BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
1994

Recebido em 26/11/01
Filde

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

β -D-galactofuranosidase: Purificação da enzima de
Penicillium fellutanum e sua detecção em *Trypanosoma cruzi*

Luiz Claudio Miletto

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

Orientadora :

Profa. Dra. Maria Júlia Manso Alves

São Paulo

05 de outubro de 2001

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

**“ β -D-Galactofuranosidase: Purificação da
Enzima de *Penicillium fellutanum* e sua
Detecção em *Trypanosoma cruzi*”**

LUIZ CLAUDIO MILETTI

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

Aprovada por:

Profa. Dra. MARIA JÚLIA MANSO ALVES
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. WALTER RIBEIRO TERRA
IQ – USP

Prof. Dr. PIO COLEPICOLA NETO
IQ – USP

Prof. Dr. HÉLIO KIYOSHI TAKAHASHI
UNIFESP

Prof. Dr. IVARNE LUIZ DOS SANTOS TERSARIOL
UMC

SÃO PAULO
05 DE OUTUBRO 2001.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Júlia Manso Alves, pela sabedoria em entender por muitas vezes minha ansiedade e estimular meu interesse.

Ao Dr. Walter Colli, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe de laboratório e pelo seu estímulo.

Ao Dr. Ivan Schumacher, pela boa convivência e o bom humor durante as aulas práticas.

À Marinei Ferreira Gonçalves, pela disposição em manter o laboratório funcionando e sempre estar presente com sugestões simples, mas importantes para o andamento de alguns experimentos.

Aos técnicos do laboratório Roberto Zangrandi e Célia Aparecida Lúdio Braga, que fazem um trabalho que “não aparece”, mas é crucial para o andamento da pesquisa.

Aos colegas de laboratório, Ariel, Myriam, Jorge, Fátima, Marinez, Maga, Henning, Débora, Melissa, Renata, Henrique, Marcela, Caroline e Gisele pela convivência e amizade.

Aos estagiários, Daniela Jinzenji, Paulo Henrique Kolle e Larissa Marjorie Franceschini de Oliveira, pela grande contribuição que deram durante todo o trabalho experimental e pela oportunidade de poder de alguma forma ter contribuído para suas formações profissionais.

Aos colegas de pós-graduação, Michelle, Luciano, Juliana, Ricardo, Ari, Karina, Katlin, Denise, Adriana, Flávio, Alexandre, Marcelo, Aurélio, Nancy, Jefferson, Felipe, Ribamar, Márcia, Edlaine, Rita, Fabiana, Humberto, Regina, Marilis, Luciana, Célio, Leonardo pela convivência agradável, viagens, festas e conversas nos corredores.

À FAPESP pelo suporte financeiro ao trabalho experimental e pela bolsa concedida.

A meu pai Antonio e minha mãe Maria de Lourdes, porque sem seu grande amor e compreensão nos momentos difíceis, e durante todos os outros de minha vida, eu não teria chegado até aqui.

A meu irmão Renato, por estar sempre pensando positivamente e pela sempre disposição em ajudar.

A Rubia, minha namorada, pois ao entrar na minha vida me tornou uma pessoa melhor e mais feliz.

“A Ausência de Evidência
não é
Evidência de Ausência”

Carl Sagan

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>PENICILLIUM SP E PENICILLIUM FELLUTANUM</i>	1
1.2 <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E DOENÇA DE CHAGAS.....	4
1.3 D-GALACTOFURANOSE.....	8
1.4 GLICOSIDASES	16
1.4.1 β -D-galactofuranosidase	17
1.5 GLICOCONJUGADOS	20
1.5.1 Alguns aspectos da glicosilação em <i>T. cruzi</i>	20
1.5.2 Glicoconjugados de <i>T. cruzi</i> contendo β -D-galactofuranose.....	21
1.5.3. LPPG (lipopeptidiofosfoglicana)	22
1.5.4 Mucinas.....	25
2. OBJETIVOS.....	29
3.MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 <i>PENICILLIUM FELLUTANUM</i>	30
3.1.1 Cultivo do fungo <i>Penicillium fellutanum</i>	30
3.1.2 Purificação enzimática	31
3.1.3 Dosagem da atividade enzimática	32
3.1.4 Preparo da amostra para obtenção de anticorpos.....	33
3.1.5 Obtenção e seqüenciamento de peptídeos	34
3.1.6 Síntese de peptídeos	34
3.1.7 Anticorpos anti-peptídeos de β -D-galactofuranosidase	35
3.1.8 Desenho dos oligonucleotídeos	35
3.1.9 Extração de DNA de <i>P. fellutanum</i>	36
3.1.10 Extração de RNA total e RNA mensageiro de <i>P. fellutanum</i> ..	36
3.1.11 Amplificação, isolamento, clonagem e seqüenciamento	37
3.1.12 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)	38
3.2 <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	38
3.2.1 Cultivo de células de cultura de tecido.....	38
3.2.2 Obtenção dos parasitas	38
3.2.3 Marcação de epimastigotas com ^{35}S -metionina	39
3.2.4 Marcação de epimastigotas com Ácido Palmítico tritiado (Pal ^3H)	40
3.2.5 Extração de DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	40
3.2.6 Extração de RNA de <i>T. cruzi</i> e síntese de cDNA	40

3.2.7 Biblioteca de cDNA de <i>T.cruzi</i>	41
3.3 OUTRAS TÉCNICAS	42
3.3.1 Dosagem de proteínas.....	42
3.3.2 Determinação do conteúdo de carboidrato	42
3.3.3 Eletroforese em gel de SDS-PAGE	42
3.3.4 Eletroeluição.....	43
3.3.5 PAGE não denaturante	43
3.3.6 “Western blot”	44
3.3.7 Imunofluorescência indireta	45
3.3.8 Imunoprecipitação	45
3.3.9 Eletroforese em gel de agarose	46
3.3.10 Preparação de bactérias competentes com cloreto de cálcio. 46	
3.3.11 Preparação de células bacterianas competentes para eletroporação	47
3.3.12 Reação de ligação.....	47
3.3.13 Transformação de células competentes.....	48
3.3.14 Digestão dos clones selecionados	48
3.3.15 Absorção do soro	49
3.4 LPPG	49
3.4.1 Extração de LPPG por butanol	49
3.4.2 Marcação de LPPG com Trítio	50
3.4.3 LPPG como substrato.....	51
3.4.5 Cromatografia para a identificação de monossacarídeos	51
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1 β -D-GALACTOFURANOSIDASE	53
4.1.1 β -D-galactofuranosidase de <i>P. fellutanum</i>	53
4.1.2 Determinação da massa molecular da β -D-galactofuranosidase	57
4.1.3 Parâmetros cinéticos e inibidores.....	63
4.1.4 Obtenção de anticorpos policlonais anti β -D- galactofuranosidase	63
4.1.5 Sequenciamento parcial da β -D-galactofuranosidase.	69
4.1.6 Obtenção de anticorpos anti-peptídeos	74
4.2 β -D GALACTOFURANOSIDASE DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	75
4.2.1 Reatividade dos anticorpos anti- β -D-galactofuranosidase com o <i>T.cruzi</i>	75
4.2.2 Detecção de atividade de β -D-galactofuranosidase em <i>T. cruzi</i> 76	
4.3 TENTATIVAS DE CLONAGEM DO GENE CODIFICADOR DA β -D- GALACTOFURANOSIDASE	85
4.3.1 Amplificação de sequência alvo e clonagem.....	85
4.3.2 Biblioteca de cDNA	93
4.3.3 Varredura de Biblioteca de cDNA de <i>T. cruzi</i> com anticorpo anti- β -D-galactofuranosidase	93

5.COMENTÁRIOS FINAIS.....	96
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
CURRICULUM VITAE.....	128
ANEXOS.....	130

ABREVIATURAS

a.e.	atividade específica
Ara _p	arabinopirranose
Ara _f	arabinofuranose
BSA	albumina bovina sérica
BCIP	5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato
C°	graus centígrados
cDNA	ácido desoxiribonucléico complementar
cm	centímetro
cpm	contagem por minuto
conA	concanavalina A
DEAE	dietilaminoetil
DME	Dubelcco's Modified Eagle's
DMSO	dimetilsulfóxido
DMF	dimetilformamida
DNA	ácido desoxiribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	ácido etilenoglicol-bis-N,N,N',N-tetraacético
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
g	aceleração da gravidade
GDP	guanosina difosfato
Gal _p	galactopirranose
Gal _f	galactofuranose
HPAEC	cromatografia de troca iônica em alto pH
HEPES	ácido N-2 hidroxietilpiperazina N"-2 etanosulfônico
kb	kilobase
kDa	quilodaltons
IPTG	isopropil β-D- tiogalactopiranosídeo
IL	interleucina
LB	meio de cultura de Luria-Bertani
LIT	infusão de fígado e triptose
LPG	lipofosfoglicana
LPPG	lipopeptidofosfoglicana
mA	miliampère
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
MW	massa molecular
M	molaridade
MOPS	ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico
μCi	microcurie
μg	micrograma
μl	microlitro
N	normalidade

NBT	nitroblue tetrazólio
NP40	Nonidet-P-40 (octilifenoxi)-polietoxietanol
nA	nano amperê
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PAD	detecção por pulso amperométrico
pb	pares de base
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação de polimerização em cadeia
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	fluoreto de p-fenilmetilsulfonila
psi	unidade de pressão por polegada
(p/v)	peso por volume
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto
RT-PCR	reação de polimerização em cadeia com transcriptase reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio
TAE	Tris acetato EDTA
TBS	solução salina tamponada com Tris
TCA	ácido tricloroacético
TE	solução de EDTA tamponada com Tris
TES	ácido N-tris[hidroximetil]metil-2-amonoetanosulfônico
TEMED	N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamina
TFA	ácido trifluoroacético
TLCK	clorometilcetona de N α -p-tosil-L-lisina
TNF	fator de necrose de tumores
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Tween	sorbitan monolaureato de polioxietileno
U	unidade
UDP	uridina difosfato
V	volts
(v/v)	volume por volume

RESUMO

A β -D-galactofuranose é um componente de várias macromoléculas de muitos organismos, incluindo bactérias, protozoários e fungos. Interessantemente este carboidrato não usual está ausente de glicoconjugados de mamíferos.

Um método alternativo foi utilizado para purificar a β -D-galactofuranosidase utilizando *p*-nitrofenil- β -D-galactofuranosideo como substrato. O meio de cultura concentrado do fungo *Penicillium fellutanum* foi cromatografado em coluna de DEAE-Sepharose CL 6B, seguido de cromatografia em coluna de afinidade de 4-aminofenil-1-tio- β -D-galactofuranosideo-Sepharose, que permitiu a separação de dois picos com atividade enzimática após a eluição com D-galactônico- γ -lactona em um gradiente de 100 a 500 mM de NaCl. Os dois picos resultaram, quando analisados por SDS-PAGE, em um polipeptídeo de 70 kDa.

Anticorpos produzidos contra a mistura das bandas recortadas do gel são capazes de imunoprecipitar 77 % das unidades totais de enzima.

Uma das bandas recortadas foi submetida a microseqüenciamento, obtendo-se seqüências para 3 peptídeos (65, 73, 101). Anticorpos foram produzidos contra os peptídeos sintéticos e usados para imunoprecipitar um polipeptídeo com atividade de β -D-galactofuranosidase.

Para verificar a presença de β -D-galactofuranosidase em *T. cruzi*, usamos a mesma coluna de afinidade de 4-aminofenil-1-tio- β -D-galactofuranosideo-Sepharose. Um extrato de formas epimastigotas marcadas metabolicamente com ^{35}S -metionina foi aplicado na coluna de afinidade. A enzima foi eluída após a lavagem com D-galactônico- γ -lactona em um gradiente de NaCl 100 a 500 mM. A análise por SDS-PAGE do material eluído mostrou um polipeptídeo de massa molecular aparente 50-60 kDa que é reconhecido por anticorpos anti- β -D-galactofuranosidase. Os anticorpos reagem por imunofluorescência indireta também com parasitas fixados com paraformaldeído. O

polipeptídeo de 50-60 kDa foi empregado em ensaios de atividade enzimática. Praticamente nenhuma atividade foi detectada utilizando-se *p*-nitrofenil- β -D-galactofuranosídeo como substrato. A LPPG (lipopeptídeofosfoglicana), um glicoconjugado isolado de epimastigotas de *T. cruzi* foi empregada como substrato. A galactopirranose, produto da hidrólise da atividade enzimática, foi detectada por cromatografia de troca iônica em alto pH sugerindo a presença de β -D-galactofuranosidase em *T. cruzi*.

ABSTRACT

β -D-galactofuranose is a component of several galactofuranose-containing macromolecules of many organisms, including bacteria, protozoa and fungi. Interestingly, this unusual sugar is absent in mammalian glycoconjugates

An alternative and fast method for the purification of β -D-galactofuranosidase was developed using *p*-nitrophenyl- β -D-galactofuranoside as substrate. A concentrated culture medium from *Penicillium fellutanum* was chromatographed on DEAE-Sepharose CL 6B followed by an affinity chromatography column of 4-aminophenyl 1-thio- β -D-galactofuranoside-Sepharose which yielded two separate peaks of enzyme activity when elution was performed with 10mM D-galactonic acid- γ -lactone in a 100-500 mM NaCl gradient. Both peaks rendered a single 70 kDa protein as detected by SDS-PAGE.

Antibodies elicited against a mixture of the single bands excised from the gel were capable to immunoprecipitate 77 % units out of total units of the enzyme from the crude extract.

One of the excised bands was submitted to microsequencing and the sequence for 3 peptides (65, 73, 101) was obtained. Antibodies were raised against the corresponding synthetic peptides and used to immunoprecipitate a polypeptide with β -D-galactofuranosidase activity.

To verify the presence of β -D-galactofuranosidase in *T. cruzi* we used the same 4-aminophenyl-1-thio- β -D-galactofuranoside-Sepharose affinity column. An extract of epimastigotes metabolically labelled with ^{35}S -methionine was applied on the affinity column. After washing, the putative enzyme was eluted by 10 mM D-galactonic acid- γ -lactone and 100-500 mM NaCl gradient. SDS-PAGE analysis of the eluted material show a polypeptide with an apparent molecular mass of 50-60 kDa that is recognized by all the antibodies raised against β -D-galactofuranosidase from *P. fellutanum*. Also the antibodies react

with *p*-formaldehyde fixed parasites as detected by indirect immunofluorescence. The 50-60 kDa polypeptide was then employed in enzymatic assays. Almost no enzymatic activity was observed when *p*-nitrophenyl galactofuranoside was employed as substrate. LPPG (lipopeptidophosphoglycan), a galactofuranose-containing glycoconjugate isolated from epimastigotes of *T. cruzi* was then employed as substrate. Galactopyranose, the product of the enzymatic activity, was detected by high pH anion-exchange chromatography, suggesting the presence of β -D-galactofuranosidase in *T. cruzi*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Penicillium* sp e *Penicillium fellutanum*

A classe ascomicota é monofilética e abrange aproximadamente 75% de todos os fungos descritos, que estão distribuídos por todos os continentes. Inclui a maioria dos fungos que se combinam com as algas para formar os líquens, e a maioria dos fungos que perderam evidências morfológicas de reprodução sexual. Entre os ascomicotas existem fungos utilizados freqüentemente pela humanidade, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Penicillium chrysogenum*. Existem também espécies patogênicas como *Aspergillus flavus* e *Candida albicans*. Ascomicotas assexuais, como os *Penicillium* usualmente são classificados separadamente como deuteromicota, pois os caracteres sexuais são necessários para a classificação dos ascomicotas.

O ascus é a estrutura onde ocorre a fusão nuclear e a meiose. No ascus um ciclo de mitose acontece seguida de meioses que resultam em oito núcleos e eventualmente em oito ascoporos. Os ascoporos são estruturas formadas pelo envelopamento do ascus com parte do citoplasma de onde se inicia a formação da parede celular. No momento em que são liberados para o ambiente os ascoporos são resistentes às adversidades ambientais, mas em condições adequadas podem germinar, dando origem a um novo indivíduo haplóide. O corpo dos ascomicotas corresponde a células eucarióticas cercadas por uma parede formada de quitina e beta-glicanas (WESSELS, 1994). Podem se formados por células simples, como as leveduras ou em longos filamentos divididos em segmentos celulares, que são chamados de hifas.

Como outros fungos, os ascomicotas são heterótrofos e obtêm seu nutriente de organismos vivos ou mortos (GRIFFIN, 1994).

O gênero *Penicillium* abrange aproximadamente 300 espécies conhecidas. São colônias esbranquiçadas que com o desenvolvimento das conídias (estruturas que podem ter forma globosa, elíptica ou

fusiforme e serem lisas ou rugosas), tornam-se esverdeadas, azuladas ou com outras colorações dependendo da espécie. No caso do *Penicillium fellutanum* temos o desenvolvimento de colônias esverdeadas (figura-1A). Microscopicamente (figura-1B e C), cadeias de conídias são produzidas em sucessão basipetal de células especializadas chamadas de fiálides (estruturas lanceoladas). Essas fiálides são produzidas de ramos de metulas, proporcionando uma aparência de “pincel”, conhecida como *penicillus*. As metulas crescem dos ramos dos conidiofóros (MOORE & JAIVEN, 1979), que podem ser simples (monoverticilados) ou ramificados em um (biverticilados-simétricos), dois (biverticilados-assimétricos) ou três ou mais estágios (SAMSON *et al*, 1984) (figura-1C). Por sua vez, os conidiofóros (hifas) têm um aspecto hialino liso ou rugoso, podendo ainda ser septados.

Muitas espécies de *Penicillium* são contaminantes de vários substratos e são reconhecidamente produtores de micotoxinas. Embora raramente provoquem doenças em seres humanos, têm sido implicados como agentes oportunistas em quadros de deficiência imunológica, causando infecções pulmonares, otites e endocardites.

Vários trabalhos já publicados têm demonstrado que os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* excretam uma variedade de polissacarídeos para o meio, sendo que muitos deles são antigênicos. Resíduos de β -D-(1-5) galactofuranose são imunodominantes dentre esses polissacarídeos e o aumento da cadeia desses resíduos aumenta a antigenicidade (NOTERMANS *et al*, 1988). A hidrólise dos resíduos de β -D-(1-5) galactofuranose, utilizando uma *exo- β -D-galactofuranosidase* de *Trichoderma harzanium*, (VAN BRUGGEN-VAN DER LUGT *et al*, 1992) reduz drasticamente a antigenicidade do polissacarídeo. Anticorpos monoclonais desenvolvidos contra a galactomanana de *Aspergillus* demonstraram sua especificidade com resíduos de β -D-(1-5) galactofuranose (STYNEN *et al*, 1992) e tiveram reação cruzada com

Figura – 1 Estrutura macro e microscópicas do *Penicillium fellutanum*.

A-Cultura de *P.fellutanum* em meio sólido.

B- Cultura de *P. fellutanum* corado com Giemsa.

C- Esquema das estruturas microscópicas.

Retirado de www.mycology.adelaide.edu.au

antígenos excretados por *Penicillium* sp. O epítipo reconhecido também se encontra na parede celular desse fungos (HEARN & SIETSMA, 1994).

O *Penicillium fellutanum* (anteriormente *P. charlesii*), fungo não patogênico, excreta para o meio um polímero de resíduos de β -D-(1-5) galactofuranose (PRESTON & GANDER, 1968), denominado galactocaralose, que foi caracterizado pela primeira vez por HAWORTH (HAWORTH *et al*, 1937), tendo sua estrutura confirmada por GORIN & SPENCER (GORIN & SPENCER, 1959). Excreta também uma peptideofosfogalactomanana, que possui em sua porção glicídica 8 a 10 resíduos de β -D-galactofuranose (GANDER *et al*, 1974). É importante notar que diferentemente de outras espécies de *Penicillium*, ele não possui em sua parede celular resíduos de β -D-(1-5) galactofuranose (BULMAN & CHITTENDEN, 1976).

1.2 *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas

As doenças parasitárias continuam a ser um dos maiores problemas de saúde pública. Dentre os mais importantes agentes patogênicos temos o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, com várias cepas insensíveis ao tratamento com nifurtimox e benznidazol, correntemente usadas no tratamento desta doença (RASSI & LUQUETTI, 1992). Vários grupos têm direcionado nos últimos anos seus estudos à identificação de metabólitos ou processos metabólicos nos parasitas, que possam ser utilizados na síntese de quimioterápicos mais eficientes (FAIRLAMB & CERAMI, 1992; SCHIRMER *et al*, 1995; LUQUETTI, 1997; URBINA, 1997, 1999).

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (CHAGAS, 1909), é um protozoário flagelado digenético eucarionte, pertencente à ordem Kinetoplastidae e à família Trypanosomatidae. As características desta ordem incluem a presença de flagelo e cinetoplasto, organela autoreplicável que contém o DNA extranuclear. O *Trypanosoma cruzi* é transmitido por insetos triatomíneos hematófagos pertencentes à família Reduviidae, sendo os principais transmissores o

Panstrongilus megistus, o *Triatoma infestans* e o *Rhodnius prolixus*. Os hospedeiros vertebrados somam uma grande variedade de espécies, incluindo o homem. O ciclo biológico do parasita (figura-2) se inicia quando triatomíneos se contaminam durante a ingestão de sangue de mamíferos infectados. Os parasitas ingeridos se multiplicam na luz intestinal do inseto como formas flageladas epimastigotas, e quando se encontram no intestino posterior, diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas, infectivas, que são eliminadas nas fezes e urina. A infecção pelo *T. cruzi* tem início quando os parasitas eliminados pelo inseto encontram uma descontinuidade na pele ou na mucosa (BRENER, 1973, 1992).

Ao penetrar no hospedeiro, o *T. cruzi* tem a possibilidade de atingir os tecidos subcutâneos de onde pode invadir diferentes tipos celulares, principalmente macrófagos (ANDRADE & ANDRADE, 1979). As formas tripomastigotas que invadem as células interagem com moléculas da membrana modificando o trânsito de lisossomos dependentes de microtúbulos, contribuindo para a formação de membranas dos vacúolos parasitóforos (ALVES, 1996), de onde conseguem escapar, indo para o citoplasma onde se multiplicam como amastigotãs por divisão binária. Posteriormente, ocorre uma nova diferenciação para a forma tripomastigota que é liberada para a circulação pela ruptura da membrana plasmática. Estes tripomastigotas podem invadir então novas células ou atingir órgãos distantes.

A transmissão do *T. cruzi* para o homem pode ocorrer pelo contato com o vetor ou pela transfusão sangüínea, que é responsável por 560 mil novos casos anuais (HAYES & SCHOFIELD, 1990), dado o grande contingente de indivíduos na fase crônica da doença, estimados em 2 a 3 milhões. A relação entre a reativação da doença de Chagas em pacientes HIV positivos e a ação do *T. cruzi* como agente oportunista em tal

Figura-2 Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado.

Passos 1 a 4, representam a metamorfose do tripomastigota para epimastigota e então para tripomastigota metacíclico, no inseto. Passos 5 e 6, tripomastigotas se diferenciando em amastigotas no tecido, e posteriormente em tripomastigotas (7) que são liberados no sangue.

imunossupressão já foi mostrada e discutida (DEDET & PRATLONG, 2000).

Os insetos vetores são encontrados em toda a América, desde o sul dos EUA até o sudoeste da Argentina (BRENNER & DE LA MERCED, 1987). A disseminação dos vetores ocorre principalmente nas regiões rurais, onde as instalações precárias de moradia se tornam um nicho ideal para o habitat dos vetores, devido à proximidade com o ciclo natural. Tem havido um trabalho sistemático de ação governamental com investimentos de cerca de US\$ 200 milhões em países do Cone Sul, interessados em combater a doença de Chagas, já conhecida há 92 anos. Os resultados levaram a OMS, em 1997, a afirmar que a transmissão da doença pelo invertebrado estaria controlada em países como Brasil, Argentina, Chile e Uruguai (SCHMUNIS *et al*, 1996), ainda que surtos localizados venham a ocorrer.

A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada por um conjunto de manifestações de intensidade variável, após um período de incubação mínimo de 4 dias. Um dos primeiros sinais clínicos que surge é um processo inflamatório inespecífico no local do sítio de entrada do parasita, que pode ser o olho (sinal de Romana) ou a pele (chagoma). A análise histológica revela um parasitismo disseminado entre vários tipos celulares e edema intersticial com hiperplasia dos gânglios satélites (principalmente pré-auricular). Outros sintomas da fase aguda são febre, mal-estar, astenia, cefaléia e hipóxia. Com o passar do tempo, alterações como hepatomegalia, esplenomegalia e miocardite aguda podem ocorrer (RASSI *et al*, 1976). A alta parasitemia observada na fase aguda tende a decrescer como resultado da resposta imune do hospedeiro, com os parasitas praticamente ausentes no sangue na fase crônica da infecção (BRENER, 1973, 1992).

A fase crônica pode ser subdividida em forma indeterminada, forma cardíaca e forma digestiva. A forma indeterminada é definida como um estado no qual o paciente parece ter uma cura aparente, isto é, regressão dos sintomas da fase aguda, podendo permanecer assintomático durante cerca de 10 a 20 anos, com possíveis

manifestações clínicas posteriormente. A fase cardíaca é caracterizada por arritmias, insuficiência cardíaca e tromboembolismo. A fase digestiva é caracterizada por alterações morfológicas do esôfago e do cólon, resultantes da lesão das enervações, que levam a dificuldades na deglutição e na defecação (RASSI *et al*, 1976).

O diagnóstico da doença de Chagas é realizado em função do estágio da doença. Na fase aguda a parasitemia é alta, permitindo a pesquisa dos parasitas ao microscópio de amostras retiradas do sangue do paciente. Uma sensibilidade próxima a 100% pode ser obtida pela concentração da amostra ou por métodos parasitológicos indiretos, como hemocultura e xenodiagnóstico (CAMARGO & TAKEDA, 1979). Esses métodos indiretos são também utilizados para demonstrar a transmissão congênita, acompanhar o tratamento quimioterápico dos pacientes ou ainda quando os testes sorológicos fornecem resultados duvidosos.

Várias técnicas imunológicas para a detecção dos anticorpos anti-*T. cruzi* tais como imunofluorescência indireta, hemaglutinação e ELISA, são bastante sensíveis nesta fase (SPENCER *et al*, 1985), com eficiência variando de 95 a 100% (CAMARGO, 1992), quando se empregam pelo menos duas técnicas diferenciadas. Devido à grande variabilidade antigênica de isolados de *T. cruzi* (SEGURA & CAZZULO, 1985) e à dificuldade em padronizar os antígenos usados na sorologia, mais de uma técnica deve ser empregada no diagnóstico. Diagnósticos baseados em técnicas de detecção de ácidos nucleicos do parasita têm sido testados com bons resultados (BRITTO *et al*, 1993).

1.3 D-Galactofuranose

A D-galactose piranosídica (D-Gal_p) apresenta-se distribuída amplamente pela natureza, fazendo parte também das cadeias de carboidratos de glicoproteínas e glicolípidios de mamíferos (LEDERKREMER & COLLI, 1995). Sua conformação furanosídica (D-Gal_f) (figura-3), entretanto, não está presente nesses glicoconjugados.

Figura-3 Ciclização da galactose.

(A) A figura mostra as estruturas de Fischer para a galactose e a reação para a formação do hemiacetal que origina os diferentes anômeros.

(B) Fórmula de Haworth para a $\beta\text{-D-galactofuranose}$

O estudo do metabolismo da galactofuranose vem sendo intensificado devido ao crescente número de relatos, que mostram que este carboidrato faz parte de glicoconjugados de diferentes organismos, sendo que muitos deles são patogênicos. Sua presença foi descrita em *Mycoplasma mycoides* (PLACKETT & BUTTERY, 1964) e em várias bactérias (tabela-1) e fungos (tabela-2). Em *Aspergillus fumigatus* foi descrita a primeira estrutura O-ligada em fungos que contém o motivo β -Gal_f(1-5) β -Gal_f não terminal (LEITÃO *et al*, 2001).

Esses resíduos de galactofuranose que tendem a ser altamente antigênicos contribuem para a imunogenicidade destes organismos e são reconhecidos pelo sistema imune dos mamíferos.

Dentre as bactérias, tem-se demonstrado a importância da galactofuranose como elemento essencial no envelope celular de *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium tuberculosis*, como ligante entre a porção peptidoglicana com a porção do ácido micólico (WESTON *et al*, 1998) e de arabinomananas (que parecem estar relacionadas com a atenuação do sistema imune do hospedeiro), assim como a ligação das micobactérias a receptores em macrófagos (CHARTTERJEE & KHOO, 1998). Em micobactérias se mostrou que a biossíntese da porção de galactofuranas se inicia com a adição de galactofuranoses, uma a uma ao “core” do poliprenil-P-P-GlcNAc-ramnose (MIKUSOVÀ *et al*, 2000) que foi caracterizado quanto a sua heterogeneidade e composição. Foi demonstrado recentemente (PAN *et al*, 2001) que o “knockout” do gene da galactofuranosil transferase em *Mycobacterium tuberculosis* impede o crescimento da bactéria e que essa enzima é bifuncional, isto é, capaz de transferir UDP-Gal_f β (1-5) e β (1-6) para glicolipídios aceptores (KREMER *et al*, 2001).

A presença de uma UDP-Gal_P mutase, enzima responsável pela interconversão de UDP-Gal_P para UDP-Gal_f, foi caracterizada em *Klebsiella pneumoniae* (KOPLIN *et al*, 1997), *Mycobacterium smegmatis* (WESTON *et al*, 1998) e *Escherichia coli* (NASSAU *et al*, 1996). Para a enzima de *E.coli* um ensaio para purificação por HPLC foi desenvolvido

Tabela-1 Bactérias que possuem β -D-galactofuranose em suas moléculas.

<i>Salmonella typhimurium</i>	SARVAS & NIKAIDO, 1971
<i>Shigella dysenteriae</i>	DMITRIEV <i>et al</i> , 1975
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	VILKAS, <i>et al</i> , 1973 DAFTE <i>et al</i> , 1990
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	VILKAS, <i>et al</i> , 1973 DAFTE <i>et al</i> , 1990
<i>Mycobacterium leprae</i>	McNEIL <i>et al</i> , 1987
<i>Streptococcus sanguis</i>	ABEYGUNAWARDANA <i>et al</i> , 1989
<i>Streptococcus oralis</i>	ABEYGUNAWARDANA <i>et al</i> , 1991
<i>Haemophilus pleuropneumoniae</i>	PERRY, 1990
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WHITFIELD <i>et al</i> , 1991
<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	GERWIG <i>et al</i> , 1993
<i>Clostridium thermocellum</i>	GERWIG <i>et al</i> , 1993
<i>Rhodococcus spp e Nocardia spp</i>	DAFFE <i>et al</i> , 1993
<i>Renibacterium salmonarium</i>	SOERUM <i>et al</i> , 1994
<i>Escherichia coli</i>	STEVENSON <i>et al</i> , 1994
<i>Lactobacillus helveticus</i>	YAMAMOTO <i>et al</i> , 1995
<i>Thermus aquaticus</i>	CARRETO <i>et al</i> , 1996
<i>Bifidobacterium infantis</i>	TONE-SHIMOKAWA <i>et al</i> , 1996
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	NAGAOKA <i>et al</i> , 1996
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	HOSONO <i>et al</i> , 1997
<i>Streptococcus thermophilus</i>	URASSHIMA <i>et al</i> , 1999
<i>Streptococcus mitis</i>	BERGSTRÖN <i>et al</i> , 2000
<i>Streptococcus spp</i>	ROETHLISBERGER <i>et al</i> , 2000
<i>Streptococcus macedonicus</i>	VINCENT <i>et al</i> , 2001

Tabela-2 Fungos que possuem β -D-galactofuranose em suas moléculas.

<i>Sporothrix schenckii</i>	MENDONÇA-PREVIATO <i>et al</i> , 1980
<i>Ceraticyistis stenoceras</i>	MENDONÇA-PREVIATO <i>et al</i> , 1980
<i>Histoplasma capsulatum</i>	BARR, <i>et al</i> , 1984
<i>Ascobulus furfuraceus</i>	GROISMAN & LEDERKREMER, 1987
<i>Cordyceps cicadae</i>	KIHO <i>et al</i> , 1988
<i>Penicillium charlesii</i>	TREJO <i>et al</i> , 1971
	UNKEFER & GANDER, 1990
<i>Cladosporium herbarium</i>	SWARD-NORDMO <i>et al</i> , 1991
<i>Cryptococcus neoformans</i>	JAMES <i>et al</i> , 1992
<i>Aspergillus fumigatus</i>	LATGE <i>et al</i> , 1994
	LEITÃO <i>et al</i> , 2001
<i>Aurobasidium pullulans</i>	KATAOKASHIRASUGI <i>et al</i> , 1994
<i>Paelomyces variotii</i>	DOMENECH <i>et al</i> , 1994
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	SOARES <i>et al</i> , 1995
<i>Talaromyces spp</i>	PRIETO <i>et al</i> , 1995
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	TOLEDO <i>et al</i> , 1995 ALMEIDA <i>et al</i> , 1996
<i>Acremonium spp</i>	OHTA <i>et al</i> , 1996
<i>Trichopyton mentagrophytes</i>	IKUTA, <i>et al</i> , 1997
<i>Trichopyton rubrum</i>	IKUTA, <i>et al</i> , 1997
<i>Cladonia spp</i>	WORANOVICZ <i>et al</i> , 1997
<i>Paecilomyces spp</i>	DOMENECH <i>et al</i> , 1999
<i>Thamnia subuliformis</i>	OLAFSDOTTIR <i>et al</i> , 1999
<i>Cordyceps sinensis</i>	KIHO <i>et al</i> , 1999
<i>Penicillium vermoesenii</i>	AHRAZEM <i>et al</i> , 1999
<i>Aspergillus niger</i>	BARDALAYE <i>et al</i> , 1977
	TAKAYANAGY <i>et al</i> , 1994 (α -D-gal)
	WALLIS <i>et al</i> , 1999
<i>Nocardioideis albus</i>	SHASHKOV <i>et al</i> , 1999
<i>Nocardioideis luteus</i>	SHASHKOV <i>et al</i> , 2000
<i>Myrothecium spp</i>	AHRAZEM <i>et al</i> , 2000
<i>Sesquicilium spp</i>	AHRAZEM <i>et al</i> , 2001
<i>Nectria spp</i>	

(LEE *et al*, 1996) e a enzima foi cristalizada (McMAHON *et al*, 1999). Inibidores já foram sintetizados (LEE *et al*, 1997) e recentemente evidenciou-se o envolvimento de FAD na regulação da catálise (ZHANG & LIU, 2000). BARLOW e colaboradores (BARLOW *et al*, 1999), observaram por ressonância magnética nuclear com isótopos de carbono (^{13}C), a mudança de posição dos isótopos, o que demonstra que a ligação anomérica C1-O é quebrada durante a interconversão de UDP-Gal_p para UDP-Gal_r pela UDP-galactopiranosose mutase (figura-4). Recentemente mostrou-se que a UDP-galactopiranosose mutase também é capaz de interconverter a UDP-Ara_p para UDP-Ara_r (ZHANG & LIU, 2001), embora o que se postula até o momento, é que o precursor da arabinofuranose é o β -D-arabinofuranosil-1- monofosforildecaprenol.

Dentre os fungos que possuem β -D-galactofuranose em seus glicoconjugados, podemos ressaltar o *Paracoccidioides brasiliensis*. TOLEDO e colaboradores (TOLEDO *et al*, 1995), demonstram que glicolipídios contendo β -D-galactofuranose de *P. brasiliensis* reagem com soro de pacientes com paracoccidioidomicose. Um anticorpo monoclonal que reconhece β -D-galactofuranose de um glicolipídio de *Paracoccidioides brasiliensis*, apresentou reação cruzada com moléculas de *T. cruzi* e *L. major* (SUZUKI *et al*, 1997). Desde então, outros glicolipídios contendo β -D-galactofuranose, têm sido isolados (LEVERY *et al*, 1996, LEVERY *et al*, 1998).

Com o crescente interesse no estudo do metabolismo da galactofuranose vários autores têm tentado nos últimos anos desenvolver substratos artificiais (VARELA *et al*, 1986; MARINO *et al*, 1995), análogos para estudos cinéticos (JOHNSTON *et al*, 1998; CHIOCCONI, *et al*, 2000) e inibidores das enzimas envolvidas no processo (MARINO *et al*, 1998, KOVENSKY *et al*, 1999; LEE *et al*, 1999; RANDELL *et al*, 2000 a e b, MARINO *et al*, 2001).

Em *Trypanosoma cruzi*, a galactofuranose foi encontrada em lipopeptidofosfoglicana (LPPG) de *T. cruzi* (LEDERKREMER *et al*, 1980, 1985; GOLGHER *et al*, 1993), em mucinas com ligação β (1-4) (ACOSTA-

SERRANO *et al*, 1995), em cadeias N-ligadas de glicoproteínas de 80-90 kDa (ARRUDA *et al*, 1989) e como parte da estrutura de glicopeptídeos (HAYNES *et al*, 1996). A β -D-galactofuranose também está presente na estrutura interna de glicoconjugados, tal como a lipofosfoglicana (LPG), isolados de diversas espécies de *Leishmania* (McCONVILLE *et al*, 1990; TURCO & DESCOTEAUX, 1992; PREVIATO *et al*, 1997) e em glicoproteínas de *Leptomonas samuelli* (MORAES *et al*, 1988), *Herptomonas samuelpessoai* (GONZALEZ-CLEMENTE *et al*, 1990) e *Endotrypanum schaudinni* (MERELLO *et al*, 1995).

A incorporação de galactofuranose aos glicoconjugados dos tripanosomatídeos é pouco conhecida. A existência de uma β (1-3) galactofuranosil transferase foi postulada, após o isolamento do gene em *Leishmania sp* e *T. cruzi*, mas a proteína não foi isolada. Tentativas de identificar o precursor de galactofuranose como UDP-Glc_p ou UDP-Gal_p em *Crithidia fasciculata* (MENDELZON & PARODI, 1986) e em *T. cruzi* (A. PARODI, comunicação pessoal) foram infrutíferas, assim como as tentativas de mostrar UDP-Gal_r como substrato de uma transferase em *T. cruzi* (LEDERKREMER & COLLI, 1995).

É interessante ressaltar que anticorpos que reconhecem galactofuranose inibem parcialmente a invasão da célula hospedeira pelo *T. cruzi* (ARRUDA *et al*, 1989). Embora esses estudos não tenham avançado na caracterização de possíveis ligantes nas células de mamíferos recentemente TSUJI e colaboradores (TSUJI *et al*, 2001), identificaram e clonaram uma lectina em humanos, denominada intelectina humana (hIntI) que possui afinidade, na presença de cálcio, por resíduos de galactofuranose. Essa proteína é expressa em coração, cólon e timo. A hipótese de que a intelectina está envolvida no reconhecimento de componentes específicos de bactérias no hospedeiro e talvez dos tripanossomatídeos foi aventada e reforça a importância desse carboidrato na interação parasita-hospedeiro.

1.4 Glicosidases

As hidrolases O-glicosídicas (EC 3.2.1.-) são um grupo de enzimas amplamente distribuídas que hidrolisam a ligação glicosídica entre 2 ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e a aglicona. Sua nomenclatura é baseada na especificidade do seu substrato, na configuração (α ou β) e ocasionalmente no seu mecanismo molecular. Esta classificação não reflete as características estruturais destas enzimas. A classificação das glicosidases em famílias baseadas na similaridade de sequência de aminoácidos vem sendo proposta (HENRISSAT, 1991). A degradação da cadeia de oligossacarídeos de uma glicoproteína é processada tanto por exoglicosidases como por endoglicosidases. As exoglicosidases possuem especificidade pela glicona, hidrolisando monossacarídeos expostos na extremidade redutora terminal da cadeia. As endoglicosidases, em contraste, catalisam a hidrólise de oligossacarídeos na porção interna da cadeia. A presença ou ausência desses dois tipos de enzimas (endo e exoglicosidases), pode explicar os tipos de estruturas terminais redutoras que se acumulam nos lisossomos, causando doenças em animais superiores (ARONSON & KURANDA, 1989).

A hidrólise enzimática das ligações glicosídicas acontece via uma catálise ácida que requer dois resíduos: um próton doador e um nucleófilo (DAVIES & HENRISSAT, 1995). A hidrólise ocorre por dois mecanismos: a inversão (via substituição nucleofílica) ou a retenção (mecanismo duplo de substituição com a formação de um intermediário). PIERCE e colaboradores (PIERCE *et al*, 1979), fizeram uma contribuição importante quando descreveram, em fígado de rato, endoglicosidases citossólicas e não as lisossomais normalmente encontradas. Atualmente existem vários dados na literatura sugerindo a presença de glicosidases citossólicas (revistos em HAEUW *et al*, 1991), como α -manosídes citossólicas com propriedades diferentes das lisossomais (pH, dependência de cátions). No citossol, a enzima α -manosíde age hidrolisando os resíduos de manose um a um, até uma

estrutura Man₅ GlcNac, que é idêntica à molécula precursora da biossíntese de glicoproteínas N-ligadas. A hipótese de que as glicosidases citossólicas estão envolvidas na degradação de glicoproteínas existentes no citossol ou que se acumulam no retículo endoplasmático por problemas advindos da biossíntese, está sendo aventada.

No caso específico de *T. cruzi*, as hidrolases têm sido pouco estudadas, sendo que várias, como galactosidase, glicosidase, N-acetil-beta-glicosaminidase e fucosidase nas condições experimentais empregadas não foram detectadas em tripomastigotas de cultura de tecido (STEIGER *et al*, 1979). Atividades extremamente baixas em tripomastigotas sangüícolas foram observadas (STEIGER *et al*, 1979) para as mesmas enzimas. Esses mesmos autores observaram maior atividade para fosfatases ácidas, proteinases ácidas e DNases ácidas. AVILA e colaboradores (AVILA *et al*, 1979), detectaram em epimastigotas e em pH ácidos, atividade de peptidases, glicosidases, galactosidases, manosidases e outras enzimas do metabolismo glicolítico. Não observaram atividade de α -L-fucosidase, xilosidase e fosfodiesterase alcalina. MILETTI e colaboradores (MILETTI *et al*, submetido), apesar de não conseguirem demonstrar atividade de α -L-fucosidase em condições rotineiras de mensuração de atividade, mostraram através de imunofluorescência, microscopia eletrônica e western blot sua presença em epimastigotas.

1.4.1 β -D-galactofuranosidase

As β -D-galactofuranosidases catalisam a hidrólise de resíduos de β -D-galactofuranose de glicoproteínas, glicolipídeos e polissacarídeos sendo que já foram isoladas de *Helminthosporium sacchari* (DALEY & STROBEL, 1983), *Trichoderma harzanium* (DUBORDIEU *et al*, 1985), *Penicillium sp* e *Aspergillus sp* (COUSIN *et al*, 1989) e *Aspergillus niger* (WALLIS *et al*, 2001). As enzimas purificadas de *Bacillus sp* (RAMLI *et al*, 1995) e *Penicillium oxalicum* (REYES *et al*, 1992), foram descritas

como endo-glicosidases. Só recentemente a β -D-galactofuranosidase foi catalogada, por nossa iniciativa, pela “Enzyme Commission” sob o número 3.2.1.146 (figura-5). A enzima de *P. fellutanum* (antigo *P. charlesii*) (RIETSCHEL-BERST *et al*, 1977, MILETTI *et al*, 1999) é uma glicoproteína contendo em torno de 19-22% da massa total em carboidratos.

As β -D-galactofuranosidases isoladas dos vários organismos demonstram uma variabilidade quanto à especificidade de hidrólise da ligação da galactofuranose com a cadeia rica em manoses. A endo- β -D-galactofuranosidase de *Bacillus* sp (RAMLI *et al*, 1995) hidroliza galactofuranose presente em galactofuranas com ligações $\beta(1-5)$, $\beta(1-6)$, mas não galactofuranas com ligações $\beta(1-2)$ e $\beta(1-3)$. A outra endo- β -D-galactofuranosidase descrita, de *Penicillium oxalicum* (REYES *et al*, 1992), hidrolisa preferencialmente galactofuranoses ligadas $\beta(1-5)$ (100 %) quando comparada com atividade sobre galactofuranas $\beta(1-2)$ e $\beta(1-3)$ (33 %). REYES e colaboradores (REYES *et al*, 1992) postularam também a presença de um inibidor na cultura de *P. oxalicum* que não foi caracterizado. Das exo- β -D-galactofuranosidases descritas, a enzima de *P. fellutanum* (RIETSCHEL-BERST *et al*, 1977) possui especificidade por galactofuranas $\beta(1-3)$ e a enzima de *T. harzanium* (DUBORDIEU *et al*, 1985; VAN BRUGGEN-VAN DER LUGT *et al*, 1992) por galactofuranas $\beta(1-5)$. As outras exo- β -D-galactofuranosidases, não tiveram suas especificidades determinadas até o momento.

A análise por SDS-PAGE das enzimas purificadas apresentou subunidades com massas moleculares aparentes em torno de 60-70 kDa para enzimas com especificidade $\beta(1-3)$, $\beta(1-5)$, $\beta(1-6)$ (REYES *et al*, 1992; RAMLI *et al*, 1995) e 90 kDa para *Aspergillus niger* (WALLIS *et al*, 2001).

A atividade de β -D-galactofuranosidase é inibida principalmente por íons metálicos como mercúrio, zinco (RIETSCHEL-BERST *et al*, 1977; RAMLI *et al*, 1995) e ferro (RIETSCHEL-BERST *et al*, 1977; REYES *et al*, 1992). As enzimas de *Penicillium* e *Aspergillus* possuem um pH

ótimo mais ácido (MILETTI *et al*, 1999; WALLIS *et al*, 2001), enquanto que a enzima de *Bacillus* tem um pH tendendo à neutralidade (RAMLI *et al*, 1995).

1.5 Glicoconjugados

1.5.1 Alguns aspectos da glicosilação em *T. cruzi*

A glicosilação é uma das modificações mais comuns presentes em proteínas de células eucarióticas. Apesar de vários exemplos onde a função biológica está bem definida, sua função em vários casos é indefinida. As glicoproteínas têm uma ou mais cadeias ligadas por ligações glicosídicas ao átomo de nitrogênio do grupamento amida de uma asparagina (N-ligadas), ao oxigênio da cadeia lateral da serina ou treonina (hidroxilisina no caso do colágeno) (O-ligadas) ou, como descrito mais recentemente, esterificado ao carbono do aminogruppo da etanolamina, formando a âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo que os três tipos podem ser encontrados em uma única molécula. A glicosilação é específica para determinada célula ou tecido, no que se refere à sua extensão ou tipo de ligação envolvida, como consequência direta da maquinaria de síntese celular.

A adição de carboidratos a asparagina no retículo endoplasmático durante a síntese das proteínas tem sido extensivamente estudada. O oligossacarídeo inicial é transferido em bloco de um derivado lipídico, o dolicol, para a cadeia nascente de proteína. O dolicol é um derivado contendo 10 a 13 unidades de isopreno em tripanossomatídeos, ao contrário de outras células que têm em geral de 14 a 24 unidades de isopreno. Ao dolicol são adicionadas duas moléculas de N-acetiglicosamina, 9 manoses e 3 glicoses, sendo os resíduos adicionados um de cada vez (Glc3Man9GlcNac2). As primeiras 5 manoses são em geral adicionadas como GDP manoses no lado citoplasmático e as restantes, na maioria dos organismos, como derivados de dolicol no lumen do retículo endoplasmático. No caso de *T. cruzi*, não há síntese

EC 3.2.1.146

Recommended name: β -galactofuranosidase

Reaction: Hydrolysis of terminal non-reducing β -D-galactofuranosides, releasing galactose.

Other name(s): exo- β -galactofuranosidase; exo- β -D-galactofuranosidase; β -D-galactofuranosidase

Systematic name: β -D-galactofuranoside hydrolase

Comments: The enzyme from *Helminthosporium sacchari* detoxifies helminthosporoside, a bis(digalactosyl)terpene produced by this fungus, by releasing its four molecules of bound galactose.

References:

1. Rietschel-Berst, M., Jentoft, N.H., Rick, P.D., Pletcher, C., Fang, F. and Gander, J.E. Extracellular exo- β -galactofuranosidase from *Penicillium charlesii*: isolation, purification, and properties. *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 3219-3226. [Medline UI: [77187789](#)]
2. Daley, L.S. and Strobel, G.A. β -Galactofuranosidase activity in *Helminthosporium sacchari* and its relationship to the production of helminthosporoside. *Plant Sci. Lett.* 30 (1983) 145-154.
3. Cousin, M.A., Notermans, S., Hoogerhout, P. and Van Boom, J.H. Detection of β -galactofuranosidase production by *Penicillium* and *Aspergillus* species using 4-nitrophenyl β -D-galactofuranoside. *J. Appl. Bacteriol.* 66 (1989) 311-317. [Medline UI: [89327086](#)]
4. Milletti, L.C., Marino, C., Marino, K., de Lederkremer, R.M., Colli, W. and Alves, M.J.M. Immobilized 4-aminophenyl-1-thio- β -D-galactofuranoside as a matrix for affinity purification of an exo- β -D-galactofuranosidase. *Carbohydr. Res.* 320 (1999) 176-182.

[EC 3.2.1.146 created 2001]

Figura-5 Descrição da β -D-galactofuranosidase pela “Enzyme Commission Nomenclature” da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.

de derivados de dolicol-manose. Também no caso de tripanossomatídeos se verificou que a presença de glicoses não é essencial para a transferência do oligossacarídeo para a proteína. O processamento do oligossacarídeo inicia-se pela remoção de 2 glicoses, por uma única enzima, semelhante à glicosidase II, em contraste com o processamento mais comum feito pelas glicosidases I e II encontradas em outros organismos. Verificou-se a glicolisação transiente nesta etapa, utilizando-se UDP-glicose como doador. O processamento é então completado no complexo de Golgi, a partir de estruturas com composição básica de Man₆,₇,₉GlcNAc₂, dependendo da espécie de tripanossomatídeos, enquanto que em mamíferos, a estrutura é de Man₅GlcNAc₂ (PARODI, 1993).

O *T. cruzi* não sintetiza ácidos siálicos (SCHAUER *et al*, 1983), sendo sua adição feita por uma trans-sialidase localizada na superfície externa do parasita. A trans-sialidase transfere, de moléculas doadoras, ácido siálico com ligação $\alpha(2-3)$ a resíduos terminais de β -Gal, para moléculas aceptoras, com β -Gal terminal ligado como $\beta(1-4)$, $\beta(1-6)$ ou $\beta(1-3)$ (COLLI, 1993) e não por um nucleotídeo dependente de sialiltransferase (CROSS & TAKLE, 1993). SCHENKMAN e colaboradores (SCHENKMAN *et al*, 1991) demonstraram que o epitopo Ssp-3 da forma tripomastigota, reconhecido por um anticorpo monoclonal 3C9, envolvido na adesão do parasita à célula hospedeira, é um acceptor importante de ácido siálico neste estágio do parasita. A adição de resíduo de α -L-fucose, na galactose acceptora ou próxima a ela, impede a atividade da trans-sialidase (VANDEKERCKOVE *et al*, 1992).

1.5.2 Glicoconjugados de *T. cruzi* contendo β -D-galactofuranose

Evidências foram sendo acumuladas a partir do final da década de 70, sugerindo o envolvimento de carboidratos na invasão da célula hospedeira pelo *T. cruzi* (revisto por ZINGALES & COLLI, 1985), o que

levou vários laboratórios a estudarem glicoconjugados de superfície, com maior ênfase em glicoproteínas. O *T. cruzi* possui uma superfície densa e contínua, com uma camada de glicosilfosfatidilinosíteis tipo 1, GIPLs, para *T. cruzi* é a denominação recente de LPPG, (PREVIATO *et al*, 1990; LEDERKREMER *et al*, 1991) e uma família de mucinas (SCHENKMAN *et al*, 1993; PREVIATO *et al* 1995; ACOSTA-SERRANO *et al*, 1994) que se projetam acima dos GIPLs.

Glicolípídios, de maneira geral, têm sido menos estudados. Além da LPPG (ver abaixo), foram descritos sialoglicolípídios, lipídios sulfatados em epimastigotas (PETRY *et al*, 1987) e tripomastigotas (UHRIG *et al*, 1992), glicolípídios neutros (BARRETO-BERGTER *et al*, 1992) e (GIPLs) glicoinositolfosfolípídios (HEISE *et al*, 1996). Um resumo dos glicoconjugados, modificado de TRAVASSOS & ALMEIDA (1993), é mostrado na tabela-3.

Em *T. cruzi* o estudo mais aprofundado do metabolismo da β -D-galactofuranose, é importante pois a β -D-galactofuranosidase deve desempenhar um papel importante no “turn over” da LPPG, durante a metaciclogênese.

1.5.3. LPPG (lipopeptidíofosfoglicana)

A lipopeptidíofosfoglicana (LPPG) (figura-6), extremamente abundante na superfície de epimastigotas (2×10^7 moléculas/epimastigota), foi descrita pela primeira vez em 1975 (ALVES & COLLI, 1975), sendo o primeiro glicoinositolfosfolípídio (GIPL) a ser isolado em tripanossomatídeos (LEDERKREMER *et al* 1976, 1980). A LPPG também é encontrada em tripomastigotas metacíclicos, embora em menor quantidade e somente em 15% da população (GOLGHER *et al*, 1993). Sua identidade como glicoinositolfosfoceramida foi descrita (LEDERKREMER *et al*, 1977) e sua estrutura determinada (PREVIATO *et al*, 1990; LEDERKREMER *et al*, 1991). A LPPG consiste de uma cadeia de carboidratos ligada a um inositol-fosfoceramida via uma glicosamina não acetilada. Devido à sua heterogeneidade

Tabela-3 Principais glicoconjugados de *Trypanosoma cruzi*

Gliconjugado	Estágio de desenvolvimento	Propriedades biológicas	Referências
gp120-220 SAPA (165-205 kDa)	tripomastigota	α (2-3)-trans-sialidase; neuraminidase; detecção de infecção aguda.	(1), (2), (3), (4)
Ssp-3 (100-200 kDa)	tripomastigota	Aceptor de ácido siálico; mAb inibe a aderência do parasita.	(3), (5)
gp160 (gp 70)	tripomastigota metacíclico	Seqüência homóloga com DAF; liga C3b e inibe a convertase.	(6), (7)
gp87-93	tripomastigota metacíclico	Acelera o decaimento da C3- convertase.	(8)
gp90 (mAb Ig 7)	tripomastigota metacíclico	mAb inibe adesão e penetração; protege contra infecção.	(9), (10), (11)
gp85-90, Tc-85	tripomastigota	Adesão e penetração; mAb inibe infecção; seqüência de neuraminidase.	(12), (13) (14), (15), (16)
Ssp-4 (70-84 kDa) gp72 (mAbWiC29.26)	amastigota epimastigota	Marcador de diferenciação mAb inibe metaciclogênese; acceptor de C3, protege contra infecção.	(17) (18), (19)
gp68	tripomastigota	Liga a fibronectina e colágeno; inibe a união de C3 convertase	(20)
gp60	epimastigota	Cisteína proteinase.	(21)
gp57/51 (gp25)	epimastigota tripomastigota	Cisteína proteinase; antígeno de diagnóstico.	(22), (23), (24), (25).
gp35-50 (mAb 10D8)	tripomastigota metacíclico	Aceptor de ácido siálico; adesão e penetração; seqüência de neuraminidase.	(26)
LPPG	epimastigota	Antígeno imunogênico. Galf β (1-3) inibe invasão celular.	(27), (28), (29)
Glicolipídios sulfatados	epimastigota	Reação cruzada com tecidos de mamíferos.	(30), (31)
GIPLs	epimastigota	Imunogênico no homem.	(32)
CMH, CDH	epimastigota	Imunogênico com ácidos graxos 2-hidroxilados.	(33)
α Galp-(1-3) de glicoconjugados	tripomastigota metacíclico	Alvo principal de anticorpos líticos.	(34) e (35)
gp82 (mAb 3F6)	tripomastigota metacíclico	Inibe invasão.	(36)

Referências: (1) Ortega-Barria et al, 1992; (2) Polevick et al, 1991; (3) Schenkman et al, 1991; (4) Schenkman et al, 1992; (5) Andrews et al, 1987; (6) Norris et al, 1989; (7) Norris et al, 1991; (8) Joiner et al, 1988; (9) Gonzalez et al, 1991; (10) Teixeira et al, 1986; (11) Yoshida et al, 1990; (12) Alves & Colli, 1975; (13) Kahn et al, 1991; (14) Katzin et al, 1983; (15) Ouassi et al, 1990; (16) Zingales & Colli, 1985; (17) Andrews et al, 1988; (18) Sher & Snary, 1982; (19) Snary, 1983; (20) Fisher et al, 1988; (21) Cazzulo et al, 1990; (22) Mendonça-Previato et al, 1983; (23) Murta et al, 1990; (24) Scharfstein et al, 1985; (25) Scharfstein et al, 1986; (26) Yoshida et al, 1989; (27) Arruda et al, 1989; (28) Lederkremer et al, 1991; (29) Previato et al, 1990; (30) Petry et al, 1987; (31) Petry et al, 1988; (32) Avila et al, 1991; (33) Barreto-Bergter et al, 1992; (34) Almeida et al, 1991; (35) Gazzinelli et al, 1991; (36) Ramirez et al, 1993.

Figura-6 Estrutura da LPPG da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.

A seta mostra a posição das galactofuranoses terminais.

(LEDERKREMER *et al*, 1991), pode ser dividida em 3 espécies que possuem pequenas variações na estrutura de carboidratos com respeito à galactofuranose terminal. Um dos grupos (65 %) possui duas galactofuranoses terminais ligadas β (1,3) Man (1,2) Man, enquanto que os outros dois grupos possuem apenas uma galactofuranose terminal (figura-7). Além das manoses e galactofuranose, a estrutura de carboidratos contém 2-amino-etilfosfonato (2-AEP). O componente lipídico é, como já dito anteriormente, um inositol-fosfoceramida contendo predominantemente palmitoilesfinganinas, palmitoilesfingosinas e lignoceroilesfinganinas. É considerada um membro da família da GPIs pela presença de uma Man(α 1,4) Glc(1,6 *myo*-inositol-1-PO₄). Estudos dos inositóis fosfolipídios (IPLs) de *T. cruzi*, demonstraram que os IPLs são os precursores para síntese de GPIs como a LPPG (LEDERKREMER *et al*, 1990; BERTELLO *et al*, 1995).

A função da LPPG *in vivo* é desconhecida. Foi descrita sua atividade de bloqueio de ativação de células T, possivelmente devido ao componente de ceramida (GOMES *et al*, 1995; LOPES & DOS REIS, 1996). Seu papel na adesão de formas epimastigotas ao trato digestivo do triatomíneo e seu papel na metaciclogênese está sendo investigado no momento (W. Colli, comunicação pessoal), o que sugeriria um mecanismo muito parecido com o descrito para a interação entre *Leishmania* e o seu vetor, flebótomo (PIMENTA *et al*, 1994).

1.5.4 Mucinas

As mucinas de *T. cruzi* foram isoladas inicialmente em um extração água-fenol, sendo denominadas bandas A,B,C (ALVES & COLLI, 1975; LEDERKREMER *et al*, 1976). São estruturas ricas em resíduos de treonina, serina e prolina densamente O-glicosiladas, seguidas de 1 a 5 resíduos de galactose. A estrutura dos oligossacarídeos O-ligados é conservada entre os epimastigotas e os tripomastigotas metacíclicos. Existe certo polimorfismo entre as

Figura-7 Microheterogeneidade da LPPG encontradas em epimastigotas de *T. cruzi*.

Os números em parênteses referem-se às quantidades relativas encontradas (Retirado de LEDERKREMER & COLLI, 1995).

diferentes cepas (por exemplo, como na presença de galactofuranose na cepa G, ao invés de galactopirranose como a cepa Y). Variações no número de cadeias oligossacarídicas dependentes da cepa do parasita analisada foram também descritas (PREVIATO *et al*, 1994). As mucinas são abundantes na superfície do parasita, sendo estimadas em 3×10^6 moléculas por epimastigota e $1,5 \times 10^6$ por tripomastigota metacíclico. Dois grupos de mucinas têm sido identificados. As glicoproteínas do grupo 1 têm de 35-50 kDa e são expressas em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. As do grupo 2 são glicoproteínas de 80-200 kDa que são expressas em tripomastigotas isolados de cultura de tecidos (ALMEIDA, 1994; revisto por GUHA-NYYOGI *et al*, 2001). Mucinas são, em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos, as principais acceptoras de α -2,3-ácido siálico (PREVIATO *et al*, 1985; YOSHIDA *et al*, 1989; SCHENKMAN *et al*, 1993) e em amastigotas, são as moléculas contendo o epitopo Ssp-4 (ANDREWS *et al*, 1988).

A sialização das mucinas parece conferir uma habilidade para que o parasita possa sobreviver aos diferentes meio-ambientes, isto porque reduz a suscetibilidade dos parasitas contra os anticorpos anti-gal presentes nos mamíferos. (PEREIRA-CHIOCOLOLA *et al*, 2000) e em pacientes com doença de Chagas (ALMEIDA *et al*, 1991). A presença de β -D-galactofuranose nessas glicoproteínas O-ligadas é uma importante informação para ação do respectivo anticorpo. A sialização também forma uma barreira contra outros agentes líticos, como promove aderência aos macrófagos (de DIEGO *et al*, 1997) e modula a produção de NO e citocinas (de DIEGO *et al*, 1997; CAMARGO *et al*, 1997).

A estrutura de âncoras de GPI das mucinas contém sn-1-Alquil-2-acilglicerol, e mais de 70 % das mucinas de metacíclicos contêm ceramidas (ACOSTA-SERRANO *et al*, 1995). ALMEIDA e colaboradores (ALMEIDA *et al*, 2000) demonstraram a relação entre as âncoras de GPI de mucinas dos tripomastigotas isolados de culturas de tecido com a indução de NO, IL-2 e TNF- α . Essa âncora contém ácidos graxos

insaturados na posição sn-2 do componente glicolípido (revisto por FERGUSON, 1997).

Duas famílias gênicas de mucinas têm sido descritas, a TcMUC, que possui regiões conservadas 5' e 3', respectivamente, o peptídeo sinal e a seqüência putativa para ligação a âncora de GPI. Entre elas encontra-se uma região variável na qual encontram-se os motivos para a O-glicosilação e as seqüências que expõem os epitopos reconhecidos por soro de camundongos (POLLEVICK *et al*, 2000). A segunda família é a TcSMUG que não apresenta regiões variáveis e que algumas evidências sugerem codificar para mucinas encontradas em epimastigotas (Di NOIA *et al*, 2000).

2. OBJETIVOS

1. Desenvolvimento de um novo procedimento para a purificação da β -D-galactofuranosidase de *Penicillium fellutanum*.
2. Detecção da β -D-galactofuranosidase de *T.cruzi* usando anticorpos policlonais produzidos contra a β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*.
3. Semi-purificação da β -D-galactofuranosidase de *T.cruzi*. Detecção de sua atividade sobre a LPPG (lipopeptidofosfoglicana).
4. Tentativa de clonagem ou isolamento do gene da β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Penicillium fellutanum*

3.1.1 Cultivo do fungo *P. fellutanum*

Cultura de manutenção

Esporos de *Penicillium fellutanum* (antigo *P. charlesii*), gentilmente cedidos pelo Dr. John E. Gander do Depto de Microbiologia da Universidade da Flórida, foram cultivados em placas de Petri contendo meio de CZAPEK-DOX enriquecido com glicose a 5% (PRESTON & GANDER, 1968). As placas foram mantidas à temperatura ambiente e após 7 a 10 dias com o crescimento dos micélios e o aparecimento de esporos, foi feito o repique (PRESTON & GANDER, 1968).

Cultura para obtenção da enzima

Conforme descrito em trabalhos anteriores (RIESTSCHEL-BERST *et al*, 1977; PLETCHER *et al*, 1981), a β -D-galactofuranosidase é excretada pelo fungo no meio extracelular quando o mesmo é cultivado em meio líquido de Raulim-Thom (CLUTERBUCK *et al*, 1932 e 1934), à temperatura de 18-24°C, sob luz constante e agitação de 300 rpm por 20 a 30 dias (RIESTSCHEL-BERST *et al*, 1977). No 4º dia após o inóculo, adiciona-se ao meio de cultura $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 7,5 mM, o que leva a um aumento da atividade da enzima. A adição de inibidor de proteases foi feita um dia antes da utilização da cultura como fonte de enzima (PLETCHER *et al*, 1981).

3.1.2 Purificação enzimática

Método-1

Este método foi baseado na purificação da enzima de *P. oxalicum* (REYES *et al*, 1992)

O filtrado obtido da cultura de *P. fellutanum* em meio líquido foi concentrado 10x em Amicon a 25°C, obtendo-se um volume final de 7,5 ml, que foram cromatografados em coluna de Sephadex G-200 (2,5 cm x 90 cm), equilibrada com tampão fosfato de sódio 14 mM, pH 6,5. Frações de 3,0 ml foram coletadas. As frações com maior atividade foram liofilizadas, filtradas através de uma coluna de Fast-Desalting (Amersham Pharmacia Biotech) e então submetidas a cromatografia em coluna de troca iônica Mono Q HR 5/5 (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com 10 mM de tampão fosfato de sódio. A enzima foi eluída em um gradiente de NaCl de 0-0,5 M.

O eluído foi cromatografado em uma coluna de filtração de gel Superose 6 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,2 contendo NaCl 150 mM. A fração obtida foi dialisada contra água por 16-18 horas a 4°C e liofilizada.

Método-2

Ao filtrado da cultura de *P. fellutanum* foi adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para uma concentração de 30 %, deixando-se por 1 hora sob agitação a 4 °C. A solução foi então centrifugada por 30 minutos a 10.000 g a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado mais sulfato de amônio para se obter uma fração precipitada com 80 %.

Os precipitados formados foram ressuspensos em tampão fosfato 66 mM e dialisados contra tampão fosfato 14 mM, pH 7,0 por 24 horas com três trocas.

O precipitado de 30-80 % de sulfato de amônio dialisado foi adicionado à coluna de troca iônica DEAE-Sepharose Cl 6B (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com 10 mM de tampão acetato de sódio. A enzima foi eluída em um gradiente de NaCl de 0-0,5 M.

O eluído foi então cromatografado em uma coluna de afinidade para β -D-galactofuranosidase, que consiste de um p-aminotiofenil- β -D-galactofuranosídeo acoplado a Sepharose comercial, equilibrado com 20 ml de tampão acetato 66 mM pH 5,0, com NaCl 0,1 M. A enzima foi eluída com ácido D-galactônico- γ -lactona 10 mM. A fração ativa eluída foi dialisada em tampão fosfato 10 mM e concentrada por ultrafiltração, usando membrana de "cut off" 10.000 MW

Para verificar a natureza glicoprotéica da enzima, o eluído da coluna de afinidade foi cromatografado em uma coluna de Concanavalina-A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com NaCl 0,5 M em Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; $MnCl_2$ 1 mM; $CaCl_2$ 1 mM. Foram incubadas o correspondente a três unidades de atividade enzimática com a resina por 1 hora, lavou-se a coluna com 30 ml do mesmo tampão e eluiu-se o material retido com 10 ml de metil α -D-glucopiranosídeo 0,1 M e metil α -D-manopiranosídeo 0,1 M (Sigma). Foram coletadas frações de 1 ml e 100 μ l de cada fração foram empregados para a dosagem da atividade enzimática.

3.1.3 Dosagem da atividade enzimática

Para a dosagem da atividade de β -D-galactofuranosidase utilizou-se o substrato específico *p*-nitrofenil-galactofuranosídeo (VARELA *et al*, 1986). A atividade de exo- β -D-galactofuranosidase foi medida utilizando-se 62 μ l de *p*-nitrofenil-galactofuranosídeo 5 mM, 100 μ l de tampão acetato 66 mM pH 4,0 e a fonte de enzima para um volume final de 0,5 ml. Após 1 hora a 37°C, a reação é parada com a adição de 1 ml de Na_2CO_3 0,25 M- $NaHCO_3$ 0,25 M. A quantidade de *p*-nitrofenol formada foi estimada pela absorbância a 410 nm. Nos cálculos para a obtenção da concentração de produto liberado utilizamos um coeficiente de

absortividade molar para o p-nitrofenol de 17800 l/mol x cm. Uma unidade enzimática foi definida como 1 μ mol de p-nitrofenol formado por minuto.

No experimento para identificar inibidores da β -D-galactofuranosidase, adicionaram-se diferentes compostos ao ensaio em diferentes concentrações: tiobenzil- β -D-galactofuranosideo, tiofenil- β -D-galactofuranosideo, isopropil- β -D-tiogalactofuranosideo, n-propil- β -D-tiogalactofuranosideo, sintetizados pela Dra Carla Marino (Universidade de Buenos Aires), além de ácido D-galactônico- γ -lactona (Sigma) adquirido comercialmente.

3.1.4 Preparo da amostra para obtenção de anticorpos

Extrato de *Penicillium fellutanum*

Micélios de *P. fellutanum* foram obtidos na filtração do meio de cultura. Foram lavados 3 vezes com NaCl 0,9 %, sendo então incubados com tampão de lise (Tris 50 mM pH7,4; Nonidet P40 a 1%; TLCK 1mM, PMSF 1mM). O extrato obtido foi homogeneizado em vortex, sonificado por 5 minutos em pulsos de 1 minuto e centrifugado a 5.000 g por 10 minutos. O sobrenadante (1,32 mg/ml) foi utilizado para o inóculo nos camundongos por via intraperitoneal.

β -D-galactofuranosidase

A enzima β -D-galactofuranosidase obtida de *Penicillium fellutanum* foi seca em “speed vac” e ressuspensa em periodato de sódio 10 mM pH 5,0 por 1 hora, à temperatura ambiente, no escuro. Após a secagem a amostra foi ressuspensa em 1 ml de tampão acetato de sódio 50 mM, seca-se novamente e ressuspende-se em borohidreto de sódio 50 mM por 30 minutos à temperatura ambiente. Dializou-se a amostra contra água bidestilada e aplicou-se em gel de SDS-PAGE a 9 % para análise. Após SDS-PAGE, foi identificado o polipeptídeo correspondente à

proteína por coloração com Coomassie Brilliant Blue (Sigma). A banda correspondente à proteína de massa molecular 70 kDa, foi cortada e colocada em um graal de porcelana com 500 µl de PBS para ser triturada. Transferiu-se a solução para um tubo adequado e sonicou-se com pulsos de 30 segundos por um tempo total de 3 minutos. Adicionou-se a mesma quantidade de adjuvante de Freund e repetiu-se a sonicação.

Um lote de 10 camundongos fêmeas da linhagem Balb/c foi imunizados com β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*. Os anticorpos foram obtidos mediante quatro inóculos de aproximadamente 5 a 10 µg de proteína por inóculo/semana. O antígeno foi aplicado intraperitonealmente, homogeneizado com adjuvante de Freund completo (Sigma) no primeiro inóculo e com adjuvante de Freund incompleto (Sigma) para os inóculos subsequentes.

Uma semana após o último inóculo, foram retiradas amostras de sangue, que foram utilizadas na reação de imunofluorescência indireta contra o *P. fellutanum*, para verificar a reatividade dos anticorpos policlonais produzidos.

3.1.5 Obtenção e seqüenciamento de peptídeos

A β -D-galactofuranosidase purificada foi analisada quanto à sua pureza em um gel de SDS-PAGE. A banda correspondente à proteína foi cortada e enviada para o serviço de seqüenciamento da Universidade de Yale-EUA. A proteína foi submetida a digestão com tripsina e análise por cromatografia líquida seguida de espectroscopia de massa de captura de íons. Os peptídeos obtidos foram separados por cromatografia de gel filtração e 3 picos do cromatograma (65, 73, 101) foram submetidos ao seqüenciamento por degradação de Edman.

3.1.6 Síntese de peptídeos

A seqüência dos peptídeos foi obtida como descrito anteriormente.

Os peptídeos foram sintetizados no Serviço de síntese de peptídeos em pequena escala da Universidade de Yale (peptídeos 73 e 101) ou no laboratório do Prof Dr. Luis Juliano –UNIFESP, pela técnica da síntese em fase sólida, utilizando-se como grupo protetor o Fmoc.

3.1.7 Anticorpos anti-peptídeos de β -D-galactofuranosidase

Para a obtenção de anticorpos, os peptídeos sintetizados foram ligados ao KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) de acordo com instruções do fabricante (PIERCE).

2 mg de KLH ativado e dissolvido em 200-500 μ l de tampão foram misturados com o peptídeo solubilizado em DMSO 10%. A mistura foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente e dialisada.

Um lote de 10 camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, imunizadas com cada um dos peptídeos (73 e 101) de β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*. Os anticorpos foram obtidos mediante quatro inóculos intraperitoneais de aproximadamente 100 μ g de peptídeo por inóculo/animal/semana. O antígeno, homogeneizado com adjuvante de Freund completo no primeiro inóculo e com adjuvante de Freund incompleto nos inóculos subsequentes foi aplicado intraperitonealmente.

Uma semana após o último inóculo, foram retiradas amostras de sangue, que foram utilizadas na reação de imunofluorescência indireta contra o *P. fellutanum*, para verificar a reatividade dos anticorpos policlonais produzidos.

3.1.8 Desenho dos oligonucleotídeos

A partir da seqüência dos aminoácidos nas regiões menos variáveis dos peptídeos sequenciados e do “codon usage” de *Penicillium*

sp., desenharam-se as seqüências dos oligonucleotídeos. Em cada caso, na seqüência “forward” foi introduzido um sítio de restrição para *BamH* I (65F, 73F, 101F) e na “reverse” um sítio de restrição para *EcoR* I (65R, 73R, 101R). Além disso foram sintetizadas as seqüências correspondentes ao peptídeo inteiro para serem utilizadas como sondas (65H, 73H, 101H).

3.1.9 Extração de DNA de *P. fellutanum*

Aproximadamente 2 g de micélio de *P. fellutanum* foram trituradas em um homogenizador na presença de N₂ líquido. A massa resultante foi ressuspensa numa solução contendo Tris-Cl 200 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, EDTA 10 mM, espermidina 4 mM, β-mercaptoetanol 10 mM e SDS 1 %, deixando-se a solução em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se proteinase K (20 µg/ml) e incubou-se a mistura a 37°C por 30 minutos. Após a centrifugação a 3.500 g por 20 minutos, o sobrenadante foi tratado com fenol tamponado (pH 8), com fenol-clorofórmio e com clorofórmio. O DNA foi precipitado na presença de 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol a 100 %. Após a centrifugação a 10.000 g por 30 minutos, lavou-se o precipitado com etanol a 70 % e ressuspendeu-se o DNA em TE com RNase (20 µg/ml).

3.1.10 Extração de RNA total e RNA mensageiro de *P. fellutanum*

Aproximadamente 3 g de micélio de *P. fellutanum* foram triturados em almofariz na presença de N₂ líquido e transferidos para um tubo contendo isotiocianato de guanidina 4 M. Após a adição de β-mercaptoetanol a 1 %, homogeneizou-se o material em vortex, deixando-se então a solução em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro. A seguir centrifugou-se o material a 5.000 g por 15 minutos.

Em tubos de ultracentrífuga contendo 1,5 ml de CsCl 5,7 M/ EDTA 10 mM pH 7,5, adicionou-se o sobrenadante da extração anterior

e o material foi centrifugado a 100.000 g por 24 horas a 18 °C. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante, lavou-se o precipitado com etanol a 70 % e ressuspendeu-se o RNA total com água tratada com dietilpirocarbonato 2 % (Sigma) a 65°C.

O RNA mensageiro foi isolado utilizando-se oligo-dt, seguindo o protocolo descrito no kit Message Maker® Gibco.

3.1.11 Amplificação, isolamento, clonagem e seqüenciamento

Seis oligonucleotídeos, rearranjados dois a dois (65F/73R; 65F/101R; 73F/65R; 73F/101R; 101F/65R E 101F/73R), foram utilizados para a amplificação. A reação de amplificação foi feita por PCR, usando-se como molde o DNA total de *P. fellutanum* (1µl: 530 ng/µL), “primers” (50 pmoles), dNTP (0,2 mM de cada), tampão para PCR (Tris·Cl 10 mM, pH 9, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM) e *Taq* DNA polimerase (2,5 U) para um volume de reação de 50 µl. As condições de amplificação foram a) desnaturação a 94°C (1 min); b) hibridação a 50 a 62°C (1 min) e c) extensão a 72°C (2 min). Os produtos da reação foram separados em gel de agarose e a sua purificação foi feita mediante solubilização da agarose a 65°C, seguido de extração com o kit (GFX™ PCR DNA and gel Band Purification, Amersham Pharmacia Biotech).

O DNA obtido foi subclonado no vetor pUC-19 (Amersham Pharmacia Biotech) previamente digerido com as enzimas *Bam*H I e *Eco*R I. Parte da ligação do inserto no vetor, foi transformada em *E.coli* cepa DH5α, por eletroporação. As colônias brancas resultantes da transformação foram separadas, crescidas em 3 ml de meio LB com 30 µg/ml de ampicilina (Sigma), sendo incubadas a 37°C durante a noite, sob agitação.

A seguir, as mini-preparações de DNA plasmidial foram feitas basicamente pelo método da lise alcalina, utilizando-se, porém, o sistema de extração e purificação de DNA de plasmídeo “FlexiPrep” (Amersham Pharmacia Biotech). As preparações obtidas, ressuspensas em TE, foram tratadas com *Bam*H I e *Eco*R I e os produtos separados

em gel de agarose a 1,2 %, visando identificar a presença do inserto em clones recombinantes.

Os clones positivos foram sequenciados pelo método da cadeia de terminação do dideoxinucleotídeo, usando o seqüenciamento automático (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing, PE-Applied Biosystems).

3.1.12 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

A técnica de RACE consiste na síntese da "First Strand cDNA", utilizando-se como molde RNA Total. Foram sintetizados 2 tipos de "First Strand", um deles utilizando o primer 5'-CDS e outro 3'-CDS. Após a síntese os cDNAs produzidos foram utilizados como molde na amplificação por PCR utilizando os primer específicos (65R, 73R, 101R, 65F, 73F, 101F) para cada reação e o primer universal (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT- 3') em um ciclo de 50 x (94°C 5s, 68°C 10s 72°C 3 min).

3.2 *Trypanosoma cruzi*

3.2.1 Cultivo de células de cultura de tecido

Células epiteliais de rim de macaco Rhesus (*Macaca mulata*), LLC-MK₂ foram cultivadas em meio DME (Sigma) contendo 10% de soro fetal bovino, mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, sendo expandidas após digestão com 0,1% de tripsina (ANDREWS & COLLI, 1982).

3.2.2 Obtenção dos parasitas

Formas epimastigotas do *T. cruzi* clone CL 14 (BRENER & CHIARI, 1963), cepa Y e cepa G foram cultivadas em meio LIT (CAMARGO, 1964; CASTELLANI *et al*, 1967) sendo mantidas à temperatura de 28°C. Após um inóculo inicial de 2 x 10⁷ parasitas/ml, o cultivo foi mantido por 3 a

4 dias até o início da fase estacionária de crescimento. Após o crescimento foram observados ao microscópio para verificar sua viabilidade e contados em um hematocítômetro (câmara de Neubauer).

Formas tripomastigotas foram obtidas do sobrenadante de cultura de células LLC-MK₂ (frascos de 75 ml) previamente infectadas com 3×10^7 a 5×10^7 parasitas.

Antes de sua utilização os parasitas foram centrifugados a 4.000 g por 15 minutos, sendo o precipitado lavado 3 vezes com NaCl 0,9 % (epimastigotas) e com DME (tripomastigotas).

O extrato foi obtido pela lise de 8×10^9 parasitas em tampão de lise (Hepes 10mM, EGTA 1 mM, NaHCO₃ 0,5 mM, DTT 0,5 mM, TLCK 0,1 mM e leupeptina 1 µg/ml), seguido de pulsos de ultra-som de 10 s. Este material foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos, sendo o sobrenadante usado como fonte de enzima.

A porção enriquecida de membranas foi obtida como descrito acima, sendo o sobrenadante centrifugado a 100.000 g por 1 hora. O precipitado obtido foi ressuspensão novamente em tampão de lise e centrifugado mais uma vez nas mesmas condições. Após a segunda centrifugação, o precipitado foi ressuspensão em tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, PMSF 100 µg/ml, TLCK 100 µg/ml e leupeptina 2,5 µg/ml).

3.2.3 Marcação de epimastigotas com ³⁵S-metionina

Cerca de 2×10^9 epimastigotas foram lavados 3 vezes com PBS e então incubados em meio DME sem metionina por 30 minutos a 28°C. Em seguida foram adicionados 200-300 µCi de ³⁵S-metionina e os parasitas incubados novamente a 28°C por 2 horas e 30 minutos. Após 3 lavagens com PBS, os parasitas foram lisados com tampão de lise (Hepes 10mM, EGTA 1 mM, NaHCO₃ 0,5 mM, DTT 0,5 mM, TLCK 0,1 mM e leupeptina 1 µg/ml) seguida de centrifugação a 10.000 g por 10 minutos.

3.2.4 Marcação de epimastigotas com ácido palmítico tritiado (Pal³H)

Epimastigotas foram centrifugados e incubados em meio TAU-3AG condicionado com 0,2 % de soro fetal bovino. Após 6 horas a 28°C, adiciona-se o ácido palmítico radioativo (30 a 40 μ Ci/ml). A incorporação foi feita por 17 horas a 28°C sob agitação e os parasitas separados por centrifugação foram lavados com PBS por 2 vezes.

3.2.5 Extração de DNA genômico de *T. cruzi*

1x 10⁹ epimastigotas foram ressuspensos em 1 ml de solução contendo NaCl 150mM, EDTA 100mM, Tris 10mM, pH 8,0, lauril sarcosinato de sódio a 0,5% e RNase A (livre de DNases) a 10 μ g/mL e deixados em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Os parasitas foram lisados e incubou-se a suspensão celular com proteinase K a 100 μ g/ml a 50°C por 30 minutos, com agitação esporádica. Após este período, o DNA foi extraído adicionando-se igual volume de fenol pH 8,0 sob agitação por 5 minutos e a fase aquosa foi separada por centrifugação (5.000 g / 5 min). A extração fenólica foi repetida duas vezes, verificando-se a ausência de proteína na interface. Após extração com clorofórmio, as preparações de DNA foram dialisadas contra TE a 4°C e, em seguida, tratadas com RNase (100 μ g/ml) para hidrolisar o RNA remanescente.

3.2.6 Extração de RNA de *T. cruzi* e síntese de cDNA

Os parasitas (10⁹/mL) foram centrifugados para remoção do meio de cultura e lisados em soluções monofásicas de fenol e de isotiocianato de guanidina (TRIZOL® Reagent, Gibco BRL).

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita a partir de RNA total (5 μ g) da forma epimastigota de *T. cruzi*, usando-se o oligo *Not I*-d(T)₁₈ como oligonucleotídeo de extensão numa reação catalisada pela

transcriptase reversa (First Strand® cDNA Synthesis kit, Amersham Pharmacia Biotech)

3.2.7 Biblioteca de cDNA de *Trypanosoma cruzi*

A biblioteca de cDNA de *T. cruzi* (λ ZAP Express) foi gentilmente cedida pelo Prof. J.E. Manning da Universidade da California-Irvine-EUA.

A bactéria *E. coli* XL1BLUE MRF' foi cultivada durante a noite em meio LB com 0,2 % (p/v) de maltose e MgSO_4 10 mM centrifugada e ressuspensa em MgSO_4 10 mM para uma $A_{600}=2,0$. Para a titulação foram feitas diluições seriadas em SM da solução de fagos original. Cada amostra foi incubada por 15 minutos a 37°C com 200 μl da suspensão de *E. coli* XL1BLUE MRF'. Em seguida, cada amostra foi misturada com 3 ml de top agarose pré-aquecido a 48°C e despejada sobre placas de Petri contendo 25 ml de LB ágar. Após a solidificação, as placas foram incubadas na posição invertida a 37°C por cerca de 18 horas. A placa contendo um número entre 50 e 500 placas de lise foi selecionada para contagem. O título foi determinado a partir da razão entre o número de placas formados/volume semeado multiplicado pelo fator de diluição.

A biblioteca de λ ZAP Express foi semeada com uma densidade de 3.000 unidades formadoras de colônia por placa de Petri de 85 mm. Os fagos diluídos em SM, foram incubados com 200 μl de uma suspensão de *E. coli* XL1BLUE MRF' ($A_{600}=2,0$) a 37°C por 15 minutos. Em seguida o material foi misturado com 3 ml de LB top ágar pré-aquecido a 48°C e despejada sobre placas de Petri contendo 25 ml de LB ágar. As placas foram incubadas a 42°C até o surgimento das primeiras placas de lise (cerca de 4 horas) e transferidas para uma estufa a 37°C. Nesse momento foram colocados sobre as placas filtros de nitrocelulose impregnados com IPTG 10 mM, procedendo-se a incubação por 3 horas. Repetiu-se a incubação com os novos filtros por 2 horas. O bloqueio da nitrocelulose foi feito em tampão TBS 50 mM-leite Molico 3 % (p/v), pH

8,0 por 60 minutos à temperatura ambiente, com lavagens subsequentes em TBS 50mM-Tween 20 0,03 % (v/v), pH 8,0. Em seguida, adicionou-se o soro em TBS 50mM-Tween 20 0,03 %-Triton X-100 0,05 % (v/v), pH 8,0, mantendo-se a 4°C por 16-18 horas. A nitrocelulose foi lavada seqüencialmente com: TBS 50 mM pH 8,0, TBS 50mM-Tween 20 0,03% (v/v), pH 8,0 e TBS 50 mM, pH 8,0 por 5 a 10 minutos cada lavagem à temperatura ambiente. Repetiu-se o bloqueio como descrito anteriormente. Acrescentou-se, como segundo anticorpo, anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina, diluído em tampão de bloqueio, deixando-se à temperatura ambiente por 2 horas. Lavou-se com TBS 50mM-Tween 20 0,03 % (v/v), pH 8,0 por 30 minutos e adicionou-se a solução de revelação NBT/BCIP.

3.3 Outras técnicas

3.3.1 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita, em duplicata, através do método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se albumina bovina como padrão (Bio Rad Laboratories).

3.3.2 Determinação do conteúdo de carboidrato

A dosagem de carboidratos neutros totais foi feita pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956).

3.3.3 Eletroforese em gel de SDS-PAGE

O método utilizado de eletroforese vertical de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi descrito por LAEMMLI (1970). Em cada canaleta aplicou-se sempre aproximadamente 30 µg de proteína. A separação foi feita em gel na concentração de 9,0 % de poliacrilamida e o gel de empilhamento foi preparado na concentração

de 3% de poliacrilamida. As alíquotas a serem analisadas foram secas em “speedvac” por 2 horas e solubilizadas em tampão de amostra, (Tris-HCl pH 6,8, glicerol 38 % (v/v), EDTA 0,2 M, SDS 20 % (v/v), β -mercaptoetanol 4 % (v/v) e azul de bromofenol), aquecidas a 100°C por 2 minutos, centrifugadas em microcentrífuga por 2 minutos, sendo então aplicadas nas canaletas do gel de empilhamento.

O desenvolvimento eletroforético foi feito à amperagem constante de 30 mA até que o corante de acompanhamento (azul de bromofenol) atingisse 1 cm da extremidade inferior do gel. Em seguida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue (Sigma), segundo PETERSON (1983). Os padrões de alta massa molecular Rainbow™ (Amersham Pharmacia Biotech) ou alta massa molecular (Sigma) foram utilizados. A coloração de Schiff (FAIRBANKS *et al*, 1971) foi utilizada quando necessário, para confirmar a presença de carboidratos na estrutura da proteína.

3.3.4 Eletroeluição

Após a visualização da proteína no gel de SDS-PAGE, a banda correspondente foi cortada e colocada no aparato de eletroeluição (Bio-Rad Laboratories). A eletroeluição consiste na colocação da banda em um tubo contendo tampão de eletroforese, que na extremidade inferior possui uma membrana de “cut off” conhecido, com a passagem da proteína do gel para o reservatório abaixo da membrana, pela aplicação de uma corrente de 10 mA por 4 horas.

3.3.5 PAGE não denaturante

A eletroforese em condições não denaturantes foi feita basicamente nas condições descritas para a eletroforese de SDS-PAGE com algumas modificações. O gel de separação 10 % de poliacrilamida foi feito a partir da mistura do tampão de separação (Tris pH 8,9; Temed 0,23 %) com uma solução de acrilamida /bis-acrilamida 30:1, solução

de sacarose 5 % e persulfato de amônio (100 µg /ml). O gel de empilhamento foi preparado na concentração de 3 % de poliacrilamida, utilizando-se tampão de separação, solução acrilamida /bis-acrilamida 10:2,5, solução de sacarose 5 % e solução de riboflavina 0,004 % como agente polimerizante. As alíquotas a serem analisadas foram solubilizadas em tampão de amostra não denaturante, (Tris-HCl pH 6,8, glicerol 38 % (v/v), azul de bromofenol), sendo então aplicadas nas canaletas do gel de empilhamento. O gel foi corado com uma solução de 0,2 % de azul de Coomassie Brilliant Blue (Sigma) (PETERSON, 1983) ou com nitrato de prata, segundo MORRISEY (MORRISEY, 1981). Padrões de massa molecular (Sigma) foram utilizados como referência.

3.3.6 “Western blot”

A preparação submetida à eletroforese sem coloração e fixação foi transferida para membrana de nitrocelulose (Bio Rad Laboratories) a 50 volts por 16-18 horas a 4°C em tampão de transferência (TOWBIN *et al*, 1979). Ao final da transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau S (Sigma) 0,2 % em ácido acético 1% por 10 minutos e lavada com água.

O bloqueio da nitrocelulose foi feito em tampão TBS 50 mM-leite Molico 3 % (p/v), pH 8,0 por 60 minutos à temperatura ambiente, com lavagens subsequentes em TBS 50mM-Tween 20 0,03 % (v/v), pH 8,0. Em seguida, adicionou-se o soro em TBS 50mM-Tween 20 0,03 %-Triton X-100 0,05 % (v/v), pH 8,0, mantendo-se a 4°C por 16-18 horas. A nitrocelulose foi lavada seqüencialmente com: TBS 50 mM pH 8,0, TBS 50mM-Tween 20 0,03 % (v/v), pH 8,0 e TBS 50 mM, pH 8,0 por 5 a 10 minutos cada lavagem à temperatura ambiente. Repetiu-se o bloqueio como descrito anteriormente. Acrescentou-se como segundo anticorpo, anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma), diluído em tampão de bloqueio, deixando-se à temperatura ambiente por 2 horas. Lavou-se com TBS 50mM-Tween 20 0,03 % (v/v), pH 8,0

por 30 minutos e adicionou-se a solução de revelação para quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

3.3.7 Imunofluorescência indireta

Para a reação de imunofluorescência indireta, a forma micelar de *P. fellutanum*, ou formas epimastigotas do *T. cruzi*, clone CL 14, foram fixadas em paraformaldeído 4 % e distribuídas em lâminas de fluorescência. As lâminas foram lavadas por 3 vezes com PBS/BSA e a incubação com soro contendo os anticorpos policlonais a serem testados em diluições seriadas de 1:50-1:1000 em volumes de 5 µl em cada poço foi feita. A incubação durou 30 minutos a 37° C, em câmara úmida. Após 3 lavagens com PBS, a cada poço foram adicionados 5 µl de anti-imunoglobulina de camundongo conjugada com fluoresceína (Sigma), diluída em PBS (1:30). A nova incubação foi feita nas mesmas condições, seguida de lavagens com PBS. Depois de secas, as lâminas foram montadas com uma gota de glicerol tamponado e observadas em microscópio de fluorescência.

3.3.8 Imunoprecipitação

O precipitado de 30-80 % com sulfato de amônio do meio de cultura do *P. fellutanum* ou o extrato de epimastigotas de *T. cruzi* foram pré-incubados durante 5 minutos no gelo com 50 µl de Sepharose-Proteína A (Amersham Pharmacia Biotech), previamente lavada com PBS, para a adsorção de componentes inespecíficos (KESSLER, 1975), conforme cada experimento. O material foi então centrifugado e o sobrenadante adicionado a um tubo contendo 50 µl de Sepharose-Proteína A (Amersham Pharmacia Biotech), previamente lavada com PBS e 10 µl do anticorpo desejado e incubado por 16 horas à temperatura de 4°C.

Após este período de incubação, o material a ser utilizado para a dosagem da atividade enzimática (*P. fellutanum*) foi centrifugado em

microcentrífuga por 3 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado lavado 3 vezes PBS contendo albumina bovina (BSA).

Para os demais experimentos o precipitado foi lavado com tampão Kessler (Tris 10mM pH 8,6, EDTA 1mM, NaCl 30 mM, Nonidet P-40 1 %) seguido de 3 lavagens com PBS, sendo então submetido a eletroforese em SDS-PAGE. O gel foi corado, tratado com Amplify (Amersham Pharmacia Biotech) por 30 minutos e exposto a filme de raio X a -80°C.

3.3.9 Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses para DNA e RNA foram feitas de acordo com o experimento, em gel de agarose em concentrações de 1 a 1,5 %, em TAE (Tris-acetato 40mM, pH 8, EDTA 1 mM) contendo 0,5 µg de brometo de etídeo/mL de gel. As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra contendo Ficoll 400 a 15 %, azul de bromofenol a 0,25 % e xileno cianol a 0,25 %.

3.3.10 Preparação de bactérias competentes com cloreto de cálcio.

Esta preparação foi feita segundo o método de HANAHAN, 1983. Um tubo de bactéria da cepa desejada foi descongelado, mantendo-o por 15 minutos no gelo. As bactérias foram espalhadas em uma placa de LB contendo MgSO_4 10mM e incubada a 37°C durante a noite. Uma colônia isolada foi colocada em 2 ml de meio SOB pré-aquecido a 37°C e mantido por 2 horas a 37°C e 200 rpm até $A_{600} = 0,5$. O pré-inóculo foi transferido para 50 ml de meio SOB aquecido e incubado a 37°C e 200 rpm até $A_{600} = 0,6$. O frasco com a cultura de bactérias (tubo de centrifuga de 50 ml) foi mantido em gelo por 15 minutos e a seguir foi adicionado 0,5 ml de MgCl_2 1 M. Após 15 minutos, a cultura foi centrifugada por 15 minutos a 5.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 10 ml de tampão RF I (KCl 100mM; $\text{MnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 50 mM acetato de potássio 30 mM, pH 7,0,

CaCl₂-2 H₂O 10 mM; glicerol 15 %) gelado e deixado em repouso no gelo por 15 minutos. Após a centrifugação por 10 minutos a 5.000 rpm e 4°C, o precipitado foi ressuspensão em 2 ml de RF II (KCl 75 mM; CaCl₂ . 2 H₂O 75 mM; MOPS 10 mM pH 7,0; MgCl₂ 10 mM; glicerol 15%.) gelado, sempre se mantendo o material em gelo. As bactérias foram aliquotadas em 100 µl, congeladas em banho de gelo seco/acetona e armazenadas por até 2 meses a -80°C.

3.3.11 Preparação de células bacterianas competentes para eletroporação

Para o preparo de células competentes, uma colônia de *E. coli* Xl-1Blue MRF foi inoculada em 5 ml LB e incubada a 37°C sob agitação (250 rpm) durante a noite. Esta cultura foi usada como pré-inóculo em 500 ml de meio LB contendo ampicilina (50 µg/ml). O crescimento foi feito a 37°C sob agitação (250 rpm) até atingir uma absorbância de A₆₀₀=0,45 a 0,60. O cultivo foi então transferido para tubos de centrifuga e mantido em gelo durante 10 minutos antes de centrifugá-lo a 6000 g por 10 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi lavado com 500 ml de água gelada e centrifugado a 6.000 g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspensão em 25 ml de glicerol 10 % e após 10 minutos, foi centrifugado a 2.500 g por 10 minutos a 4°C. As células, ressuspensas em 0,5 ml de glicerol 10 %, foram aliquotadas em 50 µl e estocadas a -80°C.

3.3.12 Reação de ligação

A ligação foi feita em pGEM-T easy (Promega). A reação de ligação para a clonagem dos produtos de PCR purificados foi feita com 50 ng do vetor e 75 ng do inserto em tampão Tris-Cl 10 mM pH 8,8, contendo KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton a 0,1 %, DTT 5 mM, ATP 0,5 mM e 2U de T₄ DNA ligase. Após uma suave agitação, o sistema de reação foi

incubado a 16°C durante 18 horas. A reação de ligação realizada com o vetor PCR-T7 foi a seguinte: 4 µl do produto de PCR (10 ng de DNA); solução salina (200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂); 1 µl vetor pCR T7 (10 ng) em um volume final de 5 µl. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. As células competentes (*E. coli* XL1Blue MRF⁺), previamente mantidas em gelo, foram transformadas com 2µl do produto da reação anterior.

3.3.13 Transformação de células competentes

3 µl da solução de ligação plasmidial foram adicionados a 50 µl de células competentes XL1Blue MRF⁺ e transferidas para cubeta de eletroporação de 0,1 cm. A cubeta foi levada ao eletroporador onde foi submetida a uma voltagem de 1,8 KV (25 µF e 200 Ω) o que resulta em pulso de 4,5 a 4,8 ms. Após o choque, as células foram recuperadas em 1 ml de meio SOC a 37°C durante 1 hora, sob agitação (200 rpm). Em seguida, 250 µl da cultura foram espalhadas em placas de LB contendo antibiótico, 40 µl de X-gal (20 mg /ml) e 30µl de IPTG 100 mM e incubadas a 37°C durante a noite. Após o crescimento celular, clones brancos, contendo vetores com o inserto foram selecionados.

Alternativamente, as células preparadas com cloreto de cálcio foram mantidas em gelo por 10 minutos sendo então 1 µl de DNA adicionado às bactérias. A mistura foi deixada no gelo por 30 minutos, seguindo-se um choque térmico de 2 minutos a 42°C e retornando ao gelo por 2 minutos. Foi adicionado 1 ml de meio SOC e incubação das bactérias por 1 hora a 37°C e 200 rpm. Os transformantes foram semeados em placas de ágar LB contendo ampicilina (100µg/ml) e as placas foram incubadas durante a noite a 37°C.

3.3.14 Digestão dos clones selecionados

Os clones obtidos (1 µl do DNA purificado) foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Eco* RI, pois a clonagem deu-se nestes sítios. A reação de digestão foi mantida a 37°C por 2 horas. Toda reação foi aplicada em gel de agarose (1 %).

3.3.15 Absorção do soro

Uma colônia de *E. coli* XL1BLUE MRF' foi inoculada em 400 ml de meio 2YT e cultivada sob agitação a 37°C durante a noite. No dia seguinte, a cultura foi distribuída em dois erlenmeyers. Um dos frascos foi autoclavado a 120°C por 1 hora. Ao outro foi adicionado formaldeído a para uma concentração final de 0,5 %, sendo incubado com agitação a 37°C por 2 horas. As duas suspensões foram reunidas, lavadas duas vezes com TBS pH 8,0 e distribuídas em tubos de centrifuga. O material foi centrifugado por 10 minutos a 6.000g e os sobrenadantes desprezados. Os precipitados foram então incubados com o anticorpo policlonal anti-peptídeos 73 e 101 de β-D-galactofuranosidase de *P.fellutanum* na diluição de 1:50 em TBS/molico 3% por 2 horas cada ciclo em um total de 4 ciclos de adsorção (GRUBER & ZINGALES, 1995).

3.4 LPPG

3.4.1 Extração de LPPG por butanol

Seguiu-se basicamente o procedimento descrito na literatura (LEDERKREMER *et al*, 1990), com algumas modificações.

Formas epimastigotas foram lavadas 3 vezes com NaCl 0,9 % por centrifugação a 4.000 g e mantidas a -70°C, até sua liofilização. 2,5 gramas de material liofilizado foram tratados com 15 ml de clorofórmio:metanol (2:1, v/v), 2 horas à temperatura ambiente, sob

agitação. Após centrifugação a 12.000 g por 20 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido a duas extrações (1 hora cada), com clorofórmio:metanol (1:1, v/v). Ao precipitado final adicionou-se água saturada com 1-butanol, mantendo-se sob agitação por 16 horas a 4°C, para a extração da LPPG.

Após centrifugação a 12.000 g por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e o butanol presente foi evaporado em rotoevaporador. A solução aquosa foi então liofilizada para reduzir parcialmente seu volume. Esta foi mantida a 4°C durante 16 horas e novamente centrifugada para retirar sedimentos. Ao sobrenadante acrescentou-se clorofórmio e metanol para a proporção final de clorofórmio:metanol:água (10:10:3, v/v/v). A extração foi realizada durante 16 horas sob agitação, à temperatura ambiente. Foi feita nova centrifugação e ao sobrenadante adicionou-se o mesmo volume de metanol frio. A mistura foi mantida a -20°C durante 16 horas, centrifugada e o precipitado coletado e submetido a cromatografia em coluna de Octil-Sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech) previamente equilibrada em tampão TES 0,1M, pH 7,0 contendo 5 % de 1-propanol. A amostra (50 mg) foi dissolvida em 2 ml do mesmo tampão e aplicada à coluna. A eluição foi realizada com um gradiente linear de 1-propanol (5-70 %). As frações contendo a LPPG foram reunidas, o propanol foi evaporado em rotoevaporador e o material liofilizado. Para a detecção da LPPG, uma pequena fração de epimastigotas foi marcada com ácido palmítico tritiado, acrescentada aos epimastigotas frios no início da purificação, sendo as frações de Octil-Sepharose monitoradas também para a presença de radioatividade. As frações radioativas que continham a LPPG foram coletadas, concentradas e submetidas a SDS-PAGE para confirmar a presença da molécula.

3.4.2 Marcação de LPPG com trítio

Aproximadamente 4 mg de LPPG foram ressuspensas em 1 ml de água. Adicionou-se o mesmo volume de periodato de sódio 0,1 M

preparado em tampão acetato 0,2 M pH 5,5 e incubou-se a amostra por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após a incubação adicionaram-se 100 µl de etilenoglicol. A amostra foi exaustivamente dializada contra tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 seguindo-se a adição de 860 µg de NaB³H₄ dissolvido em NaOH 10 mM à amostra. Após 4 horas, adicionaram-se 10 mg de NaBH₄ e incubou-se a amostra por mais 4 horas. A reação foi interrompida com adição de ácido acético glacial, com posterior lavagem com metanol e secagem em “speedvac”.

3.4.3 LPPG como substrato

Para cada ponto experimental, utilizaram-se aproximadamente 200.000 cpm de LPPG marcada. Os pontos experimentais foram os seguintes:

1. LPPG-marcada incubada com 10 µg do material eluído da coluna de afinidade proveniente do extrato de epimastigotas.
2. LPPG-marcada incubada com 10 µg de β-D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*.
3. LPPG-marcada
4. LPPG-marcada hidrolizada com HCl 2 N por 2 horas a 100°C

Os pontos experimentais 1 e 2 foram incubados por 18 horas à 37°C. Após a incubação, precipitou-se as proteínas com TCA (ácido tricloroacético) 25 %, concentrou-se o sobrenadante e aplicou-se no papel. Os pontos 3 e 4 após o mesmo período de incubação foram concentrados e aplicados no papel.

3.4.4 Cromatografia para a identificação de monossacarídeos

Cromatografia em papel

As amostras foram separadas em papel Whatman número 1 utilizando-se acetato de etila:ácido acético: ácido fórmico:água na proporção de 18:3:1:4, como solvente. Após 16 horas de corrida

procedeu-se a coloração seguindo o método descrito por TREVELYAN *et al*, 1950. Como padrões utilizou-se: arabinose, galactose, manose .

Cromatografia de troca iônica em alto pH

O extrato bruto correspondente a 5×10^8 epimastigotas cepa Y foi incubado com 100 μg de LPPG isolada de cada cepa de *T. cruzi*. As amostras foram incubadas a 30°C por 48 horas em tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, PMSF 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, TLCK 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e leupeptina 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) seguidas de ultracentrifugação a 100.000 g por 1 hora.

A técnica utilizada para a análise dos resultados foi a de cromatografia de troca iônica em altos valores de pH (HPAEC-PAD). As amostras obtidas após a centrifugação foram carregadas em uma coluna CarboPac PA 10 (4 x 250 mm)(DIONEX), precedida de uma pré-coluna Carbo PAC PA 10 “guard” (4 x 50 mm), que foram previamente equilibradas com NaOH 200 mM. Os padrões de 2-deoxi glicose, manose e galactose, assim como as amostras foram eluidas com NaOH 20 mM em um fluxo de 1 ml por minuto a temperatura ambiente. O detetor de pulso amperométrico foi calibrado com uma sensibilidade de 30 nA com potenciais de pulso de $E_1 = +0.05 \text{ V}$, $E_2 = +0.6 \text{ V}$, and $E_3 = -0.6 \text{ V}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 β -D-galactofuranosidase

4.1.1 β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*

Para podermos iniciar os estudos de caracterização da β -D-galactofuranosidase em *Trypanosoma cruzi*, foi necessário inicialmente estabelecer o cultivo do fungo *Penicillium fellutanum* em nosso laboratório. O inóculo inicial do *P. fellutanum* foi gentilmente cedido pelo Dr. John Gander da Universidade da Flórida-EUA. Com esse inóculo estabeleceu-se a cultura em meio sólido (Czapek-Dox ágar) e meio líquido (Raulin-Thom) do fungo, para a manutenção do mesmo e obtenção da enzima β -D-galactofuranosidase, respectivamente.

Inicialmente, com a necessidade de obter grande quantidade de massa de β -D-galactofuranosidase, procuramos estabelecer o melhor método de purificação.

A primeira metodologia empregada foi a descrita por REYES e colaboradores (REYES *et al*, 1992), para a purificação de β -D-galactofuranosidase de *P. oxalicum*. O filtrado foi concentrado e cromatografado inicialmente em coluna de Sephadex G-200. As frações de 30 a 45 que continham atividade de β -D-galactofuranosidase (figura-8) foram reunidas e cromatografadas em coluna Mono Q. Após desalificação, o material que continha a atividade enzimática foi submetido à cromatografia em Superose 6 (figura-9). Três bandas de massa molecular 65 kDa, 42 kDa e 35 kDa foram observadas em SDS-PAGE após a última etapa de purificação (não mostrado). Os dados da purificação encontram-se na tabela-4

Na segunda metodologia de purificação empregada, utilizamos como primeira etapa uma precipitação com sulfato de amônio que se mostrou

Figura-8 Perfil cromatográfico da eluição da β -D-galactofuranosidase da coluna de Sephadex G-200.

A coluna (2,5 cm x 90 cm), foi equilibrada com 14 mM de tampão fosfato de sódio, pH 6,5. Frações de 3,0 ml foram coletadas.

Em pontilhado temos o perfil da atividade enzimática ($A_{410 \text{ nm}}$) e em vermelho o perfil da eluição da proteína ($A_{280 \text{ nm}}$).

Figura-9 Perfil cromatográfico da purificação de β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum* em coluna de gel filtração Superose 6.

A eluição foi feita como descrito em materiais e métodos.

A linha em vermelho representa o perfil da proteína.

O pico de atividade está localizado pela seta.

Tabela-4 Purificação da β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum* segundo (REYES *et al*, 1992)

	Proteína			Enzima				
	Volume (ml)	conc. mg/ml	mg totais	U/ml	U/mg	U totais	Recuperação (%)	Enriq.
Meio	150	0,36	54,00	0,57	1,58	85,50	100,0	1,0
Meio 10 x Concentrado (*)	7,2	1,54	11,13	3,80	2,46	27,36	32,0	1,5
Sephadex G-200	3,0	0,43	1,300	3,08	7,16	9,24	10,8	4,5
Mono Q	2,0	0,08	0,160	3,04	38	6,08	7,1	24,0
Superose 6	2,0	0,05	0,106	0,94	17,7	1,88	2,1	11,2

(*) meio concentrado por ultrafiltração
Enriq-enriquecimento

simples, reprodutível e bem mais rápida que a coluna de Sephadex-G-200 utilizada anteriormente.

O precipitado de 30-80% de sulfato de amônio dializado foi adicionado na coluna de troca iônica DEAE-Sepharose Cl 6B (figura-10a). As frações de 9 a 12 eluídas com NaCl 0,25 M foram concentradas e cromatografadas em uma coluna de afinidade de 4-amino-1-tiofenil- β -D-galactofuranosídeo-Sepharose. O perfil em SDS-PAGE pode ser verificado (figura-10b). Neste último caso quando a coluna foi eluída com ácido D-galactônico- γ -lactona 10 mM em um gradiente de NaCl de 100-500 mM, obtiveram-se 2 picos de atividade de β -D-galactofuranosidase (figura-11a) com recuperação de 26 % da atividade enzimática original. Esses dois picos apresentam a mesma massa molecular aparente de 70 kDa (figura-11b). Dados da purificação são apresentados na tabela-5.

O eluído da coluna de afinidade foi cromatografado em uma coluna de Sepharose-Concanavalina A (figura-12a), para se verificar a possível natureza glicoprotéica da enzima. Pode-se observar na figura-12b a coloração obtida pelo método de Schiff (MILETTI *et al*, 1999). A concentração de carboidratos foi calculada em aproximadamente 20% do peso seco) pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956).

4.1.2 Determinação da massa molecular da β -D-galactofuranosidase

Amostras da enzima purificada foram submetidas a PAGE não denaturante como descrito na metodologia. Comparando-se a proteína obtida com os padrões, estimou-se uma massa molecular em torno de 150 kDa para a β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*, indicativo de uma dimerização (figura-13), já que em condições denaturantes temos um polipeptídio de 70 kDa.

Figura-10 Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose Cl 6 B da β -D-galactofuranosidase de *Penicillium fellutanum*. (a) A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato 10 mM (pH 5,0) e um gradiente de NaCl 0-0,5 M a um fluxo de 1 ml por min. A eluição e a atividade de β -D-galactofuranosidase foram determinadas como descrito na metodologia (■) Proteína; (●) Atividade. A linha tracejada representa o gradiente linear de NaCl. (b) SDS-PAGE das frações de 9-12 coradas com prata, segundo materiais e métodos.

Figura-11 Perfil de eluição da β -D-galactofuranosidase da coluna de 4-aminofenil 1-tio- β -D-galactofuranosideo. (a) Frações eluídas da coluna de DEAE-Sepharose CL 6B foram dialisadas e cromatografadas através de coluna de 4-aminofenil-1-tio- β -D-galactofuranosideo. A eluição e a atividade de β -D-galactofuranosidase foram determinadas como descrito na metodologia. (■-■) Proteína; (●-●) Atividade. (b) 1 e 2 correspondem aos dois picos eluídos (corados com nitrato de prata).

Tabela-5 Purificação da β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum* (MILETTI *et al*, 1999)

	Proteína			Enzima				
	Volume (ml)	conc. (mg/ml)	Total mg	(U/ml)	(U/mg)	U totais	Recuperação (%)	Enrig.
Meio de Cultura	150	0,360	54,00	1,17	3,25	175,50	100	1,00
Precipitado de 30-80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,0	1,520	6,08	5,00	3,20	20,00	11,3	0,97
DEAE-Sepharose Cl-6B	4,0	0,200	0,80	4,09	20,45	16,36	9,3	6,20
Coluna de afinidade (Mistura dos 2 picos)	1,0	0,150	0,15	5,2	34,60	5,20	2,9	10,60

Enrig-enriquecimento

Figura-12 Eluição de β -D-galactofuranosidase da coluna de Concanavalina-A Sepharose. (a) Frações eluídas da coluna de afinidade de 4-amino-1-tiofenil- β -D-galactofuranosídeo Sepharose foram dialisadas e aplicadas em coluna de Concanavalina-A-Sepharose. A eluição e a atividade de β -D-galactofuranosidase foram feitas como descrito em material e métodos. (■) Proteína; (●) Atividade.

(b) Proteína eluída da coluna corada com:

- 1- Coomassie Blue
- 2- Reagente de Schiff

Figura-13 PAGE não denaturante da β -D-galactofuranosidase purificada. A eletroforese em condições não denaturantes foi feita como descrito em materiais e métodos. Amostras com 20 μ g de proteína foram usadas.

- 1- Padrão albumina bovina
- 2- Padrão de ovoalbumina
- 3- Padrão de lactoalbumina
- 4- β -D-galactofuranosidase de *P.fellutanum*

4.1.3 Parâmetros cinéticos e inibidores

Inicialmente estabeleceram-se os parâmetros cinéticos, para caracterizar a atividade enzimática utilizando-se o substrato *p*-nitrofenilgalactofuranosídeo (VARELA *et al*, 1986). Demonstrou-se que a enzima β -D-galactofuranosidase tem um pH ótimo de 3,0-6,0 (figura-14), sendo os valores de K_m e V_{max} estimados pelo gráfico recíproco de Lineweaver-Burk em 0,311 mM e 17 $\mu\text{moles/h}^{-1}/\mu\text{g}^{-1}$ respectivamente. A curva da atividade em função do tempo é mostrada na figura-15 e em função da concentração do substrato na figura-16.

O efeito de diferentes derivados de β -D-galactofuranose (tiobenzil- β -D-galactofuranosídeo, tiofenil- β -D-galactofuranosídeo, isopropil- β -D-tiogalactofuranosídeo, *n*-propil- β -D-tiogalactofuranosídeo) e ácido D-galactônico- γ -lactona foi verificado sobre a atividade enzimática, como descrito na metodologia (tabela-6). Para o D-galactônico- γ -lactona e o tiobenzil- β -D-galactofuranosídeo foram determinados os valores de K_i de 0,35 mM e 1,13 mM, respectivamente. A curva de Michaelis-Menten para os inibidores e o controle é mostrado na figura-17.

4.1.4 Obtenção de anticorpos policlonais anti β -D-galactofuranosidase

A enzima purificada e tratada com periodato/borohidreto de sódio de *P. fellutanum* foi utilizada para a produção de anticorpos policlonais. O soro de 10 camundongos imunizados com a β -D-galactofuranosidase purificada, foram reunidos e diluições seriadas (1:50 até 1:2000) foram feitas para a determinação de título. Por imunofluorescência indireta contra a forma micelar de *P. fellutanum* e western-blot contra β -D-galactofuranosidase purificada, determinou-se um título de 1:500 para a reação de imunofluorescência e de 1:200,

Figura-14 Efeito do pH sobre na atividade da β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*. A ensaio enzimático foi feito sob condições descritas em materiais e métodos usando tampões na concentração de 66mM. Tampões: acetato (pH 3-5), fosfato (pH 6-7) e borato (pH 8-10).

Figura-15 Atividade da β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum* em função do tempo de incubação.

A enzima foi incubada com o *p*-nitrofenilgalactofuranosídeo como descrito em materiais e métodos por diferentes tempos, assinalados no gráfico.

Figura-16 Gráfico de velocidade em $\mu\text{mol/h}^{-1}$ versus [S] (mM) de β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*.

Ensaio foi feito com 8,5 μg de proteína em um volume final de 0,5 ml, segundo materiais e métodos.

Inserto: Representação segundo Lineweaver-Burk

[S]-Concentração de p-nitrofenilgalactofuranosídeo usado.

Tabela-6 Atividade da β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum* na presença de derivados sintéticos de β -D-galactofuranose.

Adição	[I] mM	A _{410 nm}	Unidades	inibição (%)
controle	-	1,3522	0,86	-
tiofenil- β -D-galactofuranosídeo	0,15	1,228	0,78	9,1
	0,31	1,340	0,85	0,9
	0,62	1,310	0,83	3,1
	1,24			
tiobenzil- β -D-galactofuranosídeo				
	0,31	1,132	0,71	16,2
	0,62	0,885	0,56	34,5
	1,24	0,771	0,48	42,9
isopropil- β -D - tiogalactofuranosídeo				
	0,31	1,360	0,86	-
	0,62	1,100	0,69	18,6
	1,24	1,030	0,65	23,8
n-propil- β -D-tiogalactofuranosídeo	0,15	1,070	0,67	20,8
	0,31	1,020	0,63	24,6
	0,62	0,844	0,53	37,5
	1,24	0,810	0,51	40,0

Os ensaios foram feitos como descrito em materiais e métodos.

Figura-17 Cinética do ensaio de atividade enzimática de *P.fellutanum* na ausência e presença de diferentes inibidores. O ensaio foi feito como descrito em material e métodos.

Controle (♦-♦)

tiobenzil β-D-galactofuranosídeo(●-●) 0,62 mM

D-galactônico-γ-lactona (■-■) 0,62mM

para a reação de quimioluminescência em Western blot. A reação de imunofluorescência e Western blot são apresentadas nas figuras-18 e 19. Não houve reação com o soro pré-imune do camundongo.

Para verificar se o anticorpo imunoprecipitava β -D-galactofuranosidase, determinou-se a atividade da enzima nos imunoprecipitados obtidos a partir do precipitado de 30-80 %. Aproximadamente, 78 % da atividade de enzima (0.2 U) foi imunoprecipitada pelos anticorpos quando comparado com o número de unidades iniciais presentes no precipitado de 30-80 % (0.26 U).

4.1.5 Seqüenciamento parcial da β -D-galactofuranosidase.

A β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*, foi purificada como descrito anteriormente por MILETTI e colaboradores (MILETTI *et al*, 1999), sendo então analisada quanto à sua pureza em um gel de SDS-PAGE a 9 % (figura-20a). Para se confirmar a natureza da proteína como sendo β -D-galactofuranosidase, procedeu-se à análise por Western blot, utilizando como anticorpo primário, o soro anti- β -D-galactofuranosidase, obtido pelo inóculo em camundongos (figura-20b). A banda do gel correspondente à β -D-galactofuranosidase foi enviada para o serviço de seqüenciamento da Universidade de YALE-EUA. A amostra foi submetida à digestão com tripsina e análise por cromatografia líquida seguida de espectroscopia de massa de captura de íons. O perfil dos fragmentos gerados, não correspondem a nenhum perfil de digestão triptica de proteínas conhecidas depositadas nos bancos de dados. Os peptídeos 65, 73, 97 e 101 separados por cromatografia de gel filtração (figura-21A) foram escolhidos para o seqüenciamento por degradação de Edman. Seqüências de 15, 21 e 22 aminoácidos (figura-21B) foram obtidas para os fragmentos 65, 73, 101, respectivamente e uma seqüência muito variável para o peptídeo 97, que não foi utilizada em nosso trabalho.

Figura-18 Reatividade do anticorpo policlonal contra β -D-galactofuranosidase com a forma micelar de *P. fellutanum*. A reatividade foi verificada por imunofluorescência indireta, segundo descrito em materiais e métodos.
A-Imunofluorescência; B-Contraste de fase

Figura- 19 Western blot mostrando a reatividade da fração de 30-80 % de sulfato de amônio com anticorpos policlonais contra β -D-galactofuranosidase.

1-Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau 0,2%

2-Imunoreação com o anticorpo policlonal anti- β -D-galactofuranosidase

Figura-20 Western blot mostrando a reatividade da enzima de *P.fellutanum* enviada para o seqüenciamento com anticorpos policlonais contra β -D-galactofuranosidase.

A-Proteína separada por SDS-PAGE 9 % (Coomassie blue)

B-Imunoreação com o anticorpo policlonal anti- β -D-galactofuranosidase, revelado por ECL (Amersham Pharmacia Biotech)

65	G-L-T-N-K	P-F-Q-F-N-V-D-S-P-K
A	P Y	Q
73	I-L-A-X-G-T-S-Q-P-I-L-P	D-A-D-Q-Q-V-E-F-G
A		
101	N-E-L-L-V-F-V-H-D-P	T-D-N-D-P-Y V-V-P-I-G-K
S		

Figura-21 Perfil da separação dos peptídeos da β -D-galactofuranosidase de *P.fellutanum*.

A- As setas apontam os peptídeos escolhidos para o seqüenciamento.

Branco-Representa o perfil do solvente.

B- Seqüências obtidas dos peptídeos. Nos quadrados as seqüências utilizadas para o desenho dos oligonucleotídeos.

4.1.6 Obtenção de anticorpos anti-peptídeos

Como o anticorpo policlonal obtido apresentava uma reatividade contra carboidratos, mesmo utilizando como antígeno amostra tratada com periodato/borohidreto, decidiu-se sintetizar os peptídeos 73 e 101 contendo uma cisteína adicionada à extremidade carboxiterminal para ligação covalente a hemocianina de “Keyhole Limpet” ativada por maleimida e obtenção de anticorpos em camundongos contra esses peptídeos. Os soros dos animais inoculados com os peptídeos 73 e o 101 reagiram por imunofluorescência indireta com as formas micelares de *P. fellutanum* (não mostrado) e o que é mais importante, o soro anti-peptídeo 73 imunoprecipitou 90 % da atividade e o soro anti-peptídeo 101 imunoprecipitou 63 % da atividade de β -D-galactofuranosidase de uma amostra de enzima purificada.

Em resumo, a purificação da β -D-galactofuranosidase foi conseguida anteriormente por uma combinação de técnicas de purificação diferentes (RIETSCHEL-BERST *et al*, 1977; REYES *et al*, 1992; RAMLI *et al*, 1995), inclusive uma cromatografia de afinidade em Sepharose 4B-peptidofosfogalactomanana. Os dados apresentados em nosso trabalho demonstram que o uso de 4-aminofenil-1-tio- β -D-galactofuranosídeo como ligante na cromatografia de afinidade e o D-galactônico- γ -lactona como agente de eluição são uma combinação adequada para a purificação da β -D-galactofuranosidase como sugerido anteriormente (MARINO *et al*, 1998). Como pode ser observado na tabela-5, embora a recuperação seja baixa, quando utilizamos a coluna de afinidade para a β -D-galactofuranosidase, observamos uma banda de 70 kDa única em SDS-PAGE, com atividade específica bastante alta. A natureza glicoproteica da enzima purificada foi confirmada através de coloração de Schiff e eluição da Concanavalina-A-Sepharose. Também foram calculados em 20% o conteúdo de carboidrato total em relação à proteína por dosagem pelo método de fenol-sulfúrico. A enzima purificada apresenta características semelhantes às descritas para a

exo- β -D-galactofuranosidase purificada anteriormente (RIETSCHEL-BERST *et al*, 1977), como um pH ótimo em torno de 4,0.

As seqüências de aminoácidos obtidas da β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*, quando submetidas à busca por similaridades nos bancos de dados (GenBank ou genomas) não apresentaram nenhum motivo característico de glicosidases e nem mesmo tiveram homologia com outras proteínas que pudessem ser consideradas. A dificuldade se deve ao não isolamento até o momento dos genes das β -D-galactofuranosidases já descritas em outros organismos.

É interessante notar que até o momento, o estudo do metabolismo da galactofuranose está concentrado em sua biossíntese, provavelmente pela premissa de que para bloquear o crescimento dos organismos patogênicos, é necessário atingir primeiramente a síntese das macromoléculas, para depois estudar sua degradação no organismo.

Anticorpos policlonais produzidos contra a β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*, tratada com periodato/borohidreto mostraram imunoprecipitar a atividade enzimática da proteína purificada e reagiram com formas micelares do fungo, assim como reconheceram especificamente um polipeptídeo de 70 kDa. As tentativas de se produzir anticorpos monoclonais contra a β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum* foram impossibilitadas em virtude da alta antigenicidade dos carboidratos presentes em amostras prévias ou da provável degradação de grande parte da cadeia polipeptídica após o tratamento, que resultaria em híbridos pouco reativos.

4.2 β -D galactofuranosidase de *Trypanosoma cruzi*

4.2.1 Reatividade dos anticorpos anti- β -D-galactofuranosidase com o *T.cruzi*

Os anticorpos policlonais anti- β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum* reagem por imunofluorescência, com formas epimastigotas e

tripomastigotas de *T. cruzi*. A reatividade do anticorpo policlonal com formas epimastigotas é mostrada na figura-22A.

Paralelamente, esses anticorpos foram utilizados na imunodeteccção por Western blot. Assim como na reação de imunofluorescência, foi verificada reatividade do anticorpo policlonal com o extrato de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* (figura-22B).

4.2.2 Detecção de atividade de β -D-galactofuranosidase em *T. cruzi*

Em um estudo preliminar, a atividade de β -D-galactofuranosidase em *T. cruzi* foi testada, em formas epimastigotas das cepas Y, G e do clone Cl-14 em três pHs distintos (4,0, 6,0 e 7,0), utilizando-se *p*-nitrofenilgalactofuranosídeo e umbeliferilgalactofuranosídeo. Em todos os experimentos realizados observou-se atividade enzimática extremamente baixa com esse substrato sintético. As três cepas foram escolhidas devido a variações já descritas na literatura no conteúdo de galactofuranose de seus glicoconjugados (LEDERKREMER *et al*, 1991, LEDERKREMER & COLLI, 1995), o que poderia levar a atividades enzimáticas distintas. A possibilidade da necessidade de algum cofator foi aventada mas não foi testada com sucesso.

Como em fungos a β -D-galactofuranosidase é excretada para o meio de cultura e em *T. cruzi* foram descritas várias proteínas e lipídios que são liberados no meio (GONÇALVES *et al*, 1991; ABUIN *et al*, 1996), procurou-se verificar se o mesmo acontecia com as formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Mediu-se a atividade de β -D-galactofuranosidase liberada, pela incubação dos parasitas em PBS, porque o meio de cultivo de *T. cruzi* é complexo e sua cor interfere na dosagem. Não se observou atividade no material excretado nas condições empregadas.

A possibilidade de *T. cruzi* conter algum inibidor da enzima nos moldes descritos para *P. oxalicum* (REYES *et al*, 1992) é remota, uma

Figura-22 Reatividade do anticorpo policlonal anti- β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum* com *T. cruzi*.

A- Imunofluorescência indireta com formas epimastigotas do parasita. Barra de 10 μ m.

B- Reatividade por Western blot com extrato de tripomastigotas (1) e epimastigotas (2). As setas representam a banda correspondente a enzima eluida da coluna de afinidade. Ver figura-24.

vez que o extrato de *T. cruzi* não inibe a β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*.

Com a metodologia da coluna de afinidade *p*-aminotiofenil- β -D-galactofuranosídeo (MILETTI *et al*, 1999) estabelecida, extratos de *T. cruzi* foram submetidos à cromatografia de afinidade na tentativa de se isolar a enzima em *T. cruzi*. Utilizando o extrato correspondente a 2×10^9 parasitas previamente marcados com ^{35}S -metionina, obteve-se após a eluição com D-galactônico- γ -lactona 10 mM e gradiente salino de NaCl 100 a 500 mM, um pico de atividade enzimática, que embora bastante baixa acompanha o perfil de proteínas medido por radioatividade (figura-23). Esse material eluido foi então submetido a SDS-PAGE, sendo exposto a filme de raio X, ou transferido para uma membrana de nitrocelulose.

Por Western blot, observou-se reatividade do anticorpo policlonal anti- β -D-galactofuranosidase de fungo com bandas em torno de 50-60-kDa, coincidente com o autoradiograma, além de uma banda em torno de 70 kDa (figura-24).

Como em *T. cruzi* um dos prováveis substratos naturais é a LPPG, o material eluido da coluna foi incubado por 48 horas com LPPG previamente tratada com periodato e marcada por redução com borohidreto tritiado sendo o produto identificado por cromatografia em papel. Como controle positivo utilizamos a enzima do fungo incubada com a LPPG marcada, LPPG marcada hidrolisada, assim como padrões de monossacarídeos (manose, galactose e arabinose). Após uma corrida de aproximadamente 18 horas, o papel foi seco e revelado com prata/tiosulfato (TREVELYAN, 1950). O cromatograma foi então cortado em pedaços de 1 cm que foram utilizados para a detecção da radioatividade. Verificou-se que a enzima do fungo incubada com LPPG marcada tinha um pico coincidente com arabinose (produto da clivagem da galactofuranose por metaperiodato), como esperado para a atividade de β -D-galactofuranosidase, o mesmo acontecendo quando o extrato de *T. cruzi* foi incubado com LPPG, embora com atividade bem menor

Figura-23 Perfil de eluição da β -D-galactofuranosidase da coluna de 4-aminofenil 1-tio- β -D-galactofuranosideo. Frações eluídas da coluna de DEAE-Sepharose CL 6B foram dialisadas e cromatografadas através de coluna de 4-aminofenil-1-tio- β -D-galactofuranosideo, A eluição e a atividade de β -D-galactofuranosidase foram determinadas como descrito em materiais e métodos (■) Atividade; (■) CPM.

Figura-24 β -D-galactofuranosidase em *Trypanosoma cruzi*.

O material marcado com ^{35}S -metionina eluido da coluna de afinidade 4-amino-1-tiofenil galactofuranosídeo foi exposto à filme de raio X (A) e sua reatividade com o anticorpo policlonal anti- β -D-galactofuranosidase foi verificada por Western blot (B).

A setas indicam a proteína eluida e sua reatividade com anticorpo.

quando comparado com o fungo (figura-25). Esses resultados sugerem a existência em *T. cruzi* de uma β -D-galactofuranosidase, embora com baixa atividade.

Para comprovar a existência da enzima em *T. cruzi*, testamos sua atividade sobre a LPPG extraída de formas epimastigotas do parasita, do clone Cl-14, da cepa G e da cepa Y. As LPPGs foram obtidas como descrito anteriormente pelo método de extração com 1-butanol, das diferentes cepas devido ao seu diferente conteúdo de galactofuranose (LEDERKREMER & COLLI, 1995). Além disso o uso da LPPG, um dos possíveis substratos naturais da β -D-galactofuranosidase, juntamente com as mucinas, é importante uma vez que a hidrólise de resíduos de galactofuranose dessa molécula poderia demonstrar a atividade da enzima em *T. cruzi*, eliminando possíveis problemas impostos pelo substrato sintético.

LPPG da cepas Y, G e clone Cl-14 foram utilizadas como substrato sendo que a ausência de galactose livre foi previamente verificada. Também se verificou através de hidrólise branda com TFA 20 mM (2h/100°C), a presença de galactofuranose na LPPG purificada (figura-26), pela presença de sinal no tempo de retenção correspondente à galactose, já que a galactofuranose liberada é rapidamente convertida em galactopirranose.

A técnica utilizada para a análise dos resultados foi a de cromatografia de troca iônica em altos valores de pH (HPAEC-PAD). A padronização feita previamente com monossacarídeos está mostrada na figura-27. A deoxi-D-glicose foi utilizada como controle interno nas diferentes análises pelo Dionex, uma vez que há pequenas alterações no tempo de retenção de cada açúcar entre diferentes cromatografias. O extrato bruto correspondente a 5×10^8 epimastigotas cepa Y foi então incubado com 100 μ g de LPPG isolada de cada cepa de *T. cruzi*. As amostras foram incubadas a 30°C por 48 horas em tampão de incubação pH 7,4, seguidas de ultracentrifugação a 100.000 g por 1

Figura-25 Perfil da radioatividade medida após a cromatografia em papel de LPPG marcada submetida a diferentes tratamentos. Para cada ponto experimental, utilizaram-se aproximadamente 200.000 cpm de LPPG marcada e incubada com:

(▲) β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*;

(●) Fração do extrato de epimastigotas eluido da coluna de afinidade;

(■) LPPG controle.

1- Local esperado para a galactose (padrão)

2- Local esperado para a manose (padrão)

3- Local esperado para a arabinose (padrão)

Figura-26 Presença de galactofuranose na LPPG.

As amostras foram preparadas como descrito em materiais e métodos e aplicadas no cromatógrafo de HPAEC.

A-LPPG tratada com TFA 20mM.

B- LPPG s/ tratamento.

- (1) Pico correspondente a galactose liberada.
- (2) Pico correspondente a 2-deoxi glicose (padrão interno)

Figura-27 Perfil cromatográfico obtido no HPAEC dos padrões utilizados. As amostras foram preparadas como descrito em materiais e métodos e aplicadas no cromatógrafo.

A-Padrões de (1) galactose e (2) deoxi-glicose

B-Padrões de (1) galactose e (3) manose

hora. O sobrenadante foi seco em N₂, ressuspenso em água e aplicado no Dionex.

A análise dos produtos dessa reação utilizando LPPG da cepa G ou do clone CL-14 mostra, após a cromatografia, um pico pequeno com tempo de retenção da galactose, sugerindo a presença de galactofuranose liberada da LPPG (figura-28). A possibilidade de que o pico não observado corresponderia a uma contaminação por ácido D-galactônico- γ -lactona foi afastada por cromatografia desse composto, que apresenta perfil de eluição distinto da galactose (dado não mostrado).

A utilização de LPPG como substrato pode ser explicada pela abundância desse glicoconjugado na superfície da forma de epimastigota de *T. cruzi* e a presença de β -D-galactofuranoses terminais que são um sítio específico para a ação de uma β -D-galactofuranosidase.

Esse resultado, somado aos da reatividade do anticorpo policlonal contra β -D-galactofuranosidase com a proteína eluída da coluna de afinidade e a imunoprecipitação de uma proteína de mesma massa molecular (figura-29) com os anticorpos anti-peptídeos, apontam para a presença de uma β -D-galactofuranosidase em *T. cruzi*, concentrada pela coluna de afinidade. É importante ressaltar que a proteína reconhecida pelo anticorpo tem aproximadamente 50 kDa e co-migra com a proteína visualizada após a separação em coluna de afinidade e gel de SDS-PAGE.

4.3 Tentativas de clonagem do gene codificadoras da β -D-galactofuranosidase

4.3.1 Amplificação de sequência alvo e clonagem

A partir das seqüências peptídicas, desenharam-se os oligonucleotídeos “forward” e “reverse” para cada peptídeo (figura-30), tomando-se como base o “codon usage” de *Penicillium sp* e aminoácidos

Figura-28 Presença de galactofuranose na LPPG. As amostras foram preparadas como descrito em materiais e métodos e aplicadas no cromatógrafo de HPAEC.

A- produto da reação entre LPPG cepa Y e enzima eluída da coluna

B- produto da reação entre LPPG cepa CL e enzima eluída da coluna

C- produto da reação entre LPPG cepa G e enzima eluída da coluna

(1) Pico correspondente a galactose

(2) Pico correspondente a 2-deoxi-glicose (padrão interno)

Figura-29 Imunoprecipitação da enzima da forma epimastigota de *T. cruzi* eluída da coluna de afinidade. para β -D-galactofuranosidase.

1- Anticorpo anti-peptídeo 73

2- Anticorpo anti-peptídeo 101

65 F 5' TATGAATTCCMSTTCCAGTTCAAACGTSGAC 3'
 65 R 5' ATGGATCCGTCSACGTTGAACTGGAASKG 3'
 65 H 5' AACAAAGCMVTTCCAGTTCAACGTSGACWSYCCYAAG 3'

73 F 5' TATGAATTCGAYGCCGAYCAGCAGGTSGAGTTCGG 3'
 73 R 5' ATGGATCCCCGAAC TCSAACTGCTGRTCGGCGTC 3'
 73 H 5' GGYACCWSY CAGCCYATCCTCCCYGAYGCCGAYCAGCAGGTSGAGTTCGGY 3'

101 F 5' TATGAATTCACCGACYAACGAYCCYTACG 3'
 101 R 5' ATGGATCCCGTARGGRTCGTTRTCGG 3'
 101 H 5' GAGCTYCTYGTSTTCGTSCACGAYCCYAACGAYAGCTAYCCYTAATGTSGTSCCYATC 3'

Figura -30 Sequência dos oligonucleotídeos degenerados desenhados a partir do seqüenciamento parcial da β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*.

Os sítios de restrição para *EcoR* I (azul) e *BamH* I (vermelho) estão indicados.

M= A ou C; S= C ou G; R= A ou G; Y= C ou T; W= A ou T;

V= A ou C ou G; K= G ou T

resultantes de códons menos variáveis. Sítios de restrição para as enzimas *BamH I* e *EcoR I* foram adicionados às seqüências para facilitar a clonagem no vetor pUC 19.

Os seis oligonucleotídeos, rearranjados dois a dois (65F/73R; 65F/101R; 73F/65R; 73F/101R; 101F/65R E 101F/73R), foram utilizados para a reação de PCR, usando-se como molde o DNA total de *P. fellutanum*. Várias condições de temperatura, tempo, concentração de $MgCl_2$ e de DNA genômico na reação de polimerase em cadeia (PCR) foram experimentadas, estabelecendo-se as condições mais favoráveis como sendo de 530ng de DNA, $MgCl_2$ 1,5 mM e uma temperatura de anelamento de 54°C, para as reações 65F/101R e 73F/65R nas quais temos produtos com 200, 500 pb e 250 e 1000 pb, respectivamente (figura-31). As outras reações não apresentaram amplificações. Como pode-se observar pelos resultados apresentados, apesar de termos feito inúmeras reações de PCR e em diferentes condições, o produto da reação não é único. Esses produtos (figura-31b) foram seqüenciados e não apresentaram homologia com as seqüências gênicas depositadas nos bancos de dados e estranhamente não continham as seqüências dos primers.

Uma nova tentativa de clonagem foi feita utilizando-se o vetor pGEM-T easy, evitando-se assim a necessidade de digestões prévias dos produtos com enzimas de restrição, já que observamos, que alguns dos produtos amplificados possuíam os sítios de restrição para as enzimas *BamH I* e *EcoR I*, inseridas previamente no desenho dos oligonucleotídeos. Das 10 tentativas de sequenciamento obtivemos 25 seqüências que ao serem analisadas não apresentaram qualquer homologia com seqüências depositadas em bancos de dados (GenBank). Muitas seqüências (72) apresentaram baixa qualidade e outras apresentaram baixíssimas similariedades com proteínas desconhecidas de genomas já seqüenciados. Outros clones não conseguiram ser seqüenciados em mais de uma oportunidade.

Figura-31 Produtos da reação de PCR do DNA de *P. fellutanum*

A- Produtos das reações 1 (65F/101R) e reação 2 (73F/65R) à temperatura de anelamento de 54°C.

B- Produtos de PCR já purificados. (a) 65F/101R-200 pb;

(b) 65F/101R-500 pb; (c) 73F/65R-250 pb; (d) Padrão: 1 Kb bp ladder

Devido à dificuldade de validar as seqüências obtidas como a provável seqüência do gene da β -D-galactofuranosidase partimos para a expressão de alguns desses produtos de PCR, a fim de verificar a reatividade do peptídeo obtido com os anticorpos policlonais anti-peptídeos. Os produtos de PCR (65F/101R e 73F/65R) foram clonados em vetor pcrT7 e utilizados para transformar *E. coli* BL21 (DE3) pLys. Com a indução com 1 mM de IPTG, analisamos a expressão do peptídeo ao longo do tempo. Após SDS-PAGE e transferência para membrana de nitrocelulose não se observou reatividade específica do soro anti-peptídeo 101 com um polipeptídeo que aparece com 4 e 5 horas de incubação, na clonagem do produto de PCR 65F/101R.

Para uma nova tentativa e evitando a presença dos introns, para clonagem e sequenciamento foi utilizada a técnica de RT-PCR. Nas reações onde se utilizaram como "downstream primer" e "upstream primer" os oligonucleotídeos rearranjados dois a dois, não se obteve produto em nenhuma das inúmeras tentativas. Quando se utilizou na síntese da primeira fita de cDNA, oligo-dt como primer, seguido de amplificação com os oligonucleotídeos "forward", obtivemos algumas bandas para o par 73F/oligo-dt e 101F/oligo-dt. Para poder utilizar esses produtos posteriormente, estamos modificando as condições da reação a fim de encontrar uma condição ideal de amplificação.

Também utilizando a técnica de RACE (Rapid Amplification of cDNAs Ends), que permite a geração de cDNAs "full length" em reações de transcrição reversa (FROHMAM *et al*, 1988). Só foi amplificada uma seqüência para o *P. fellutanum* nas reações onde se utilizou o primer 3' do kit e o primer 65F (figura-32). Este produto foi cortado e foi subclonado em pGEM-T easy para posterior sequenciamento.

Mesmo quando, após a primeira amplificação, usamos os produtos para um PCR com "nested primers" do kit, que aumentariam a especificidade e diminuiriam o "background", não observamos amplificação de nenhum produto para as reações com os oligos 73F e 101F.

Figura- 32 Reação de RACE 3' com os oligonucleotídeos obtidos do sequenciamento da β -D-galactofuranosidase de *P.fellutanum*

1-Oligo 65R

2-Oligo 73R

3-Oligo 101R

4- Padrão 100bp ladder

A seta indica a banda recortada e purificada para clonagem

4.3.2 Biblioteca de cDNA

Procedeu-se à extração de RNA total de *P. fellutanum* (figura-33) para a purificação de mRNA, que foi utilizado para a construção da biblioteca de cDNA de *P. fellutanum*.

Aproximadamente 3 mg de RNA total, foram enviadas para o Serviço de síntese de Bibliotecas de cDNA da Life Technologies-EUA, construída em plasmídeo pCMVSPORT6 e transformada em *E. coli*, cepa DH12S, que possui as seguintes características:

Teste	resultado
número de clones	4.63 x 10 ⁶ ufc
Tamanho médio dos insertos	1.721 kb
% de insertos >200pb	100%

Essa biblioteca foi amplificada para posterior “screening” com os anticorpos policlonais que foram obtidos contra os peptídeos 73 e 101. Até o momento, obteveram-se reações com “backgrounds” muito altos e não se encontrou clones que contivesse a seqüência, após tradução, dos aminoácidos da enzima de *P. fellutanum*.

Novas tentativas de isolamento do gene da β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum* e do *T. cruzi* serão efetuadas.

4.3.3 Varredura de biblioteca de cDNA de *T. cruzi* com anticorpo anti- β -D-galactofuranosidase

Os anticorpos policlonais obtidos contra β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum*, foram utilizados para a seleção de clones contendo o gene da β -D-galactofuranosidase em *T. cruzi*.

Células de *E. coli* XL1Blue MRF' foram incubados com fagos λ ZAP na diluição de 5×10^{-2} por 15 minutos sendo então plaqueados conforme descrito na metodologia. As membranas que foram colocadas

Figura-33 RNA total de *P. fellutanum*.

O RNA foi extraído conforme descrito em materiais e métodos.

1. Padrão de RNA 0,24 a 9,6 kb

2. RNA total de *P. fellutanum*. As bandas em 28 S e 18 S representam os RNAs ribossômicos

sobre as placas de lise, foram incubadas com o anticorpo policlonal anti- β -D-galactofuranosidase, pré adsorvido por 4x com extrato de *E. coli*.

Os clones selecionados mostraram ser negativos na segunda seleção.

5. COMENTÁRIOS FINAIS

A β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum* foi purificada e parcialmente caracterizada. Além dos resultados descritos nesta tese e nos artigos publicados em anexo, foram obtidas ferramentas para a análise da mesma enzima em *T. cruzi*. Embora os resultados aqui descritos sugiram sua existência nesse parasita, há necessidade de investir mais no método de dosagem da enzima .

O *p*-nitrofenilgalactofuranosídeo e o umbeliferilgalactofuranosídeo não se mostraram substratos adequados para a dosagem da β -D-galactofuranosidase em *T. cruzi*. A utilização de LPPG, possível substrato natural, seria mais adequado, como mostram nossos dados.

As tentativas feitas até o momento para a clonagem do gene codante da β -D-galactofuranosidase de *P. fellutanum* e em *T. cruzi* falharam inclusive quando anticorpos específicos anti- β -D-galactofuranosidase foram utilizados para varrer uma biblioteca de cDNA em ambos os organismos.

Novas tentativas serão feitas em futuro próximo, uma vez que o estudo do metabolismo da galactofuranose é de interesse, dado a ausência desse carboidrato no homem e sua presença em vários organismos, alguns deles importantes patógenos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYGUNAWARDANA,C; BUSH,C.A; TJOA,S.S; FENNESSEY,P.V; McNEIL,M.R (1989) The complete structure of capsular polysaccharide from *Streptococcus sanguis* 34. **Carbohydr Res.** 191(2),29-93.

ABEYGUNAWARDANA,C; BUSH,C.A; CISAR,J.O (1991) Complete structure of the cell surface polysaccharide of *Streptococcus oralis* C104: a 600-MHz NMR study. **Biochemistry** 30(35) 8568-8577.

ACOSTA,A.S; SCHENKMAN,S; YOSHIDA,N; MEHLERT,A; RICHARDSON,J.M; FERGUSON,M.A.J. (1995) The lipid structure of the glycosylphosphatidinositol anchored-mucin like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigote to infective metacyclic trypomastigote. **J. Biol. Chem.** 270, 27244-27253.

AHRAZEM,O; GOMEZ-MIRANDA,B; PRIETO,A; *(1999) Structural characterization of a cell wall polysaccharide from *Penicillium vermoeseni*: chemotaxonomic application. **Can. J. Bot.** 77(7), 961-968.

AHRAZEM,O; PRIETO,A; GOMEZ-MIRANDA,B; BERNABE,M; LEAL,J (2000) Heterogeneity of genus *Myrothecium* as revealed by cell wall polysaccharides. **Arch. Microbiol.** 173 (4), 296-302.

AHRAZEM,O; PRIETO,A; GOMEZ-MIRANDA,B; BERNABE,M; LEAL,J (2001) Comparison of cell-wall polysaccharides from *Nectria cinnabarina* with those from group of *Nectria* with *Sesquicilium anamorphs*. **Microbiology** 147(7), 1839-1849.

ALMEIDA, I.C; MILANI,S.R; GORIN,P.A.J; TRAVASSOS,L.R. (1991) Complement mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote by human anti- α -galactosyl antibodies. **J. Immunol.** 146, 2394.

ALMEIDA,I.C; FERGUSON,M.A.J; SCHENKMAN,S; TRAVASSOS,L.R. (1994) Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J.** 15; 304 (Pt 3),793-802.

ALMEIDA,I.C; NEVILLE,D.C.A; MEHLERT,A; TREUMANN,A; FERGUSON,M.A.J; PREVIATO,J.O; TRAVASSOS,L.R. (1996) Structure of N-linked oligosaccharide of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Glycobiology** 6, 507-515.

ALMEIDA,I.C; CAMARGO,M.M; PROCOPIO,D.O; SILVA,L.S; MEHLERT,A; TRAVASSOS,L.R; GAZZINELLI,R.T; FERGUSON,M.A.J; (2000) High purified glycosylphosphatidylinositol from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. **EMBO J.** 19, 1476-1485.

ALVES,M.J.M. & COLLI,W. (1975) Glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*: Partial purification by gel chromatography. **FEBS. Lett.** 52, 188-192.

ALVES,M.J.M. (1996) Members of the Tc-85 protein family from *Trypanosoma cruzi* are adhesion proteins. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29, 831-833.

ANDRADE,Z.A & ANDRADE,S.G. (1979) Patologia - As diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. In: Brener,Z & Andrade,Z.A. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 214-218.

ANDREWS,N.W; COLLI,W. (1982) Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. **J. Protozool.** 29, 264-269

ANDREWS,N.W; HONG,K.S; ROBBINS,E.S; NUSSENZWEIG,V. (1987) Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.** 64, 474.

ANDREWS,N.W; ROBBINS,E.S; LEY,V; HONG,K.S; NUSSENZWEIG,V. (1988) Developmentally regulated, phospholipase C-mediated release of major surface glycoprotein of amastigote of *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.** 167, 300.

ARONSON,N.N & KURANDA,M.J. (1989) Lysosomal degradation of Asn-linked glycoproteins. **FASEB J.** 3, 2615-2622.

ARRUDA,M.V; COLLI,W; ZINGALES,B. (1989) Terminal β -D-galactofuranosyl epitopes recognized by antibodies that inhibit *Trypanosoma cruzi* internalization into mammalian cells. **Eur. J. Biochem.** 182, 413-421.

AVILA,J.L; CASANOVA,M.A; AVILA,A; BRETANA,A. (1979) Acid and neutral hydrolases in *Trypanosoma cruzi*. Characterization and Assay. **J. Protozool.** 26, 304-311

AVILA,J.L; ROJAS,M; ACOSTA,A. (1991) Glycoinositol phospholipids from American *Leishmania* and *Trypanosoma* spp partial characterization of the glycan cores and the human humoral immune response to them. **J. Clin. Microbiol.** 29, 2305.

BARDALAYE,P.C; NORDIN,J.H; (1977) Chemical structure of the galactomannan from cell wall of *Aspergillus niger*. **J. Biol. Chem.** 252, 2548-2591.

BARLOW,J.N; GIRVIN,M.E; BLACHARD, J.S (1999) Positional isotope exchange catalyzed by UDP-galactopiranosase mutase. **J. Am. Chem. Soc.** 121, 6968-6969.

BARR,K; LAINE,R.A; LESTER,R.L (1984) Carbohydrate structures of three novel phosphoinositol-containing sphingolipids from the yeast *Histoplasma capsulatum*. **Biochemistry** 23 (23), 5589-5596.

BARRETO-BERGTER,E; VERMELHO,A.B; HARTMANN,R; POHLENTZ,G; KLEIN,R.A; EGGE,H. (1992) Structural characterization of neutral glycosphingolipids from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 51, 263.

BERSTRÖM, N; JANSSON,P-E; KILLIAN,M; SORENSEN,U.B.S; (2000) Structures of two cell wall-associated polysaccharides of *Streptococcus mitis* biovar 1 strain. **Eur. J. Biochem.** 267, 7147-7157.

BERTELLO,L.E; GONÇALVES,M.F; COLLI,W; LEDERKREMER,R.M. (1995) Structural analysis of inositol phospholipids from *Trypanosoma cruzi* epimastigote form. **Biochem. J.** 310, 255-261.

BRADFORD,M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248-256

BRENER,Z. (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Rev. Microbiol** 27, 374-382.

BRENER, Z. (1992) *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. In: In WENDEL,S; BRENER,Z; CAMARGO,M.E; RASSI,A **Chagas disease (American trypanosomiasis)**: its impact on transfusion and clinical medicine. Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia: São Paulo, p.49-80.

BRENER,Z. & CHIARI,E. (1963) Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 5,220-224

BRENNER,R.R & DE LA MERCED,A. (1987) **Chagas' Disease vectors**. CRC Press. Boca Raton, Fla.

BRITTO,C; CARDOSO,M.A; WINCKER,P; MOREL,C.M. (1993) A simple cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 88, 171-172.

BULMAN,R.A & CHITTENDEN,G.J.F (1976) The mycelial cell wall of *Penicillium charlesii* G. Smith NRRL 1887. **Biochim Biophys. Acta** 444, 202-211.

CAMARGO,E.P. (1964) Growth and diferentation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 6, 93-100.

CAMARGO,M.E & TAKEDA,G.K.F. (1979) Diagnóstico em laboratório. In BRENER,Z & ANDRADE,Z *Trypanosoma cruzi e Doença de chagas*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

CAMARGO,M.E. (1992) An appraisal of chagas' disease serodiagnosis. In WENDEL,S; BRENER,Z; CAMARGO,M.E; RASSI,A. **Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia: São Paulo, 271p

CAMARGO,M.M; ALMEIDA,I.C; PEREIRA,M.E; FERGUSON,M.A J; TRAVASSOS,L.R; GAZZINELLI,R.T (1997) Glycosylphosphatidylinositol anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **J. Immunol.** 158, 5890-5901.

CARRETO,L; WAIT,R; NOBRE,M.F; DA-COSTA,M.S. (1996) Determination of the structure of a novelglycolid from *Thermus aquaticus* 15004 and demonstration that hydroxy fatty acids are amide linked to glycolipds in *Thermus spp.* **J. Bacteriol.** 178(22), 6479-6486.

CASTELLANI,O; RIBEIRO,L.V; FERNANDES,J.F. (1967) Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **J. Protozool.** 14, 447-451.

CAZZULO,J.J; FRANKE,M.C,C; MARTÍNEZ,J; CAZZULO,M.F. (1990) Some kinetics properties of cysteine proteinase (cruzipain) of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. Biophys Acta.** 1037, 186-191

CHAGAS,C (1909) Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo do *Schizotrypanum cruzi n.gen., n.sp.* agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1, 159-218.

CHARTTERJEE,D; KHOO,K-H (1998) Mycobacterial lipoarabinomannan: na extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. **Glycobiology** 8 (2), 113-120.

CHIOCCONI,A; MARINO,C; LEDERKREMER,R.M (2000) Synthesis of 4-nitrophenyl β -D-fucofuranoside and β -D-fucofuranosyl-(1-3)-D-mannopyranose: modified substrates for studies on catalytic requirements of β -D-galctofuranosidase. **Carbohydr. Res.** 323, 7-13

CLUTERBUCK,P.W; HAWORTH,W.N; RAISTRICK,H; SMITH,G
STANCEY,M (1934) The metabolic products of *Penicillium charlesii* G.
Smith. **Biochem. J.** 28, 94-110.

CLUTERBUCK,P.W; OXFORD,A.E; RAISTRICK,H; SMITH,G (1932) The
metabolic products of *Penicillium breavi-compactum* series **Biochem. J.**
26, 1441-1458.

COLLI,W. (1993) Trans-sialidase: A unique enzyme activity discovered
in the protozoon *Trypanosoma cruzi*. **FASEB J.** 7, 1257-1264.

COUSIN, M.A; NOTERMANS, S;. HOOGERHOUT, P; VAN BOOM, J.H.
(1989) Detection of β -galactofuranosidase products by *Penicillium* and
Aspergillus species using 4-nitrophenyl- β -D-galactofuranoside. **J. Appl.**
Bacteriol. 66, 311-317.

CROSS,A.M;TAKLE,G.B (1993) The surface trans-sialidase family of
Trypanosoma cruzi. **Annu. Rev. Microbiol.** 47, 385-411

DAFFE,M.,BRENNAN,P.J; MCNEIL,M. (1990) Predominant structural
features of cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as
revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by
gas chromatography/mass spectrometry and ^1H and ^{13}C NMR analysis.
J. Biol. Chem. 265, 6734-6743.

DAFFE,M., MCNEIL,M; BRENNAN,P.J. (1993) Major structural features
of cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and
Nocardia spp. **Carbohydr. Res.** 249 (2), 383-398.

DALEY,L.S. AND STROBEL,G.A. (1983) β -D-galactofuranosidase activity
in *Helminthosporium sacchari* and its relationship to the production of
Helminthosporoside. **Plant. Sci. Lett.** 30, 145-154.

DAVIES,G; HENRISSAT,B (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolase. **Structure** 3, 853-859

DEDET,J.P; PRATLONG,F (2000) *Leishmania*, *Trypanosoma* and monoxenous trypanosomatids as emerging oppotunistic agents. **J. Eukariot. Microbiol.** 47 (1), 37-39.

DE DIEGO,J; PUNZON,C; DUARTE,M; FRESNO,M (1997) Alteration of macrophage function by *Trypanosoma cruzi* membrane mucin. **J. Immunol.** 159, 4983-4989.

DI NOIA,J.M; D'ORSO,I, SÁNCHEZ,D.O, FRASCH,AC.C (2000) A-U rich elements in the 3' UTR of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. **J. Biol. Chem.** 275, 10218-10227

DMITRIEV,B.A; BACKINOWSKY,L.V; LVOV,V.L; KOCHETKOV,N.K; HOFMAN,I.L (1975) Somatic antigen of *Shigella dysenteriae* type 3. Structural features of specific polysaccharide chain. **Eur. J. Biochem.** 50 (3), 539-547.

DOMENECH,J; PRIETO,A; BERNABE,M; LEAL,J (1994) Cell wall polysaccharides of four strains of *Paecilomyces variotti*. **Archiv. Microbiol.** 28 (3) 169-173.

DOMENECH,J; PRIETO,A; BARASOAIN,I; GOMEZ-MIRANDA,B; BERNABE,M; LEAL,J (1999) Galactomannans from the cell walls of species of *Paecilomyces* sect. *Paelomyces* and their teleomorphs as immunotaxonomic markers. **Microbiology** 145 (10), 2789-2796.

DUBOIS,M; GILLES,K.A; HAMILTON,J.K; REDESR,P.A; SMITH,F (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Chem.** 28, 350-355.

DUBORDIEU,D; DESPLANQUES,C; VILLETIAZ,J.C; RIBEREAU-GAYON,P. (1985) Investigations of β -D-glucanase from *Trichoderma harzanium*. **Carbohydr. Res.** 144, 277-287.

FAIRBANKS,G., STECK,T.L; WALLACH,D.F.H. (1971) Eletrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. **Biochemistry** 10, 2606-2616.

FAIRLAMB, A.H; CERAMI, A. (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. **Annu. Rev. Microbiol.** 46, 695-729.

FERGUSON,M.AJ (1997) The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B** 352, 1295-1302.

FISHER,E; OUASSI,M.A; VELGE,P; CORNETTE,J; KAZATCHKINE,M.D. (1988) Gp58/68, a parasite component that contributes to the escape of trypomastigote form of *T.cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. **Immunology** 65, 299.

FROHMAN,M.A; DUSH,M.K; MARTIN,G.R (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. **Proc. Natl. Acad. Sci USA** 85, 8998-9002.

GANDER,J.E; JENTOFF,N.H; DREWES,L.R; RICK,P.D. (1974) The 5-O- β -D-galactofuranosyl-containing exocellular glycopeptide of *Penicillium charlesii*. **J. Biol. Chem.** 249 (7), 2063-2072.

GAZZINELLI,R.T; PEREIRA,M.E.S; ROMANHA,A; GAZZINELLI,G; BRENER,Z. (1991) Cirest lysis of *Trypanosoma cruzi*: a novel effector mechanism of protection mediated by human ant-Gal antibodies. **Parasite Immunol.** 13, 345.

GERWIG,G.J; KAMERLING,J.P; VLIEGENTHART,J.F.G; MORAG,E; LAMED,R. BAYER,E.A. (1993) The nature or carbohydrate-peptide linkage region in glycoproteins from the cellulosomes of *Clostridium thermocellum* and *Bacteroides cellulosolvens*. **J. Biol. Chem.** 268, 26956-26960.

GOLGHER,D.B; COLLI,W; SOUTO-PADRON,T; ZINGALES,B. (1993) Galactofuranose-containing glycoconjugates of epimastigote and tripomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 60, 249-264.

GOMES,N.A; PREVIATO,J.O; ZINGALES,B; MENDONÇA-PREVIATO,L; DOS REIS,G.A. (1995) Down regulation of T lymphocyte activation *in vitro* and *in vivo* induced by glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*: assignment of T cell-supressive determinant to the ceramide domain. **J. Immunol.** 119, 465-470.

GONÇALVES,M.F; UMEZAWA,E.S; KATZIN,A.M; DE SOUZA,W; ALVES,M.J.M; ZINGALES,B; COLLI,W. (1991) *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Exp. Parasitol.** 72, 43-53.

GONZALEZ-CLEMENTE,M.C; GARCIA-FERRERO,M.A; BOSSIO,J.C; BOSCH,M; PARODI,A.J. (1990) The structure of galactofuranose-containing oligosaccharide isolated from glycoproteins of the trypanosomatid *Herptomonas samuelpessoai*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 42 (2), 289-291.

GONZALEZ,J; ARAGUTH,M.E; YOSHIDA,N. (1991) Resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection resulting from immunization of mice with 90-kilodalton antigen from metacyclic trypomastigote. **Infect. Immun.** 59, 863

GORIN,P.A J; SPENCER,J.F.T (1959) **Can. J. Chem.** 37,499.

GRIFFIN,D.H (1994) *Fungal Physiology* 2nd Wiley-Liss, New York

GROISMAN,J.F. & LEDERKRENER,R.M. (1987) D-galactofuranose in the N-linked sugar chain of a glycopeptide from *Ascobolus furfuraceus*. **Eur. J. Biochem.** 165, 327-332.

GRUBER,A & ZINGALES,B (1995) Alternative method to remove antibacterial antibodies from antibodies used for screening of Express libraries. **Biotechniques** 19, 28-29.

GUHA-NIYOGI,A; SULLIVAN,D.R; TURCO,S.J (2001) Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. **Glycobiology** 11 (4) 45R-59R.

HAEUW,J.F; MICHALSKI,J.C; STRECKER,G; SPICK,G; MONTREUL,J. (1991) Cytosolic glycosidase:do they exist ? **Glycobiology** 1, 487-492

HAYES,R.J & SCHOFIELD,C.J. (1990) Estimación de las tasa de incidencia de infecciones crónicas a partir de la prevalencia; la enfermedad de Chagas en America Latina. **Bol. Of. San. Panam.** 180, 308-316.

HAYNES,P.A; FERGUNSON,M.J.A; CROSS,G.A.M (1996) Structural characterization of novel oligosaccharides of cell-surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **Glycobiology** 6, 869-878.

HAWORTH,W.N; RAISTRICK,H; STACEY,M (1937) **Biochem J.** 31, 640.

HEARN,V.M & SIETSMA,J.H (1994) Chemical and immunological analysis of the *Aspergillus fumigatus* cell wall. **Microbiology** 140, 789-795.

HEISE,N; RAPER,J; BUXBAUM,LU; PERANOVICH,T.M.S ; CARDOSO DE ALMEIDA,M.L. (1996) Identification of complete precursors for the glycosylphosphatidylinositol protein anchors of *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.** 271, 16877-16887.

HENRISSAT,B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. **Biochem. J.** 280, 309-316.

HOSONO,A; LEE-SONG,H; AMETANI,A; NATSUME,M; HIRAYAMA,M; ABACHI,T; KAMINOGAWA,S; LEE,J.H (1997) Characterization of water soluble polysaccharide fraction with immunopotent activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. **Biosc. Biotech. Biochem.** 61(2), 312-316.

IKUTA,K; SHIBATA,N; BLAKE, J.S; DAHL,M.V; NELSON,R.D; HISAMICHI,K; KOBAYASHI,H; SUZUKI,S; OKAWA,Y (1997) NMR study of galactomannans of *Trichopyton mentagrophytes* and *Trichopyton rubrum*. **Biochem J.** 323, 297-305.

JAMES,P.G; CHERNIAK,R (1992) Galactoxylomannans of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.** 60 (3), 1084-1088.

JOHNSTON,B.D; PINTO,B.M (1998) Use of phenyl 1-selenogalactofuranoside as aglycosyl donor for the synthesis of galactofuranosyl-containing disaccharides. **Carbohydr. Res.** 305, 289-292.

JOINER,K.A; DIASDA SILVA,W; RIMOLDI,M.T; HAMMER,C.H; SHER,A; KIPNIS,T.L. (1988) Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigote of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertases. **J. Biol. Chem.** 263, 11327.

KAHN,S; COLBERT,T.G; WALLACE,J.C; HOAGLAND,N.A, EISEN,H (1991) The major 85-kDa surface antigen of the mammalian stage of *Trypanosoma cruzi* is a family of sialidases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88, 4481.

KATZIN,A.M. & COLLI,W. (1983) Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi* an N-acetyl-D-glucosamine-containing surface glycoprotein specific for the tripomastigote stage. **Biochem. Biophys. Acta.** 727, 403-417.

KATAOKASHIRASUGI,N; IKUTA,J; KUROSHIMA,A; MISAKI,A (1994) Antitumor activities and immunochemical properties of cell-wall polysaccharides from *Aureobasidium-pullulans*. **Biosc. Biotech. Biochem.** 58 (12), 2145-2151.

KESSLER, S.W. (1975) Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein-A antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. **J. Immunol.** 115, 1617-1624.

KIHO,T; OOKUBO,K; USUI,S; UKAI,S; HIRANO,K (1999) Structural features and hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F10) from the cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. **Biol. Pharm. Bull.** 22 (9), 966-970.

KOPLIN,R., BRISSON,J.R; WHITFIELD,C. (1997) UDP-galactofuranose precursor required for formation of lipopolysaccharide O antigen of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1 is synthesized by the product of the RFBD (KP01) gene. **J. Biol. Chem** 272, 4121-4128.

KOVENSKY,J; McNEIL,M; SINAY,P (1999) D-galactofuranosylphosphonates. First synthesis of UDP-C-D-galactofuranose. **J. Org. Chem.** 64, 6202-6205.

KREMER,L; DOVER,L.G; MOREHOUSE,C; HITCHIN,P; EVERETT,M; MORRIS,H.R; DELL,A; BRENNAN,P.J; McNEIL,M.R; FLAHERTY,C; DUNCAN,K; BESRA,G.S (2001) Galactan Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Biol. Chem.** 276 (28), 26430-26440.

LAEMMLI,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227, 680-685.

LATGE,J.P; KOBAYASHI,H; DEBEAUPUIS,J.P; DIAQUIM,M; SARFATI,J; WIERUSZSKI, JM; PARRA,E; BOUCHARA,JP; FOURNET,B (1994) Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. **Infect. Immun.** 62 (12), 5424-5433.

LEDERKREMER,R.M; ALVES,M.J.M; FONSECA,G.C; COLLI,W. (1976) A Lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. Isolation, purification and carbohydrate composition. **Biochim. Biophys. Acta** 444, 85-96.

LEDERKREMER,R.M; TANAKA,C.T; ALVES,M.J.M; COLLI,W. (1977) Lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. Amide and ester-linked fatty acids. **Eur. J. Biochem.** 74, 263-267.

LEDERKREMER,R.M; CASAL,O.L; ALVES,M.J.M; COLLI,W. (1980) Evidence for the presence of D-galactofuranose in the lipopeptidophosphoglycan of *Trypanosoma cruzi*. **FEBS Lett.** 116, 25-29.

LEDERKREMER,R.M; CASAL,O.L; COUTO,A; COLLI,W. (1985) Structural studies on the oligosaccharide moiety of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Biochem.** 151, 539-542.

LEDERKREMER,R.M; LIMA,C; RAMIREZ,M.L; CASAL,O.L. (1990) Structural features of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* common with the glycoposphatidylinositol anchors. **Eur. J. Biochem.** 192, 332-343.

LEDERKREMER,R.M; LIMA,C; RAMIREZ,M.L; FERGUSON,M.A; HOMANS,S.W; THOMAS-OATES,J.E (1991) Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **J. Biol. Chem.** 266(35), 23670-23675

LEDERKREMER,R.M & COLLI,W. (1995) Galactofuranose-containing glycoconjugates in trypanosomatids **Glycobiology** 5, 547-552.

LEE,R; MONSEY,D; WESTON,A; DUNCAN,K; RITHNER,C; McNEIL,M (1996) Enzymatic Synthesis of UDP-galactofuranose and an assay for UDP-galactopyranose mutase based on High-performance liquid chromatography. **Anal. Biochem.** 242, 1-7.

LEE,R; SMITH,M.D; NASH,R.J; GRIFFITHS,R.C; McNEIL,M; GREWAL,R.K; YAN,W; BESRA,G.S; BRENNAN,P.J; FLEET,G.W.J (1997) Inhibition of UDP-Gal mutase and mycobacterial galactan biosynthesis by pyrrolidine analogues of galactofuranose. **Tetrahed. Lett.** 38, 6733-6736.

LEE,R.E; SMITH,M.D; PICKERING,L; FLEET,G.W.J. (1999) A new approach to combinatorial library generation of galactofuranose mimics as potential inhibitors of mycobacterial cell wall biosynthesis: Synthesis of a peptidomimetic of uridine 5'-diphosphogalactofuranose (UDP-Gal_f). **Tetrahed. Lett.** 40, 8689-8692.

LEITÃO,E.A; BITTENCOURT,V; HAIDO,R.M.T; VALENTE, A.P; KATALINIC,J.P; KOENING,S; BARRETO-BERGTER,E (2001) β -galactofuranose containing O-linked oligosaccharides present in cell wall peptidogalactomanan of *Aspergillus fumigatus* bear immunodominant epitopes. Anais da XXX^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Resumo M-54.

LEVERY ,S.B; TOLEDO,M.S; SUZUKI,E; SALYAN,M.E; HAKAMORI,S; STRAUS,A.H; TAKAHASHI,H.K (1996) Structural characterization of new galactofuranose-containing glycolipid antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 222 (2), 639-645.

LEVERY,S.B; TOLEDO,M.S; STRAUS,A.H; TAKAHASHI,H.K (1998)Structure elucidation of sphingolipids from the mycopathogen *Paracoccidioides brasiliensis* immunodominant beta-galactofuranose residue is carried by novel glycosylinositolphosphorylceramide antigen. **Biochemistry** 37 (24), 8764-8775.

LOPES,M.F; DOS REIS,G.A. (1996) *Trypanosoma cruzi* induced immunosuppression selective triggering of CD₄⁺ T cell death by the cell receptor CD₃ pathway and not by the CD₉ or Ly 6 activation pathway. **Infect. Immun.** 64, 1559-1564.

LUQUETTI, A.O (1997) Etiological tratament for Chagas' disease. **Parasitol. Today** 13, 127-128.

MARINO,C; CANCIO,M.J;VARELA,O; LEDERKREMER,R.M (1995) Synthesis of 4-methylcoumarin-7-yl β -D-galactofuranoside, afluorogenic substrate for galactofuranosidase. **Carbohydr. Res.** 276, 209-213.

MARINO,C; MARINO,K; MILETTI,L.C; ALVES,M.J.M; COLLI,W; LEDERKREMER,R.M. (1998) 1-Thio- β -D-galactofuranosides: synthesis and evaluation as β -D-galactofuranosidase inhibitors. **Glycobiology** 8 (9) 901-904.

MARINO,C; HERCZEGH,P; LEDERKREMER,R.M (2001) Synthesis of beta-D-galactofuranosyl nucleoside analogues. A new type of beta-D-galactofuranosidase inhibitor. **Carbohydr Res.** 333 (2), 123-8.

McCONVILLE,M.J; THOMAS-OATES,JE; FERGUSON,MA, HOMANS,SW (1990) Structure of lipophosphoglycan from *Leishmania major*. **J. Biol. Chem.** 265 (32), 19611-19623.

McMAHON,S.A; LEONARD,G.A; BUCHANA,L.V; GIRAUD,M-F; NAISMITH,J.H (1999) Initiating acryystallographic study of UDP-galctopyranose mutase from *Escherichia coli*. **Acta Cryst.** D55, 309-402

McNEIL,M; WALLNER,S.J; HUNTER,S.W; BRENNAN,P.J (1987) Demonstration that galactosyl and arabinosyl residues in the cell-wall arabinogalactan of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* are furanoid. **Carbohydr Res.** 166, 299-308.

MENDELZON,D.H; PARODI,A J (1986) N-linked high manose-type oligosaccharides in protozoa *Crithidia fasciculata* and *Crithidia harmonosa* contain galactofuranose residues. **J. Biol. Chem.** 261 (5), 2129-2133.

MENDONÇA-PREVIATO,L; GORIN,P.A.J; TRAVASSOS,L.R. (1980) Galactose-containing polysaccharides from the humam pathogens *Sporothrix schenckii* and *Ceraticyistis stenoceras*. **Infect. Immun.** 29, 934-939.

MENDONÇA-PREVIATO,L; GORIN,P.A.J; BRAGA,A.F; SHARFSTEIN,J; PRVIATO,J.O. (1983) Chemical structure and antigenic aspects of complexes obtained from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemistry** 22, 4980

MERELLO,S; XAVIER;M.T; PARODI,A.J. (1995) The presence of galactofuranose and ribose units N-asparagine-linked oligosaccharides of the digenetic trypanosomatid *Endotrypanum schaudinni*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 69, 73-79.

MILETTI, L.C; MARINO, C; MARINO, K; LEDERKREMER, R.M; COLLI, W; ALVES, M.J.M. (1999) Immobilized 4-aminophenyl β -D-galactofuranoside as a matrix for affinity purification of β -D-galactofuranosidase. **Carbohydr Res.** 320, 176-182.

MILETTI, L.C; ALMEIDA-DE FARIA,M.; COLLI, W; ALVES, M.J.M. (2001) Immunocytochemical and biochemical detection of α -L-fucosidase in *Trypanosoma cruzi*. (submetido)

MOORE,G.S; JAIVEN,D.M. (1979) Mycology for the clinical laboratory pg 53, Reston Publish

MORAES,C.T; BOSCH,M; PARODI,A.J. (1988) Structural characterization of several galactofuranose-containing high-mannose-type oligosaccharide present in glycoproteins of the trypanosomatid *Leptomonas samueli*. **Biochemistry** 27, 1543-1549.

MORRISSEY, J. H. (1981) Silver Stain for proyeins in polyacrilamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Anal. Biochem.** 117 ,307-310

MURTA,A.C.M; PERSECHINI,P.M; SOUTO-PADRON,T; DE SOUZA,W; GUIMARÃES,J.A; SCHARFSTEIN,J. (1990) Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase **Mol. Biochem. Parasitol.** 43, 27-38.

MIKUSOVÁ,K; YAGI,T; STERN,R; McNEIL,M.R;BESRA,G.S; CRICK,D.C; BRENNAN,P.J (2000) Biosynthesis of the galactan component of *Mycobacterial* cell wall. **J. Biol. Chem.** 275 (43), 33890-33897.

NAGAOKA,M; HASHIMOTO,S; SHIBATA,H; KIMURA,I; KIMURA,K; SAWADA,H; YOKOKURA,T (1996) Structure of a galactan from cell walls of *Bifidobacterium catenulatum* YIT4016. **Carbohydr Res.** 281 (2), 285-291.

NASSAU,P.A; MARTIN,S.L; BROWN,R.E; WESTON,A; MONSEY,D; McNEIL,M.R; DUNCAN,K. (1996) Galactofuranose biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: identification and cloning of UDP-Galactopyranose mutase. **J. Bacteriol.** 178, 1047-1052.

NORIS,K.A HARTH,G; SO,M. (1989) Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. **Infect. Immunol.** 57, 2372

NORIS,K.A; BRADT,B; COOPER,N.R; SO,M. (1991) Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. **J. Immunol.** 147, 2240

NOTERMANS,S; VEENEMAN,H; VAN ZUYLEN,C.W.E.M; HOOGERHOUT,P; VANBOOM,J.H (1988) (1-5)-linked β -D-galactofuranosides are immunodominant in extracellular polysaccharides of *Penicillium* and *Aspergillus* species. **Mol. Immunol.** 25 (10), 975-979.

OHTA,M; EMI,S; IWAMOTO,H; HIROSE,J; HIROMI,K; ITOH,H; SHIN,T; MURAO,S; MATSUURA,F; (1996) Novel beta-D-galactofuranose-containing high mannose type oligosaccharides in ascorbate oxidase from *Acremonium* sp HI-25. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 60 (7), 1123-1130.

OLAFSDOTTIR,E.S; OMARSDOTTIR,S; PAULSEN,B.S; JURCIC,K; WAGNER,H (1999) Rhamnopyranosylgalactofuranan, a new immunologically active polysaccharide from *Thamnia subuliformis*. **Phytomedicine** 6 (4), 273-279.

ORTEGA-BARRIA,E. & PEREIRA,M.E.A. (1992) Entry of *Trypanosoma cruzi* into eukariotic cells. **Infect. Agents Dis.** 1, 136

OUASSI,M.A; TAIBI,A; CORNETTE,J; VELGE,P; MARTY,B; LOYENS,M; ESTEVA,M; RIZVI,F.S; CAPRON,A. (1990) Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. **Parasitology** 100, 115.

PAN,F; JACKSON,M;MA,Y; McNEIL,M (2001) Cell wall core galactofuram synthesis is essential for growth of mycobacteria. **J. Bacteriol.** 183 (13), 3391-3398.

PARODI,A.J. (1993) N-glycosilation in trypanosomatid protozoa. **Glycobiology** 3, 193-199.

PEREIRA-CHIOCCOLA,V.L; ACOSTA-SERRANO,A; ALMEIDA,I.C; FERGUSON,M.A.J; SOUTO-PADRON,T; RODRIGUES,M.M; TRAVASSOS,L.R; SCHENKMAN,S (2000) Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti- α -galactosyl antibodies. **J. Cell Sci.** 113, 1299-1307.

PERRY,M.B; *(1990) Structural analysis of the lipopolisaccharide of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. **Biochem Cell Biol.** 69 (4), 808-810.

PETRY,K. VOISIN,P.J; BALTZ,T; LABOUESSE,J. (1987) Common epitopes to *Trypanosoma cruzi*, *T. dionisii*, *T. vespertilionis*, astrocytes and neurons. **J. Neuroimmunol.** 16, 237.

PETRY,K; NUDELMAN,E; EISEN,H; HAKOMORI,S. (1988) Sulfated lipids represent common antigens on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes into fibroblastic cells. **Mol. Biochem. Parasitol.** 22, 135.

PETERSON,G.L (1983) Coomassie blue dye binding protein quantification method. **Methods Enzymol.** 91, 108-110.

PIERCE,R.J; SPICK,G; MONTREUIL,J. (1979) Cytossolic localization of endo N-acetil- β -D-glucoraminidase activity in rat liver and kidney. **Biochem. J.** 180, 673-676.

PIMENTA,P.F.P; SARAIVA,E.M.B; ROWTON,E; MODI,G.D; GARRAYAY,L.A; BEVERLEY,S.M; TURCO,S.J; SACKS,D.L (1994) Evidence that vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in surface lipophosphoglycan. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 91, 9155-9159

PLACKETT,P & BUTTERY,S.H (1964) Galactofuranose disaccharide from galactan of *Mycoplasma mycoides*. **Biochem. J.** 90 (1), 201

PLETCHER,C; LOHMAR,P.D; GANDER,J.E (1981) Factors affecting the accumulation of exocellular exo- β -D-galactofuranosidase and other enzymes from *Penicillium charlesii*. **Exp. Mycol.** 5, 133-139.

POLEVICK,G.D; AFFRANCHINO,J.L FRASCH,A.C.C; SANCHEZ,D.O. (1991) The complete sequence of shed acute-phase antigen of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 47, 247.

POLEVICK,G.D; DI NOIA,J.M; SALTO,M.L; LIMA,C; LEGUIZAMÓN,M.S; LEDERKREMER,R.M; FRASCH,A.C.C (2000) *Trypanosoma cruzi* surface mucins with exposed variant epitopes. **J. Biol. Chem.** 275 (36), 27671-27680.

PRESTON,J.F & GANDER,J.E (1968) Isolation and partial characterization of extracellular polysaccharides of *Penicillium charlesii*. **Arch. Biochem. Biophys.** 124, 504-512.

PREVIATO,J.O; GORIN,P.A J, MAZUREK,M; XAVIER,M.T; FOURNET,B; WIERUSZESK,J.M; MENDONÇA-PREVIATO,L. (1990) Primary structure of the oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.** 265, 2518-2526.

PREVIATO,J.O; JONES,C; GONÇALVES,L.P.B; WAIT,R; TRAVASSOS,L.R; MENDONÇA-PREVIATO,L. (1994) O-glycosidically linked N-acetylglucosamine-bound oligocaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J.** 301, 151-159.

PREVIATO,J.O; JONES,C; XAVIER,M.T; WAIT,R; TRAVASSOS,L.R; PARODI, A. J; MENDONÇA-PREVIATO,L. (1995) Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane anchored glycoprotein from epimastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.** 270, 7241-7250.

PREVIATO,J.O; JONES,C; WAIT,R; ROUTIER,F; SARAIVA,E; MENDONÇA-PREVIATO,L. (1997) *Leishmania adleri*, a lizard parasite, expresses structurally similar glycoinositolphospholipids to mammalian *Leishmania*. **Glycobiology** 7 (5), 687-695.

PRIETO,A; BERNABE,M; LEAL,J-A (1995) Isolation, purification and chemical characterization of alkali-extractable polysaccharides from the cell walls of *Talaromyces* species. **Mycol. Res.** 99 (1), 69-75.

RAMIREZ,M.I; RUIZ,R. de C; ARAYA,J.E; DA SILVEIRA,J.F; YOSHIDA,N. (1993) Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infect. Immun.** 61, 3636-3641.

RAMLI,N; FUJINAGA,M; TABUCHI,M; TAKEGAWA,T; IWAHARA,S (1995) Isolation and characterization of a novel endo β -D-galactofuranosidase from *Bacillus* sp. **Biosci. Biotech. Biochem.** 59, 1856-60.

RANDELL,K.D; JOHNSTON,B.D; BROWN,PN; PINTO,B.M (2000) Synthesis of galactofuranosyl-containing oligosaccharides corresponding to the glycosylinositolphospholipid of *Trypanosoma cruzi*. **Carbohydr. Res.** 325, 253-264.

RANDELL,K.D; JOHNSTON,B.D; LEE,E.E; PINTO,B.M (2000) Synthesis of oligosaccharide fragments of the glycosylinositolphospholipid of *Trypanosoma cruzi*: a new selenoglycoside glycosyl donor for the preparation of 4-thiogalactofuranosyl analogues. **Tetrahed: Asymmetry** 11, 207-222.

RASSI, A. & LUQUETTI, A.O. (1992) Therapy of Chagas disease. In: **Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. Wendel, S. *et al* ed.; Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia: São Paulo, p.237-247.

RASSI,A; TRANCHESI,B; TRANCHESI,J. (1976) Doença de Chagas In VERONESI,R. **Doenças Infecciosas e parasitárias** Guanabara -Koogan, Rio de Janeiro

REYES,F; ALFONSO,C; MARTINEZ,M.J; PRIETO,A; SANTAMARIA,F; LEAL,J.A (1992) Purification of a new galactanase from *Penicillium oxalicum* catalysing the hydrolysis of β -(1-5)-galactofuran linkages. **Biochem J.** 281, 657-660.

RIETSCHEL-BERST,M; JENTOFF,N.H; RICK,P.D; PLETCHER,C; FANG,F; GANDER,J.E (1977) Extracellular exo- β -galactofuranosidase from *Penicillium charlesii*. **J. Biol. Chem.** 252, 3219-3226.

ROETHLISBERGER,P; IIDA-TANAKA,N; HOLLEMEYER,K; HEINZLE,E; ISHIZUKA,I; FISCHER,W; (2000) Unique poly(glycerophosphate) lipoteichoic acid and the glycolipids of a *Streptococcus* sp closely related to *Streptococcus pneumoniae*. **Eur. J. Biochem.** 267, 5520-5530.

SAMSON,R.A; HOEKSTRA,E.S; VAN OORSCHOT,C. A. N (1984) Introduction to food-borne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands

SARVAS,M. AND NIKAIDO,H. (1971) Biosynthesis of T1 antigen in *Salmonella* origin of D-galactofuranose and D-ribofuranose residue. **J. Bacteriol.** 105, 1063-1072.

SCHARFSTEIN,J; LUQUETTI,A; MURTA,A.C.M; SENNA,M; REZENDE,J.M; RASSI,A; MENDONÇA-PREVIATO,L. (1985) Chagas' disease: serodiagnosis with purified Gp25 antigen. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 34, 1153.

SCHARFSTEIN,J; SCHECHTER,M; SENNA,M; PERALTA,J.M; MENDONÇA-PREVIATO,L; MILES,M.A. (1986) *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of a 57/51,000 MW surface glycoprotein (Gp57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. **J. Immunol.** 137, 1336.

SCHENKMAN,S; JIANG,M-S; HARTH,G.W; NUSSENZWEIG,V. (1991) A novel cell surface trans-sialisase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell** 65, 1117-1125

SCHENKMAN,S; PONTES DE CARVALHO,L; NUSSENZWEIG,V. (1992) *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. **J. Exp. Med.** 175, 567

SCHENKMAN,S; FERGUSON,M.A.J; HEISE,N; ALMEIDA,M.L.C; MORTARA,R; YOSHIDA,N. (1993) Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalysed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 59, 293-304.

SCHAUER,R; REUTER,G; MÜHLPFORDT,H; ANDRADE,A.F.B; PEREIRA,M.E.A. (1983) The occurrence of N-acetyl and N-glicosylneuramic acid in *Trypanosoma cruzi*. **Hoppe-Seyler'sz Physiol. Chem.** 364, 1053-1057.

SCHIRMER, R.H; MÜLLER, J.G. & KRAUTH-SIEGEL, R.L. (1995) Disulfide-reductase inhibitors as chemotherapeutic agents: the design of drugs for trypanosomiasis and malaria. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** 34, 141-154.

SCHMUNIS,G.A. (1996) Interruption of Chagas' disease transmission through vector elimination. **Lancet** 348, 1171.

SEGURA,E.L & CAZZULO,J.J. (1985) Antigenic characterization of *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 18, 47-51.

SHASKOV,A.S; TUL'SKAYA,E.M; EVTUSHENKO,L.I; NAUMOVA,I.B (1999) A teichoic acid of *Nocardioides albus* VKM Ac-805-T cell walls **Biochemistry (Mosc)** 64 (11), 1305-1309.

SHASKOV,A.S; TUL'SKAYA,E.M; EVTUSHENKO,L.I; GRATCHEV, A.A; NAUMOVA,I.B (2000) Structure of teichoic acid from *Nocardioides luteus* VKM Ac-1246-T cell wall. **Biochemistry (Mosc)** 65 (4), 509-514.

SHER,A & SNARY,D. (1982) Specific inhibition of morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* by a monoclonal antibody. **Nature** 300, 639

SNARY,D; FERGUSON,M.A.J; SCOTT,M.T; ALLEN,A.K. (1981) Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*; use of monoclonal antibodies to identify and isolate an specific glycoprotein. **Mol. Biochem. Parasitol.** 3, 343-358

SNARY,D. (1983) Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 77, 126.

SOARES,R.M; ANGLUSTER,J; de SOUZA W; ALVIANO,C.S (1995) Carbohydrate and lipid components of hyphae and conidia of human pathogen *Fonsecaea pedrosoi*. **Mycopathologia** 132 (2), 71-77.

SOERUM,U; ROBERTESEN,B. (1994) Chemical and immunogenic properties of a polysacharide from the cell wall of *Renibacterium salmonarium*. **Int. Symp. Aquat. Anim. Health** p. W-14.1.

SPENCER,H.C; ALLAIN,D.S; SULZER,A.J. (1985) Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Trypanosoma cruzi*. **Americ. J. Trop. Med. Hyg.** 29, 179-182.

STEIGER,R.F; VAN HOOFF,F; BONTEMPS,J; NYSSSENS-JADIN,M; DRUETZ,J-E. (1979) Acid hydrolases of trypanosomatid flagellates. **Acta Trop.** 36, 335-341.

STYNEN,D; SARFATI,J; GORIS,A; PRÉVOST,M-C; LESOURD,M; KAMPHIUS,H; DARRAS,V; LATGÉ,J-P. (1992) Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus* galactomannan. **Infec. Immun.** 60 (6), 2237-2245.

SUZUKI,E; TOLEDO,M.S; TAKAHASHI,H.K; STRAUSS,A.H (1997) A monoclonal antibody directed to terminal residue of β -galactofuranose of a glycolid antigen from *Paracoccidioides brasiliensis*: cross reactive with *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi*. **Glycobiology** 7, 463-468.

SWARD-NORDMO M, PAULSEN, B.S; WOLD, J.K; WEHLER, T; JANSSON, P.E. (1991) Further structural studies of the carbohydrate moiety of the allergen Ag-54 (Cla h II) from the mould *Cladosporium herbarum*. **Carbohydr. Res.** 214 (2), 267-279.

TAKAYANAGI,T; KIMURA,A; CHIBA,S; AJISAKA,K (1994) Novel structures of N-linked high-mannose type oligosaccharides containing α -D-galactofuranosyl linkages in *Aspergillus niger* α -D-glucosidase. **Carbohydr. Res.** 256, 149-158.

TEIXEIRA,M.G; YOSHIDA,N. (1986) Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigote of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. **Mol. Biochem. Parasitol.** 18, 271.

TOLEDO,M.S; SUZUKI,E; STRAUS,A.H; TAKAHASHI,H.K (1995) Glycolipds from Paracoccidioides brasiliensis. Isolation of galactofuranose-containing reactive with sera of patients with paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.** 33(4), 247-251.

TONE-SHIMOKAWA, Y; TOIDA, T; KAWASHIMA, T. (1996) Isolation and structural anaysis of polysaccharide containing galactofuranose from cell wall of *Bifidobacterium infantis*. **J. Bacteriol.** 178 (1), 317-320.

TOWBIN,H; STACHELIN,T; GORDAN.J. (1979) Eletrophoretic tranfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76,4350-4354.

TRAVASSOS,L.R; ALMEIDA,I.C. (1993) Carbohydrate immunity in American trypanosomiasis. **Springer Semin. Immunopathol.** 15, 183-204.

TREJO,A.G; HADDOCK, J.W; CHITTENDEN,G.J.F; BADDILEY,J (1971) The biosynthesis of galactofuranosyl residues in galactocaralose. **Biochem J.** 122(1), 49-57.

TREVELYAN,W.M; (1950) Detection of sugar on paper chromatograms. **Nature** 166, 444-445.

TSUJI,S; UEHORI,J; MATSUMOTO,M; SUZUKI,Y; MATSUHISA,A; TOYOSHIMA,K; SEYA,T (2001) Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall. **J. Biol. Chem.** 276 (26) 23456-23463.

TURCO,S.J; DESCOATEUX,A. (1992) The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Ann. Rev. Microbiol.** 46, 65-94.

UNKEFER,C.J; GANDER,J.E. (1990) The 5-O- β -D-galactofuranosil-containing peptidophosphogalactomannan of *Penicillium charlesii*. **J. Biol. Chem.** 265, 685-689.

URASHIMA,T; ARIGA,H; SAITO,T; NAKAMURA,T; TANAKA,S; ARAI,S (1999) Exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. **Milchwissenschaft-Milk Sci. Int.** 54 (4), 190-193.

URBINA,J.A (1997) Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology** 114 suppl:S91-9

URBINA,J.A (1999) Chemotherapy of Chagas'disease: the how and the why. **J. Mol. Med.** 77 (3), 332-338.

VAN BRUGGEN-VAN DER LUGT,A.W; KAMPHIUS,H.J; DE RUITTER,G.A; MISCHNICK,P; VAN BOOM,J.H; ROMBOUTS,F.M. (1992) New structural features of the antigenic extracellular polysaccharides of *Penicillium* and *Aspergillus* species revealed with exo- β -D-galactofuranosidase. **J. Bacteriol.** 174 (19), 6096-6102.

VANDEKERCKHOVE,F; SCHENKMAN,S; PONTES DE CARVALHO,L; TOMLINSON,S; KISO,M; YOSHIDA,M; HASEGAWA,A; NUSSENZWEIG,V. (1992) Substrate specificity of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Glycobiology** 2, 541-548.

VARELA,O; MARINO,C; LEDERKREMER,R.M (1986) Synthesis of p-nitrophenil beta-D-galactofuranose: a convenient substrate of beta-galactofuranosidase. **Carbohydr. Res.** 155, 247-251.

VILKAS,E; AMAR,C; MARKOVITS,J; VLIEGENHART,J.F; KAMERLING,JP. (1973) Occurrence of a galactofuranose disaccharide in immunoadjuvant fractions of *Mycobacterium tuberculosis* (Cell walls and wax D). **Biochim. Biophys Acta** 297 (2), 423-435.

VINCENT,S.J.F; FABER,E.J; NEESR,J-R; STINGELE,F; KAMERLING,JP (2001) Structure and properties of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus macedonicus* Sc136. **Glycobiology** 11 (2), 131-139.

WALLIS,G.L; SWIFT,R.J; HEMMING,F.W; TRINCI, A.P;PEBERDY,J.F (1999) Glucoamylase overexpression and secretion in *Aspergillus niger*. analysis of glycosilation. **Biochim. Biophys Acta** 1472 (3), 576-586.

WALLIS,G.L.F; HEMMING,F.W; PEBERDY,J.F (2001) An extracellular β -galactofuranosidase from *Aspergillus niger* and its use as tool for glycoconjugates analysis. *Biochim Biophys Acta*. 1525, 19-28

WESSELS,J.G.H (1994) Developmental regulation of fungal cell wall formation. **Ann. Rev. Phytopathol.** 32, 413-437.

WESTON,A; STERN,R.J; LEE,R.E; NASSAU,P.M; MONSEY,D; MARTIN,S.L, SCHERMAN,M.S; BESRA,G.S; DUNCAN,K; McNEIL,M.R (1998) Biosynthetic origin of mycobacterial cell wall galactofuranosyl residues. **Tubercle and Lung disease** 78 (4), 123-131.

WHITFIELD,C., RICHARDS,J.C., PERRY,M.B; MACLEAN,L.L. (1991) Expression of two structurally distinct D-galactan O antigens in the lipopolysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* serotype 01. **J. Bacteriol.** 173 (4), 1420-1431.

WORANOVICZ,S.M; GORIN,P.A.J; MARCELLI,M.P; TORRI,G; IACOMINI,M (1997) Structural studies on galactomannans of lichens of the genus *Cladonia*.. **Lichenologist** 29, 471-481.

YAMAMOTO,Y; NUNOME,T; YAMAUCHI,R; KATO,K; SONE,Y (1995) Structure of an exocellular polysaccharide of *Lactobacillus helveticus* TN-4, a spontaneous mutant strain of *Lactobacillus helveticus* TY1-2. **Carbohydr. Res.** 275 (2), 319-332.

YOSHIDA,N; MORTARA,R.A; ARAGUTH,M; GONZALEZ,J.C; RUSSO,M. (1989) Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35 and 50 kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.** 57, 1663.

YOSHIDA,N; BLANCO,S.A; ARAGUTH,M.F; RUSSO,M; GONZALEZ,J. (1990) The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigote of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 39, 39.

ZHANG,Q; LIU,H-W; (2000) Studies of UDP-galactopyranose mutase from *Escherichia coli*: An unusual role of reduced FAD in its catalysis. **J. Am. Chem. Soc.** 122, 9065-9070.

ZHANG,Q; LIU,H-W; (2001) Chemical synthesis of UDP- β -L-arabinofuranose and its turnover to UDP- β -L-arabinopyranose by UDP-galactopyranose mutase. **Biorg. Med. Chem. Lett.** 11, 145-149.

ZINGALES,B & COLLI,W (1985) *Trypanosoma cruzi* interaction with host cells. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 117, 129.