudo a purificação desta proteína para caracterização de alguns peptídeos internos.

Pretendemos também purificar mais extensamente a proteína de 62 kDa para confirmar se esta é uma helicase e podermos avaliar se a proteína em questão é capaz de hidrolizar nucleotídeos difosfatados, pois para uma helicase ou carboxilesterase esta seria uma nova característica não descrita na literatura.

5.2 - Construção de minibibliotecas de cDNA através de RT-PCR de baixa estringência com *primers* híbridos consenso degenerados e *touch-down* PCR (uma modificação da técnica ORESTES).

Esta linha estudou a construção de mini-bibliotecas de fragmentos de cDNA produzidos por RT-PCR utilizando-se *primers* híbridos consenso-degenerados. Até o momento possuímos um conjunto de cerca de 3000 sequências de fragmentos gênicos que estão sendo gerados e analisados em conjunto com o doutorando Ricardo de Marco.

A análise destas sequências mostra que, de forma semelhante à técnica ORESTES, esta nova técnica amplifica preferencialmente a região central dos gene e produz um perfil variado de sequências diferentes com não-redundância em torno de 60% quando algumas centenas de clones são sequenciados por biblioteca.

Algumas melhorias foram feitas em relação ao trabalho original da construção de minibibliotecas de cDNA com *primers* aleatórios não degenerados em RT-PCR de baixa estringência (Dias Neto et al., 1997). No trabalho original utiliza-se primers de 18 bases, escolhidos aleatoriamente. É feita a transcrição reversa com o primer aleatório a 42 °C. Em seguida o cDNA produzido é utilizado como template em reação de PCR com anelamento inicial a 37 °C. Os dados daquele trabalho mostram que as mini-bibliotecas contêm uma média de 20 sequências diferentes e depois disto se esgotam, quer dizer se tornam muito repetitivas, redundantes.

Nossas modificações incluem o uso de primers-híbridos maiores (com cerca de 35 bases), onde a região 3' é degenerada; uso de touch-down no passo de anelamento decrescendo a temperatura de 0,5 °C em cada ciclo, iniciando à temperaturas em torno de 60-55 °C; diminuição na velocidade de rampa com que a temperatura de anelamento passa para temperatura de extensão da polimerase, e diluição do tampão da Taq-polimerase de 1X para 0,4 X, diminuindo a concentração de sal nas reações.

Estas modificações foram importantes para a obtenção de perfis mais complexos de sequências (menos redundantes) onde observamos que até uma média de 400 sequências a mini-biblioteca ainda não se esgota e a não-redundância permanece em torno de 60%. Estas modificações facilitam enormemente os projetos de sequenciamento em larga escala, pois reduzem em até 20 vezes o número de mini-bibliotecas a serem construídas, facilitando este passo limitante. Estes dados fazem parte de um trabalho que está escrito (cDNA Libraries constructed with Arbitrary Consensus-degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers and Low-stringency RT-PCR, Fietto JLR, DeMarco R & Verjovski-Almeida S).

Além disso o *touch-down* PCR aperfeiçoado em nosso laboratório foi incluído como rotina nos procedimentos da técnica ORESTES (Dias Neto et al., 2000), e gerou um pedido de adendo à

patente inicial (Fietto et al., Construction of ORESTES cDNA Libraries using Touch-down PCR, Addendum to Patent application #196,716 Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer, 2000).

Nossas modificações da técnica ORESTES mostram bibliotecas de cDNA com uma média de 300-400 sequências com nível de não-redundância em torno de 60-70% . Construídas dentro de nossa metodologia as biblioteca aumentam em torno de 10x a capacidade de produção de sequências não-redundantes em relação à técnica ORESTES convencional. o que leva a uma necessidade de muito menos trabalho de construção de bibliotecas na geração de dados em larga escala.

A produção de ESTs é hoje muito importante não somente para a caracterização da expressão gênica em organismos mas também está sendo muito utilizada em análises de finalização de projetos genomas de eucariotos, pois permite o mapeamento gênico indicando as regiões codificantes da sequência de DNA.

Este estudo está tendo continuidade com o doutorando Ricardo de Marco que tem avaliado a contribuição das bases e suas modificações na seleção das sequências alvo através da utilização de diferentes *primers* na construção das mini-bibliotecas, e tem feito importantes modificações na técnica visando ainda melhoras maiores na geração dos dados.

5.3 - Clonagem parcial de um gene homólogo à CD39, uma apirase, no tegumento de *Schistosoma*.

Estudando mudanças nos *primers* híbridos verificamos que os primers com 35 bases não são eficientes para amplificar genes específicos e que a diminuição do tamanho dos primers para 25 bases (praticamente abolindo o grampo ("*clamp*") dos primers híbridos) leva a maior especificidade da reação de RT-PCR.

Com este dado resolvemos voltar à *tentativa de clonagem do gene da apirase usando os primers de 25 bases. Utilizamos como template* RNA mensageiro extraído do tegumento isolado de vermes adultos, algo nunca descrito na literatura. Isolamos através de RT-PCR um fragmento de cDNA de 123 bases que apresenta uma alta homologia com apirases da subfamília CD39.

A sequência obtida foi utilizada para desenho de um par de *primers* específicos para clonagem do gene inteiro através da técnica RACE (método para amplificação rápida das pontas 5'e 3'do mesmo *template* – *Rapid Amplification of CDNA Ends*). Apenas a reação 3'produziu amplificação e isolamos um fragmento de 900 bases, correspondente a porção amino-central em relação à provável proteína total.

Esta sequência foi utilizada no desenho de um outro *primer* mais a 3'do gene para amplificação por RACE-PCR da região 3'total do gene. O resultado desta reação foi a amplificação de duas bandas de cDNA com 2,0 e 3,6 Kb aproximadamente. Todas as tentativas de amplificação da região 5'falharam.

Analizando a homologia de DNA da sequência clonada de *Schistosoma* e os genes mais homólogos do banco de dados, verificamos que a identidade de sequência é muito grande, da ordem de 10e-100. Apesar destes dados e de dados da literatura que discutem mimetismo molecular suportarem nossa hipótese de que este gene parcialmente isolado é realmente do *Schistosoma*, e não uma contaminação de material genético de células do hospedeiro, são necessários ainda mais estudos para comprovação desta hipótese.

Neste sentido temos como perspectiva investigar a presença da mensagem deste gene em amostra de DNA genômico e RNA mensageiro de cercárias ou miracídeos, pois estas formas do parasita não entram em contato com o hospedeiro vertebrado.

6- BIBLIOGRAFIA

- Abbas, M.K. and Cain, G.D. (1987) Actin and intermediate-sized filaments of the spines and cytoskeleton of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* **73**(1):66-74.
- Abel, L., Demenais, F., Prata, A., Souza, A.E. and Dessein, A. (1991) Evidence for the segregation of a major gene in human susceptibility/resistance to infection by *Schistosoma mansoni*. *Am J Hum Genet* **48**(5):959-70.
- Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F., et al., (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* **252**(5013):1651-6
- Asai, T., Miura, S., Sibley, L.D., Okabayashi, H. and Takeuchi, T. (1995) Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *Biol Chem* **270**(19):11391-7.
- Barreto, M.L., Silva, J.T.F., Mott, K.E. and Lehman, J.S. (1978) Stability of faecal egg excretion in *S. mansoni* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med.* **72**: 181-187.
- Barsoum, I.S., Colley, D.G. and Kamal, K.A. (1990) *S. mansoni*: detection of circulating antigens in murine schistosomiasis by antigen-capture sandwich ELISA using a monoclonal antibody. *Exp. Parasitol.* **71**: 107-113.
- Battastini, A.M., da Rocha, J.B., Barcellos, C.K., Dias, R.D. and Sarkis, J.J. (1991) Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem Res* **16**(12):1303-10.
- Bento soares, M., Bonaldo, M.F., Jelene, P., Su, L., Lawton, L and Efstratiadis, A. (1994) construction and characterization of a normalizer cDNA library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9228-9232.
- Bishop, J.O., Morton, J.G., Rosbash, M and Richardson, M. (1974) three abundance classes in HeLa cell messenger RNA. *Nature* **250**: 199-203.
- Blair, K.L., Bennet, J.L. and Pax, R.A. (1992) Praziquantel: physiological evidence for its site(s) of action in magnesium-paralysed *S. mansoni*. *Parasitology*. **104** :59-66.
- Born, G.V.R. (1962) Aggregation of blood platelet by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* **194**: 927-929.
- Busse, D., Pohl, B., Bartel, H. and Buschmann, F. (1980) the Mg^{2+} -dependent adenosine triphosphatase activity in the brush border of rabbit kidney cortex. *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**:147-159.
- Butterworth, A.E., Capron, M., Cordingley, J.S., Dalton, P.R., Dunne, D.W., Kariuki, H.C., Kimani, G., Koech, D., Mugambi, M., Ouma, J.H., et al. (1985) Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; **79**(3):393-408.
- Capron, A (1995) Le langage moléculaire des parasites. *Medecine et Sciences* 431-439.
- Capron, A and Dessaint, J.P. (1989) Molecular basis of host-parasite relationship: toward the definition of protective antigens. *Immunol. Rev.* **112**:27-48.

- Capron, A. et al., (1987) Immunity towards schistosomes: progress towards vaccine. *Science* **238**: 1065-1072.
- Capron, A. and Dessaint, J.P. (1992) Immunologic aspects of schistosomes. *Annu. Rev. Med.*, **43**:209-218.
- Cesari, I.M., Simpson, A.J., Evans, W.H. (1981) Properties of a series of tegumental membrane-bound phosphohydrolase activities of *Schistosoma mansoni*. *Biochem J* **198**(3):467-73.
- Cockcroft, S. and Gomperts, B.D. ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells. (1979) *Nature* **279**(5713):541-2.
- Cockcroft, S. and Stutchfield, J. (1989) ATP stimulates secretion in human neutrophils and HL60 cells via a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein coupled to phospholipase C. *FEBS Lett* **245**(1-2):25-9.
- Coles, G.C. (1984) Recent advances in schistosome biochemistry. *Parasitology*, **89**:603-37.
- Cordingley, J.S., Taylor, D.W., Dunne, D.W. and Butterworth, A.E. (1983) Clone banks of cDNA from the parasite *S. mansoni*: isolation of clones containing a potential immunodiagnostic antigen gene. *Gene*, **26**: 25-39.
- Côté, Y.P., Oullet, S. and Beaudoin, A.R. (1992) Kinetic properties of type-II ATP diphosphohydrolase from tunica media of the bovine aorta. *Biochim. Biophys. Acta* **1160**: 246-250.
- Damian, R.T. (1991) Tropomyosin and molecular mimicry. *Parasitol. Today* **7**, 96.
- Day, H.J. and Holmsen, H. (1971) Concepts of the blood platelet release reaction. *Ser. Haemat.* **4**:3-27.
- Deelder, A.M., Qian, Z.L., Kremsner, P.G., Acosta, L., Rabello, A.L.T., enyong, P., et al. (1994) Quantitative diagnosis of *Schistosoma* infections by measurement of circulating antigens in serum and urine. *Trop. Geogr. Med.* **46**: 233-238.
- Diamant, B. and Kruger, P.G. (1967) Histamine release from isolated rat peritoneal mast cells induced by adenosine-5'-triphosphate. *Acta Physiol Scand* **71**(4):291-302.
- Dias Neto, E., Garcia Correa, R., Verjovski-Almeida, S., Briones, M.R., Nagai, M.A., da Silva, W. Jr., Zago, M.A., Bordin, S., Costa, F.F., Goldman, G.H., Carvalho, A.F., Matsukuma, A., Baia, G.S., Simpson, D.H., Brunstein, A., de Oliveira, P.S., Bucher, P., Jongeneel, C.V., O'Hare, M.J., Soares, F., Brentani, R.R., Reis, L.F., de Souza, S.J., Simpson, A.J. (2000) Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7):3491-6.
- Dias Neto, E., Harrop, R., Correa-Oliveira, R., Wilson, R.A., Pena, S.D. and Simpson, A.J. (1997) Minilibraries constructed from cDNA generated by arbitrarily primed RT-PCR: an alternative To normalized libraries for the generation of ESTs from nanogram quantities of mRNA. *Gene* **186**(1):135-142.
- Diogo, C.M., Mendonca, M.C., Savino, W., Katz, N. and Tendler, M. (1994) Immunoreactivity of a cytokeratin-related polypeptide from adult *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol* **24**(5):727-32.
- Dissous, C. and Capron, a. (1995) Convergent evolution of tropomyosin epitopes. *Parasitol. Today*

11:45-46.

- Doenhoff, M.J., Butterworth, A.E., Hayes, A.J., Sturrock, R.F., Ouma, J.H., Koech, D.K., Prentice, M.A. and Bain, J. (1993) Seroepidemiology and serodiagnosis of schistosomiasis in Kenya using crude and purified egg antigens of *S. mansoni* in ELISA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**: 42-48.
- Dombrowski, K.E., Cone, J.C., Bjorn Dahl, J.M. and Phillips, C.A. (1995) Irreversible inhibition of human natural killer cell natural cytotoxicity by modification of extracellular membrane by the adenine nucleotide analogue 5'-p- (fluorosulfonyl)benzoyl adenosine. *Cell Immunol.* **160**:199-204.
- Dombrowski, K.E., Ke, Y. and Kapp, J.A. (1997) Role of ecto-ATPase in lymphocyte function. In: Plesner, L., Kirley, T.L. and Knowles, A.F., eds. *Ecto-ATPases*. New York: Plenum Press; p.197-207.
- Dombrowski, K.E., Ke, Y., Brewer, K.A. and Kapp, J.A. (1998) Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunological Reviews.* **161**: 111-118.
- Dombrowski, K.E., Trevillyan, J.M., Cone, J.C., Lu, Y. and Phillips, C.A. (1993) Identification and partial characterization of an ectoATPase expressed by human natural killer cells. *Biochemistry* **32**(26):6515-22.
- Dubyak, G.R., Cowen, D.S. and Mueller, L.M. (1988) Activation of inositol phospholipid breakdown in HL60 cells by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. Evidence for mediation by both pertussis toxin-sensitive and pertussis toxin-insensitive mechanisms. *J Biol Chem* **263**(34):18108-17.
- Dunne, D.W., Butterworth, A.E., Fulford, A.J., Kariuki, H.C., Langley, J.G., Ouma, J.H., Capron, A., Pierce, R.J. and Sturrock, R.F. (1992) Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur J Immunol* **22**(6):1483-94.
- Ellinghaus, P., Badehorn, D., Blumer, R., Becker, K. and Seedorf, U. (1999) Increased efficiency of arbitrarily primed PCR by prolonged ramp times. *Biotechniques* **26**(4):626-8, 630.
- Engels, D., Sinzinkayo, E. and Gryssels, B. (1996) Day-to-day egg count fluctuation in *S. mansoni* infection and its operational implications. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54**: 319-324.
- Feldmeier, H. and Poggenesee, G. (1993) Diagnostic techniques in schistosomiasis control. A review. *Acta Trop.* **52**: 205-220.
- Ferreira, S.T., Vasconcelos, E.G and Verjovski-Almeida, S. (1995) The ecto-ATPases of endoparasites and of blood cells and vessels. *Cienc. Cult.* **47**: 151-166.
- Fietto, J.L.R., DeMarco, R., Verjovski-Almeida, S., Dias Neto, E. and Simpson, A. J. (2000) Construction of ORESTES cDNA libraries using touch-down PCR. *Addendum to Patent Application # 196,716*.
- Fillippini, A., Taffs, R.E., Agui, T., and Sitkovsk, M.V. (1990). Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **265**:334-340.
- Forsyth, D.M. and Bradley, D.J. (1966) The consequences of Bilharziasis. Medical and public health importance in North-west Tanzania. *Bull World Health Organ* **34**(5):715-35.

- Fredholm, B.B., Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Daly, J.W., Harden, T.K., Jacobson, K.A., Leff, P. and Williams, M. (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* **46**(2):143-56.
- Gaarder, A., Jonsen, J., Laland, S., Hellem, A. and Owren P.A. (1961) Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature* **192**: 531-532.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P. and Blinov, V.M. (1989) Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res* **17**(12):4713-30.
- Gordon, J.L. (1990) The effects of ATP on endothelium. *Ann N Y Acad Sci* **603**:46-51; discussion 51-2.
- Hagan, P., Blumenthal, U.J., Dunn, D., Simpson, A.J. and Wilkins, H.A. (1991) Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature* 1991 **349**(6306):243-245.
- Hagan, P., Ndhlovu, P.D. and Dunne, D.W. (1998) *Schistosoma* Immunology: more questions than answers. *Parasitol. Today*. **14**(10): 407-412.
- Hagan, P., Wilkins, H.A., Blumenthal, U.J., Hayes, R.J. and Greenwood, B.M. (1985) Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. *Parasite Immunol* **7**(6):625-32.
- Handa, M. and Guidotti, G. (1996) Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* **218**(3):916-23.
- Harries, A.D. and Cook, G.C. (1987) Acute schistosomiasis (Katayama fever) clinical deterioration after chemotherapy. *J. Infect. Dis.*, **14**: 159.
- Haslam, R.J. and Cusack, N.J. (1981) Blood platelets receptors for ADP and for adenosine. In *Purinergic receptors (receptors and recognition, series B)*. vol 12, pg 221-285. G. Burnstock ed, Chapman and Hall, London.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H. and Vogt, P.H. (1997) Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* **23**(3):504-11
- Hockley, D.J. (1973) *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. *Int. J. Parasitol.* **3**: 13-25.
- Hoffmann, K.F. and Strand, M. (1996) Molecular identification of a *Schistosoma mansoni* tegumental protein with similarity to cytoplasmic dyenin light chains. *J. Biol. Chem.* **271** (42): 26117-26123.
- Homeida, M.M., Eltoum, I.A., Ali, M.M., Suliaman, S.M., Elobied, E.A., Mansour, M., Saad, A.M., and Bennett, J.L. (1996) The effectiveness of annual versus biennial mass chemotherapy in reducing morbidity due to schistosomiasis: a prospective study in Gezira-Managil, Sudan. *Am J Trop Med Hyg* **54**(2):140-5.
- Howell, M.J. (1985) Gene exchange between hosts and parasites. *Int. J. Parasitol.* **15**:597-600.
- Ikehara, S., Pahwa, R.N., Lunzer, D.G., Good, R.A. and Modak, M.J. (1981) Adenosine-5'-triphosphate-(ATP) mediated stimulation and suppression of DNA synthesis in lymphoid cells. I. Characterization of ATP responsive cells in mouse lymphoid organs. *J Immunol* **127**(5):1834-8.

- Ismail, M., Botros, S., Metwally, A., Willian, S., Farghally, A., Tao, L.F., Day, T.A., Bennett, J.L. (1999) Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am J Trop Med Hyg* **60**(6):932-5.
- Johnson, A.M., Illana, S., McDonald, P.J. and Asai, T. (1989) Cloning, expression and nucleotide sequence of the gene fragment encoding an antigenic portion of the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*. *Gene* **85**(1):215-20.
- Katz, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **32** (6): 705-711.
- Khalife, J., Pierce, R.J., Godin, C. and Capron, A. Molecular characterization of two *Schistosoma mansoni* proteins sharing common motifs with the vif protein of HIV-1. *Parasitology* **108** (Pt 5):533-42
- Khodaparast-, S.H. and Snow, L.D. (1989) Levamisole inhibition of alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase of bovine milk fat globule membranes. *Int J Biochem* **21**(4):401-5.
- Knowles, A.F., Isler, R.E. and Reece, J.F. (1983) The common occurrence of ATP diphosphohydrolase in mammalian plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* **731**(1):88-96.
- Kobayashi, S., Takeuchi, T., Asami, K. and Fujiwara, T. (1982) *Entamoeba histolytica*: ultrastructural localization of Ca²⁺-dependent nucleotidases. *Exp Parasitol* **54**(2):202-12.
- Kuble, D., Pyerin, W., Bill, O., Hotz, A., Sonka, J. and Kinzel, V. (1989) Evidence for ecto-protein kinase activity that phosphorylates Kemptide in a cyclic AMP-dependent mode. *J Biol Chem* **264**(24):14549-55
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4. *Nature (London)* **227**: 680-685.
- Laliberté, J.F. and Beaudoine, A.R. (1982) Kinetic effects of Ca²⁺ e Mg²⁺ on ATP hydrolysis by the purified ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* **257**: 3869-3874.
- Lemmens, R., Kupers, L., Sevigny, J., Beaudoine, A.R., Grondin, G., Kittel, A., Waelkens, E. and Vanduffel, L. (2000) Purification, characterization, and localization of an ATP diphosphohydrolase in porcine kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**(6):F978-88.
- Luthje, J. (1989) Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. *Klin Wochenschr* **67**(6):317-27.
- Macfarlane, D.E. and Mills, D.C. (1975) The effects of ATP on platelets: evidence against the central role of released ADP in primary aggregation. *Blood* **46**(3):309-20.
- Maizels, R.M., Bundy, D.A., Selkirk, M.E., Smith, D.F. and Anderson, R.M. (1993) Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* **365**(6449):797-805.
- Marquet, S., Abel, L., Hillaire, D., Dessein, H., Kalil, J., Feingold, J., Weissenbach, J. and Dessein, A.J. (1996) Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. *Nat Genet* **14**(2):181-4.

- Matsumoto, Y., Perry, G., Levine, R.J., Blanton, R., Mahmoud, A.A. and Aikawa, M. (1988) Paramyosin and actin in schistosomal teguments. *Nature* **333**(6168):76-8.
- McLaren, D.J. and Hockley, D.J. (1977) Blood flukes have a double outer membrane. *Nature* **269**(5624):147-9.
- Means, A.R. VanBerkum, M.F.A., Bagchi, I., Lu, K.P. and Rasmussen, C.D. (1991) Regulatory functions of calmodulin. *Pharmac. Ther.* **50**: 225-270.
- Medhat, A., Shehata, M., Bucci, K., Mohamed, S., Dief, A.D., Badary, S., Galal, H., Nafeh, M. and King, C.L. (1998) Increased interleukin-4 and interleukin-5 production in response to *Schistosoma haematobium* adult worm antigens correlates with lack of reinfection after treatment. *J Infect Dis* **178**(2):512-9.
- Melnick, R.L., Rubenstein, C.P. and Motzkin, S.M. (1979) Measurement of mitochondrial oxidative phosphorylation: selective inhibition of adenylate kinase activity by P₁P₅-di-(adenosine-5')-pentaphosphate. *Anal Biochem* **96**(1):7-11.
- Molnar, J and Lorand, L. (1961) Studies on Apyrases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **93**: 353-363.
- Moodie, F.D., Baum, H., Butterworth, P.J. and Peters, T.J. (1991) Purification and characterisation of bovine spleen ADPase. *Eur J Biochem* **202**(3):1209-15.
- Nascimento, P.S. and Verjovski-Almeida, S. (1991) Calcium activated ATPase of *Schistosoma mansoni* tegument. *Biophys. J.* **59**:337a.
- Nassi, P., Nediani, C., Liguri, G., Taddei, N. and Ramponi, G. (1991) Effects of acylphosphatase on the activity of erythrocyte membrane Ca²⁺ pump. *J Biol Chem* **266**(17):10867-71.
- Nediani, C., Marchetti, E., Nassi, P., Liguri, G. and Ramponi, G. (1991) Hydrolysis by acylphosphatase of erythrocyte membrane Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase phosphorylated intermediate. *Biochem Int* **24**(5):959-68.
- Neves, J. and Souza, D.W.C. (1983) Infecções causadas por trematódeos sanguíneos *in diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias*, Guanabara Koogan, 2^o ed., Rio de Janeiro, 887-917.
- Ongom, V.L. & Bradley, D.J. (1972) The epidemiology and consequences of *Schistosoma mansoni* infection in West Nile, Uganda. I. Field studies of a community at Panyagoro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **66**(6):835-51.
- Patanjali, S.R., Parimoo, S. and Weissman, S.M. (1991) Construction of uniform-abundance (normalized) cDNA library. *Proc. Natl. Sci. USA* **88**(11):5066.
- Paoli, P., Camici, G., Manao, G., Giannoni, E. and Ramponi, G. Acylphosphatase possesses nucleoside triphosphatase and nucleoside diphosphatase activities. (2000) *Biochem J* **349**(Pt 1):43-49.
- Payares, G., McLaren, D.J., Evans, W.H. and Smithers, S.R. (1981) Antigenicity and immunogenicity of the tegumental outer membrane of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol* **7**(1):45-61.
- Periyasamy, S.M., Huang, W.H. and Askari, A. (1983) Origins of the different sensitivities of (Na⁺ K⁺)-dependent adenosinetriphosphatase preparations to ouabain. *Comp Biochem Physiol B* **76**(3):449-54.

- Pessoa, S.B. and Martins, A.V. (1982) Esquistossomose mansoni, in *Parasitologia Médica*, Ed. Guanabara Koogan, 11ª edição. ed., Rio de Janeiro, pág. 382-406.
- Plesner, L. (1995) Ecto-ATPases: identities and functions. *Int. Rev. Cytol.*, 158:141-214.
- Popiel, I., Irving, D.L. and Basch, P.F. (1985) Wound healing in the trematode *Schistosoma*. *Tissue Cell* 17: 69-77.
- Rapaport, E. (1990) Mechanisms of anticancer activities of adenine nucleotides in tumor-bearing hosts. *Ann N Y Acad Sci* 603:142-9; discussion 149-50.
- Renganathan, E. and Cioli, D. (1998) An international initiative on praziquantel use. *Parasitol. Today*. 14 (10) : 390-
- Resta, R. and Thompson, L.F. (1997) SCID: the role of adenosine deaminase deficiency. *Immunol Today* 18(8):371-4.
- Rihet, P., Demeure, C.E., Bourgois, A., Prata, A. and Dessein, A.J. (1991) Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur J Immunol* . 21(11):2679-86.
- Roberts, M., Butterworth, A.E., Kimani, G., Kamau, T., Fulford, A.J., Dunne, D.W., Ouma, J.H. and Sturrock, R.F. (1993) Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. *Infect Immun* 61(12):4984-93.
- Rose, T.M., Schultz, E.R., Henikoff, J.G., Pietrokovski, S., McCallum, C.M. and Henikoff, S. (1998) Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res* 26(7):1628-35.
- Rozengurt, E. and Heppel, L.A. (1979) Reciprocal control of membrane permeability of transformed cultures of mouse cell lines by external and internal ATP. *J Biol Chem* 254(3):708-14.
- Rumjanek, F.D. (1987) Biochemistry and Physiology in the *Biology of Schistosomes*, Academic Press, pp. 163-181.
- Ruppel, A. and McLaren, D.J. (1986) *Schistosoma mansoni*: surface membrane stability in vitro and in vivo. *Exp Parasitol* 62(2):223-36.
- Saito, S., Rojekittikhun, W., Gao, P., Yamashita, T., Watanabe, T., Sakato, N. and Sendo, F. (1994) Characterization of the recognition specificity of autoreactive, polyspecific monoclonal antibodies obtained from spleen cells of parasite-infected BALB/c mice. *Parasite Immunol* 16(12):609-17.
- Salzet, M., Capron, A. and Stefano, G.B. (2000) Molecular crosstalk in host-parasite relationships:schistosome- and leech-host interaction. *Parasitol Today*, 16:536-40.
- Sanguinetti, C.J., Dias Neto, E. and Simpson, A.J.G. (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17(5):914-21.
- Schrader, J., Berne, R.M. and Rubio, R. (1972) Uptake and metabolism of adenosine by human erythrocyte ghosts. *Am J Physiol* 223(1):159-66.
- Sévigny, J., Levesque, F.P., Grondin, G and Beaudoin, A.R. (1998) Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localization by immunological techniques. *Bioch. Biophys. Acta*. 1334:73-88.

- Shoemaker, C.B., Ramachandran, H., Landa, A., dos Reis, M.G. and Stein, L.D. (1992) Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of epidermal growth factor receptor. *Mol Biochem Parasitol* **53**(1-2):17-32.
- Simpson, A.J., Schryer, M.D., Cesari, I.M., Evans, W.H. and Smithers, S.R. (1981) Isolation and partial characterization of the tegumental outer membrane of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **83**(Pt 1):163-77.
- Smith, T.M. and Kirley, T.L. (1999) Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-ATPase: evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily. *Biochemistry* **38**(1):321-8
- Smithers, S.R., Hackett F., Braga, V. and Simpson, A.J. (1990) Immunoblotting identifies additional antigens recognised by mice protectively vaccinated with adult *Schistosoma mansoni* tegumental membranes. *Parasitol Res.* **76**(5):454-6
- Smithers, S.R., Hackett, F., Ali, P.O. and Simpson A.J. (1989) Protective immunization of mice against *Schistosoma mansoni* with purified adult worm surface membranes. *Parasite Immunol* **11**(4):301-18
- Stefani, M and Ramponi, G (1995) Acylphosphate phosphohydrolases. *Life Chem. reports* **12**: 271-301.
- Steinberg, T.H., Newman, A.S., Swanson, J.A. and Silverstein, S.C. (1987) ATP4- permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J Biol Chem* **262**(18):8884-8.
- Taussky, H.M. and Shorr, E. (1953) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **202**: 675–685.
- Teesdale, C.H., Fahringer, K. and Chitsulo, L. (1985) Egg count variability and sensitivity of a thin smear technique for the diagnosis of *S. mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**: 369-373.
- Torres, C.R., Vasconcelos, E.G., Ferreira, S.T. and Verjovski-Almeida, S. (1998) Divalent cation dependence and inhibition of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase by fluorosulfonylbenzoyl adenosine. *Eur J Biochem* **251**(1-2):516-21.
- Traverso-cori, A., Traverso, S. and Reyes, H. (1970) Different molecular forms of potato apyrase. *Arch. Biochem. Biophys.* **137**: 133-142.
- Tsai, M.H., Marx, K.A., Ismail, M.M. and Tao, L. (2000) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction assay for identification of *Schistosoma mansoni* strains sensitive or tolerant to anti-schistosomal drugs. *J Parasitol* **86**(1):146-9.
- U.S. Letters Patent application No. 196,716 – Ludwig Institute for Cancer Research.
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Galperin, M.Y. and Ribeiro, J.M. (1998) Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*. A new type of nucleotide-binding enzyme. *J Biol Chem* **273**(46):30583-90
- Van Dam, G.J., Bogtish, B.J., Van Zeyl, R.J.M., Rotmans, J.P. and Deelder, A.M. (1996a) *Schistosoma mansoni*: in vitro and in vivo excretion of CAA and CCA by developing schistosomula and adult worms. *J. Parasitol.* **82**: 557-564.

- Van Lieshout, L., Polderman, A.M. and Deelder, A.M. (2000) Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. *Acta Trop.*, 77: 69-80.
- Vasconcelos, E.G., Ferreira, S.T., Carvalho, T.M.U., de Souza, W., Kettlun, A.M., Mancilla, M., Valenzuela, M.A. and Verjovski-Almeida, S. and (1996) Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *S. mansoni*. Immunological cross reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *J. Biol. Chem.*, 271:22139-22145.
- Vasconcelos, E.G., Nascimento, P.S., Meirelles, M.N., Verjovski-Almeida, S. and Ferreira, S.T. (1993) Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 58(2):205-14.
- Vennervald, B.J., Ouma, J.H. and Butterworth, A.E. (1998) Morbidity in schistosomiasis: assessment, mechanisms and control. *Parasitol. Today*. 14 (10) : 385-390.
- WHO/TDR, ultrasound in schistosomiasis, 1996. www.who.int/ctd/schisto
- Weissman, S.M. (1987) Molecular genetic techniques for mapping the human genome. *Mol. Biol. Med.* 4(3):133-43.
- Yagi, K., Shinbo, M., Hashizume, M., Shimba, L.S., Kurimura, S. and Miura, Y. (1991) ATP diphosphohydrolase is responsible for ecto-ATPase and ecto-ADPase activities in bovine aorta endothelial and smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 180(3):1200-6.
- Yogore, M.G.J., Lewert, R.M. and Blas, B.L. (1983) Seroepidemiology of schistosomiasis japonica by ELISA in the Philippines. I. Underestimation by stool examination of the prevalence of infection in school children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 1322-1334.

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO