UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Recebido em 26/11/03

Filipe

Liliana OK

12/01/02

**Antígeno B13 de *Trypanosoma cruzi*: estudo
imunológico e estrutural do reconhecimento por
anticorpos de pacientes chagásicos e polimorfismo do
gene correspondente**

MÁRCIA APARECIDA DURANTI

TESE DE DOUTORADO

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. BIANCA
ZINGALES**

2000

93.1804192
951a

804192
a

INSTITUTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
19943

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
19943

INSTITUTO DE QUÍMICA

**Antígeno B13 de *Trypanosoma cruzi*: estudo imunológico
e estrutural do reconhecimento por anticorpos de
pacientes chagásicos e polimorfismo do gene
correspondente**

MÁRCIA APARECIDA DURANTI

Tese de doutoramento 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

ORIENTADORA: PROFa. DRa. BIANCA S. ZINGALES

São Paulo

2000

**"Antígeno B13 de *Trypanosoma cruzi*. Estudo
Imunológico e Estrutural do Reconhecimento por Anticorpos
de Pacientes Chagásicos e Polimorfismo do Gene
Correspondente"**

MARCIA APARECIDA DURANTI

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

Aprovada por:

Profa. Dra. BIANCA SILVANA ZINGALES
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. WALTER RIBEIRO TERRA
IQ - USP

Profa. Dra. ISES DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN
ICB - USP

Prof. Dr. IGOR CORREIA DE ALMEIDA
ICB - USP

Prof. Dr. SÉRGIO SCHENKMAN
UNIFESP

SÃO PAULO
15 DE DEZEMBRO DE 2000.

A meus pais Pedro e Izolete

Ao meu afilhado João Vitor

AGRADECIMENTOS

À Profa. Doutora. Bianca Zingales por ter aceito participar desse ousado projeto multidisciplinar, com a sabedoria, competência e responsabilidade de quem sabe que é parte do seleto grupo de pessoas que tem o compromisso de formar "gente". Minha profunda admiração pela educadora, cientista, formadora de opiniões que, com seu otimismo, seu equilíbrio, sua clareza de idéias e sua intervenção firme na hora certa sempre me motivou e acalmou.

À pessoa e amiga Bianca, com profunda gratidão e respeito, que mesmo em meio às maiores dificuldades nunca deixou de acreditar em mim.

Ao Prof. Doutor Jorge Elias Kalil Filho, pela oportunidade de realizar, em seu Laboratório de Imunologia de Transplantes do InCor, grande parte dos experimentos desse trabalho e por ter me ensinado muito nestes anos de convivência. Minha admiração por sua capacidade de liderança como cientista e profissional.

Ao Dr. Jorge Neumann, a primeira pessoa com quem trabalhei no Laboratório de Imunologia de Transplantes do InCor, e que me mostrou o fascinante mundo da bioquímica das proteínas. Pelo seu apoio e incentivo nos meus primeiros anos de pesquisa na área de imunologia e pela amizade.

Ao Edécio Cunha-Neto, primeiro parceiro, depois co-orientador e amigo, por todos esses anos de convivência e a quem devo muito do meu aprendizado em imunologia. Por suas sugestões, idéias, críticas e conselhos. Nossas discussões sempre foram motivo de amadurecimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Arthur Gruber, pelo clone da proteína B13, estrela maior desta tese, por ter ensinado todos os passos da produção e purificação da mesma, bem como por suas sugestões e questionamentos.

Ao Prof. Alberto Spisni da Universidade de Parma, Itália, pelos experimentos de CD e RNM dos peptídeos de B13 e pela ajuda na interpretação dos resultados e que muito nos ensinou com relação à estrutura conformacional de peptídeos e proteínas.

A Profa. Dra. Eufrozina Umezawa do Instituto de Medicina Tropical pelos soros de pacientes chagásicos de vários países da América Central e do Sul e pelas sugestões nos ensaios de ELISA.

Ao pessoal do laboratório do Prof. Juliano da EPM que me receberam com simpatia e sempre estiveram dispostos a ajudar. Ao Prof. Luis Juliano pela oportunidade de aprender um pouquinho de síntese e caracterização de peptídeos, matéria-prima que se mostrou tão importante neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório da Profa. Bianca: Bia, Nancy, Clara, Fernando, Ritchie, Aurélio, Arnaldo e Marcelo que me receberam de braços abertos, sempre tão gentis e prestativos e com muita paciência e atenção me ajudaram no aprendizado de Biologia Molecular.

Às Dras. Luiza Guglielmi, Anna Carla Goldberg e Verônica Coelho sempre atentas e prontas a discutir os resultados, lançando idéias e questionamentos que muito contribuíram para a correta interpretação dos mesmos.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia de Transplantes do Incor: Moniquinha, Malu, Iolanda, Sandra Maria, Clarissa, Sandra Emiko, Sandra Drigo, Selma, Idânia, Claudia, Rose, Marly, Ivete, Hércio, Douglas, Chico, Germano, Marcelo, Carlos Sérgio, Nicolas, Cristiano, Ana Paula, Sérgio, Renata, Joyce, Max, Carlos Aita, Karina, Lúcia Abel, Simone, Angelina e Danielle, Iasi, José Roberto e Elias, alguns envolvidos diretamente na realização, interpretação ou suporte dos experimentos e outros indiretamente com sua amizade e incentivo.

Ao meu amigo Leozinho parceiro de peptídeos, experimentos, questionamentos, sempre solícito e disponível em todos os momentos.

À minha querida amiga Claudinha, minha maior fã, que sempre esteve presente em todos os momentos com seu apoio e seu carinho nos momentos difíceis e, com seu entusiasmo e admiração, nos momentos de conquista.

À Fabiana, minha amiga e afilhada, por estar sempre por perto quando precisei, pelo colo, pela comidinha da vó Nenê e pela amizade.

Às pessoas mais recentes na minha vida mas que na fase final sempre me entusiasmaram e me deram total abertura e apoio para que eu tivesse tranquilidade para terminar meu trabalho. Ao Sr. Mário Palla e ao Marcos Vinícius pelo incentivo e pela compreensão em todos os momentos em que tive que me ausentar da empresa. E a todos aqueles que torceram muito por mim: Josely, Rita, Flavinha, Sílvia e Hector.

Aos meus pais, Lete e Pedro, que apesar de me quererem por perto sempre sentiram orgulho

pela minha obstinação e pela minha coragem em enfrentar a "cidade grande". Às minhas irmãs Marciana e Adriana e aos meus irmãos Marciano e Marcelino que apesar de terem escolhido caminhos tão diversos para suas vidas sempre respeitaram e se entusiasmaram com minha escolha.

Ao meu sobrinho e afilhado João Vítor que trouxe tanta alegria e esperança para toda a família.

Aos meus amigos Mariana e Cleber que estiveram presentes em todos os momentos.

A minha sobrinha Miriã para quem a tia sempre foi um estímulo para continuar estudando.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma conviveram e estiveram comigo nesta caminhada.

Ao CNPq pela bolsa.

"E aprendi que se depende sempre de tanta, muita, diferente gente.

Toda pessoa sempre é a marca das lições diárias de outras tantas pessoas."

(Gonzaguinha)

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
ABREVIACÕES	iv
RESUMO	v
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas	01
1.2 Características do <i>Trypanosoma cruzi</i>	02
1.3 Heterogeneidade das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	04
1.4 Fases e formas clínicas da Doença de Chagas	05
1.5 Diagnóstico da Doença de Chagas	06
1.5.1 Diagnóstico parasitológico	07
1.5.2 Diagnóstico sorológico	09
1.6 Estrutura e função dos domínios repetitivos de antígenos protéicos de parasitas	16
1.7 Origem dos domínios repetitivos de antígenos parasitários	19
1.8 A proteína recombinante B13	20
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Reagentes e soluções	25
3.2 Meios de cultura	26
3.2.1 Para <i>Escherichia coli</i>	26
3.2.2 Para <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
3.3 Bactérias	26
3.3.1 Genótipos da linhagem de <i>Escherichia coli</i> utilizada	26
3.4 Vetores de clonagem	26
3.5 Soros	27
3.6 Tipagem HLA	27
3.6.1 Determinação dos antígenos HLA-DRB1 e DQB1 por PCR-SSP e por PCR-SSO	27

3.6.2	Extração de DNA	28
3.6.3	Determinação dos antígenos HLA-DRB1 e DQB1 por PCR-SSP	28
3.6.4	Determinação dos antígenos HLA-DQ α por PCR-SSO	29
3.7	Peptídeos sintéticos	29
3.7.1	Caracterização dos peptídeos sintéticos	30
3.7.1.1	Cromatografia líquida de alta pressão - HPLC	30
3.7.1.2	Espectrometria de massa - MALDI - TOF	31
3.7.1.3	Seqüenciamento automático N-terminal	31
3.8	Parasitas	32
3.8.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	32
3.8.2	Cultivo de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
3.8.3	Purificação de DNA genômico dos parasitas	33
3.9	Enzimas	34
3.10	Oligonucleotídeos	34
3.11	Nucleotídeos radioativos	37
3.12	Obtenção da proteína recombinante B13	37
3.12.1	Preparação de células bacterianas competentes e transformação	37
3.12.2	Expressão da proteína de fusão β -galactosidase-B13	37
3.12.3	Obtenção do lisado bacteriano	38
3.12.4	Purificação da proteína recombinante B13	38
3.12.5	Detecção da atividade de β -galactosidase	39
3.12.6	Eliminação de lipopolissacarídeos (LPS) da preparação da proteína recombinante B13 por cromatografia de afinidade	39
3.12.7	Eletroforese unidimensional de proteínas em SDS-PAGE para coloração de LPS	39
3.13	Análise de proteínas em SDS-PAGE	40
3.13.1	Eletroforese unidimensional de proteínas em SDS-PAGE	40
3.13.2	Western blot	41
3.14	Testes de ELISA	41
3.14.1	Testes de ELISA direto com B13	41
3.14.2	Testes de ELISA de competição com peptídeos sintéticos	42
3.14.3	Determinação de subclasse de imunoglobulina G	42
3.15	Análise estrutural por DC e RNM	43

3.16	PCR	43
3.16.1	Reação de PCR	43
3.16.2	Análise dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose	44
3.16.3	Clonagem de produtos de PCR	44
3.17	Southern blot	45
3.17.1	Obtenção de sondas radioativas	45
3.17.2	Hibridização e lavagem da membrana	46
3.18	Eletroforese em Campo Pulsado	46
3.19	Clonagem do inserto H5H6 do gene B13	47
3.19.1	Purificação do inserto para posterior ligação	48
3.19.2	Ligação e transferência	48
3.19.3	Speed Prep de DNA plasmidial	48
3.19.4	Mid Prep de DNA plasmidial	49
3.19.5	Preparação de plasmídeos em larga escala	49
3.20	Seqüenciamento	50
3.20.1	Preparação da amostra	50
3.20.2	Reação de seqüenciamento	51
3.20.3	Gel de seqüenciamento	51
3.20.4	Análise computacional dos dados das seqüências obtidas	52
3.20.4.1	Programa DNAsis	52
3.20.4.2	Programa de alinhamento de seqüências	52
3.20.4.3	Recuperação de seqüências pelo Network Entrez	52
3.21	Análise estatística	52
4.	RESULTADOS	53
PARTE A – Caracterização da resposta de anticorpos à proteína recombinante B13		53
4.1	Obtenção e caracterização da proteína recombinante B13	53
4.1.1	Obtenção e purificação da proteína recombinante B13	53
4.1.2	ELISA direto com a proteína recombinante B13	53
4.1.3	Cromatografia de afinidade em coluna de Polimixina B agarose	54
4.1.4	Padronização do teste de ELISA com B13	55

4.1.5	Reatividade da proteína recombinante B13 em ELISA direto com soros Chagásicos e Normais	56
4.2	Caracterização da resposta humoral à proteína B13	58
4.2.1	Anticorpos anti-B13: Perfil de subclasses de IgG e dependência de linfócitos T	58
4.3	Forma clínica da doença de Chagas e caracterização da resposta à B13	61
4.4	Mapeamento do epitopo de B13	64
4.4.1	Caracterização dos peptídeos sintéticos	64
4.4.2	Mapeamento do epitopo de B13 por ELISA de competição	65
4.5	Análise estrutural por DC e RNM	71
4.6	Reatividade de soros de pacientes chagásicos de países da América Central e do Sul à proteína recombinante B13	75
4.7	Isotipagem de IgG nos soros chagásicos da América Central e do Sul	78
4.8	Mapeamento do epitopo de B13 por ELISA de competição em soros de pacientes chagásicos da América Central e do Sul	79
PARTE B	- Análise do polimorfismo do gene B13 em cepas de <i>T. cruzi</i>	83
4.9	Heterogeneidade do antígeno B13	83
4.10	Distribuição do gene B13 nos cromossomos de diversas cepas do parasita	85
4.11	Arranjo genômico do gene B13	86
4.12	Análise do tamanho da região que contém as repetições seriadas	88
4.13	Seqüenciamento da região 3' das repetições seriadas do gene B13 da cepa Y e análise comparativa com seqüências de genes homólogos	90
4.14	Análise do tamanho da região das repetições seriadas do gene B13 - continuação dos estudos	96
4.15	Seqüência nucleotídica das repetições	99
5.	DISCUSSÃO	102
5.1	Caracterização da resposta de anticorpos anti-B13	102
5.2	Mapeamento e análise estrutural dos epitopos de B13	105

5.3	Análise qualitativa e quantitativa da resposta anti-B13 de soros de pacientes chagásicos de países da América Central e do Sul	108
5.4	Heterogeneidade do gene B13 em cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	110
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	003
Figura 2	Seqüência completa de aminoácidos correspondente ao inserto do gene B13 clonado em pMSgt11.....	021
Figura 3	Distribuição da D.O. de amostras de soros de pacientes chagásicos de diferentes países em ELISA direto com B13-GST.....	022
Figura 4	Seqüência nucleotídica do gene TcCA-2 de um clone da cepa CA-1.....	036
Figura 5	Mapa de restrição da região de 32 kb do genoma de <i>T. cruzi</i> que contém o clone genômico com as seqüências de repetições seriadas de B13.....	047
Figura 6	Análise por eletroforese SDS-PAGE 8% da purificação da proteína recombinante B13.....	054
Figura 7	Análise por eletroforese SDS-PAGE 14%, 4M uréia da proteína recombinante B13 com coloração que revela lipopolissacarídeos.....	055
Figura 8	Titulação da concentração da proteína recombinante B13 em ELISA direto.....	056
Figura 9	Comparação entre a reatividade em ELISA direto de soros Normais e soros Chagásicos com diferentes preparações da proteína recombinante B13.....	057
Figura 10	ELISA direto com B13 em fase sólida com soros de pacientes portadores e não portadores de HLA apresentador da proteína B13 a linfócitos T.....	059
Figura 11	Perfil de subclasses de IgG em soros de pacientes chagásicos brasileiros.....	060
Figura 12	ELISA direto com B13 em fase sólida com soros de pacientes chagásicos cardiopatas (SCC) e pacientes chagásicos indeterminados (SCI).....	061
Figura 13	ELISA direto com B13 em fase sólida com soros de pacientes chagásicos cardiopatas e indeterminados portadores e não portadores de HLA apresentador da proteína B13 a linfócitos T.....	062
Figura 14	Perfil de subclasses de IgG reativas a B13 em soros de pacientes chagásicos brasileiros cardiopatas e indeterminados, portadores e não portadores de HLA apresentador da proteína B13 a linfócitos T.....	063
Figura 15	Distribuição da porcentagem de inibição em ELISA com a proteína recombinante B13 para os peptídeos sintéticos pB13, S4/S5, S4, S5 e hexa pB13.....	069
Figura 16	Espectro de DC dos peptídeos sintéticos pB13, S4 e S5.....	073
Figura 17	Diferenças entre os desvios químicos dos prótons α ($\delta\alpha_{\text{peptídeo}} - \delta\alpha_{\text{rc}}$) observados e "random coil" para os peptídeos pB13, S4 e S5.....	074

Figura 18	Distribuição da D.O. de amostras de soros de pacientes chagásicos de diferentes países em ELISA direto com a proteína recombinante B13 077
Figura 19	Perfil de subclasses de IgG responsáveis pelo reconhecimento da proteína B13 em soros de pacientes chagásicos de diferentes países.....079
Figura 20	Porcentagem de inibição de ELISA com B13 para o peptídeo pB13 com soros de pacientes chagásicos de diferentes países.....080
Figura 21	Porcentagem de inibição de ELISA com B13 para o peptídeo S4 com soros de pacientes chagásicos de diferentes países.....081
Figura 22	Porcentagem de inibição de ELISA com B13 para o peptídeo S5 com soros de pacientes chagásicos de diferentes países.....081
Figura 23	Western blot de lisados de epimastigotas de diferentes cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> incubados com soro de coelho contra a proteína recombinante B13 084
Figura 24	PFGE de cromossomos de cepas de <i>T. cruzi</i> hibridizado com sonda H5H6 do clone B13.....085
Figura 25	Southern blot de DNA de formas epimastigotas de diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> digerido com <i>Hind</i> III e hibridizado com sonda H5H6 do clone B13 086
Figura 26	Seqüência parcial do inserto H5H6 do gene B13 da cepa Y.....091
Figura 27	Alinhamento da seqüência nucleotídica a 3' da região repetitiva do gene B13 (até o sítio de <i>Hind</i> III - H6) da cepa Y com região homóloga do gene TcCA-2 da cepa CA1 093
Figura 28	Alinhamento de aminoácidos da seqüência a 3' das repetições seriadas do gene B13 da cepa Y, TcCA-2 da cepa CA1 e TCR39 da cepa Silvio X10 ...094
Figura 29	Alinhamento da seqüência nucleotídica de B13 da cepa Y com região homóloga do gene TcCA-2 da cepa CA1 desde o ATG inicial até o início das repetições seriadas. 095
Figura 30	Alinhamento da seqüência de aminoácidos de B13 e TcCA-2 desde a metionina inicial até o início das repetições seriadas 095
Figura 31	Comparação da seqüência dos dois pares de oligos.....096
Figura 32	Southern blot de DNA amplificado por PCR com os oligos 5 e 6 e hibridizado com sonda H5H6.....097
Figura 33	Alinhamento da seqüência de aminoácidos obtida a partir do produto de PCR dirigido para a região repetitiva do gene B13 em cepas de <i>T. cruzi</i> 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1A	Antígenos recombinantes de <i>T. cruzi</i> de uso potencial no sorodiagnóstico da doença de Chagas.....	014
Tabela 1B	Seqüências de aminoácidos das unidades repetitivas de antígenos de <i>T. cruzi</i>	015
Tabela 2	Identificação dos peptídeos sintéticos.....	030
Tabela 3	Identificação das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	032
Tabela 4	Média e desvio-padrão das D.Os. de soros de indivíduos normais e chagásicos em ELISA com três preparações de B13	058
Tabela 5	Valores de medianas de concentração de IgG1 (ng/ml) em soros de pacientes chagásicos cardiopatas (SCC) e indeterminados (SCI) nos grupos HLA+ e HLA-.....	064
Tabela 6	PM dos peptídeos sintéticos analisados por espectrometria de massa	065
Tabela 7	Porcentagem de inibição da ligação de anticorpos de pacientes chagásicos à proteína recombinante B13 - Efeito de peptídeos sintéticos.....	067
Tabela 8	Comparação da atividade inibitória de dois lotes do peptídeo S5 em ELISA de competição frente à proteína recombinante B13	071
Tabela 9	Comparação das médias e desvios-padrão obtidos da análise de soros de pacientes chagásicos de diferentes países em ELISA direto com dois tipos de proteína recombinante B13.....	077
Tabela 10	Antígeno(s) reconhecido(s) por soro de coelho anti-proteína B13 da cepa Y em lisados de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	084
Tabela 11	Tamanho da banda de DNA genômico de <i>T. cruzi</i> digerido com <i>Hind</i> III e hibridizado com sonda H5H6	087
Tabela 12	Produto do PCR em cepas de <i>T. cruzi</i> com os oligos 1 e 2 derivados da seqüência do gene TcCA-2 de um clone da cepa CA-1.....	089
Tabela 13	Comparação dos produtos do PCR em diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> amplificados com os oligos 1 e 2 e 5 e 6.....	098
Tabela 14	Variação na seqüência das repetições seriadas do gene B13 em cepas de <i>T. cruzi</i>	101
Tabela 15	Variação da freqüência de resíduos de aminoácidos no motivo FGQAAAGDKPSP.....	107
Tabela 16	Substituição de resíduos de aminoácidos no motivo GQAAAGDK	108

ABREVIações

<i>p</i> APTG	<i>p</i> -aminofenil- β -D-tiogalactopiranosídeo
BSA	albumina bovina sérica
DC	dicroísmo circular
DEAE	dietilaminoetil
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
D.O.	densidade óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	"enzyme-linked immunosorbent assay" (ensaio imunoenzimático)
β -gal	β -galactosidase
GST	glutathione S-transferase
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LIT	infusão de fígado e triptose
MHC	Molecular Histocompatibility Complex (Complexo Maior de Histocompatibilidade)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ONPG	<i>o</i> -nitro- β -D-galactopiranosídeo
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação de polimerização em cadeia
PEG	polietilenoglicol
PFGE	eletroforese de campo pulsado
PM	peso molecular
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
PVP	polivinilpirrolidona
RNM	ressonância nuclear magnética
SCI	soro de paciente chagásico indeterminado
SCC	soro de paciente chagásico cardiopata
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida contendo SDS
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TLCK	N α - <i>p</i> -Tosil-L-lisina clorometil cetona
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tween 20	monolaurato de polioxietilenosorbitana
UV	radiação ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

RESUMO

A proteína recombinante B13 contém repetições seriadas de 12 aminoácidos e corresponde a uma região do antígeno imunodominante de 140-116 KDa encontrado na superfície da forma tripomastigota de *T. cruzi* (cepa Y). A proteína B13 apresenta elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico sorológico da Doença de Chagas. A análise da distribuição de subclasses de IgG anti-B13 em soros de pacientes chagásicos cardiopatas (SCC) e de assintomáticos (SCI) mostrou o mesmo padrão: IgG1>IgG3>IgG2>IgG4. No entanto, a média de reatividade a B13 foi maior no grupo SCC do que no grupo SCI. Dados anteriores de nosso grupo indicam que a resposta de célula T a B13 é restrita ao grupo HLA de classe II (HLA-DQA1*0501, DRB1*0101 and DRB5*0101 - denominado grupo HLA+). Por outro lado, dados da literatura sugerem que antígenos repetitivos de protozoários são antígenos T-independentes. Analisamos por ELISA a reatividade a B13 em soros de pacientes HLA+ e HLA- (portadores de outros alelos). Os resultados obtidos indicam que a média de reatividade a B13 é semelhante nos dois grupos de soros, sugerindo que no grupo HLA- a resposta de anticorpos anti-B13 pode ser T-independente.

Utilizando peptídeos sintéticos derivados da sequência de B13 concluímos que o epitopo imunodominante está contido na sequência FGQAAAGDK. Visando mapear o epitopo responsável pela resposta anti-B13 e analisar uma possível correlação entre estrutura e atividade antigênica, três peptídeos sintéticos contendo o centro do epitopo AAAGDK (pB13 - GDKPSLFGQAAAGDKPSPLF; S4 -FGQAAAGDK e S5 -QAAAGDKPS) foram analisados quanto à sua capacidade de inibir a reatividade de soros de chagásicos à proteína recombinante B13. Os resultados mostram haver uma hierarquia na atividade antigênica inibitória dos peptídeos (pB13>S4>S5), que poderia estar relacionada com a capacidade distinta dos peptídeos em assumir uma estrutura secundária ordenada. As propriedades estruturais dos peptídeos foram analisadas por DC e RNM e indicam que os peptídeos apresentam uma hierarquia pB13>S4>S5 quanto à capacidade de adquirir uma conformação em hélice.

Dados anteriores indicam que soros de pacientes chagásicos da América Central e do Sul apresentam diferenças na mediana de reatividade à proteína B13 em testes de ELISA: por ex. Argentina MD=1.79; Brasil MD=1.51; Honduras MD=0.91. Investigamos alguns parâmetros sorológicos que pudessem explicar as diferenças observadas. Soros de 224 indivíduos chagásicos da Argentina, Brasil, Bolívia, Colômbia, El Salvador, Honduras e Venezuela foram analisados com relação à subclasse de IgG responsável pelo reconhecimento de B13. Os dados mostram igual distribuição das subclasses com a seguinte ordem decrescente de reatividade: IgG1>IgG3>IgG2>IgG4. Também concluímos que os soros em questão reconhecem o mesmo epitopo imunodominante da proteína B13.

Uma alternativa para explicar variações na resposta imune do hospedeiro a B13 seria a heterogeneidade molecular do antígeno correspondente a B13 nas cepas de *T. cruzi*. Primeiramente investigamos a massa molecular deste antígeno em sete cepas do parasita derivadas de diferentes regiões geográficas em ensaios de Western blot com soro anti-proteína recombinante B13. Observamos que a massa molecular deste antígeno varia de 100 a 190 KDa e que em várias cepas o soro anti-B13 reage com dois polipeptídeos. Com base nestes resultados investigamos a organização deste gene de cópia única no genoma das cepas. Concluímos que este gene está localizado em uma banda cromossômica única que apresenta variação de tamanho entre as cepas (1,25 a 0,9 Mpb). Análise por Southern blot indicou que o gene B13 apresenta arranjo diferente no genoma das cepas. Investigamos também o tamanho da região que contém as repetições seriadas no gene B13. A partir de dados da sequência deste gene da cepa CA-1 desenhamos um par de oligonucleotídeos que flanqueiam esta região. DNA genômico de 23 cepas foi submetido a PCR com este par de iniciadores, detectando-se produtos de amplificações com tamanho variando de 2,1 a 3,5 Kb em 11 cepas. Após sequenciamento da região a 3' das repetições seriadas do gene B13 da cepa Y, foi desenhado um segundo par de oligonucleotídeos iniciadores. Amplificação foi obtida em quatro cepas adicionais. Em 73% das cepas houve amplificação de um único fragmento enquanto nas demais dois produtos foram obtidos. Os dois produtos podem corresponder a diferenças no tamanho da região das repetições dos dois alelos do gene B13. Também analisamos a sequência de nucleotídeos de 83 unidades repetitivas em cinco cepas de *T. cruzi*. Concluiu-se que o epitopo imunodominante (FGQAAAGDK) é altamente conservado nas unidades das cepas embora algumas variações de aminoácidos foram observadas em algumas unidades.

Tomados em conjunto os dados indicam haver polimorfismo do gene de B13 em cepas de *T. cruzi* quanto a: (a) grande variação no número de unidades repetitivas (de 58 a 97 unidades); (b) baixa variação na sequência que flanqueia a região repetitiva; (c) certa variação na sequência codificadora de aminoácidos da região imunodominante. Como consequência destas observações, sugere-se que as diferenças observadas no número de unidades repetitivas e na estrutura de algumas destas repetições no antígeno B13 de cepas de *T. cruzi* podem ter implicações na indução da resposta humoral e celular do hospedeiro e poderiam explicar, em conjunto com diferenças genéticas do indivíduo, a variação da resposta imune a B13 observada em soros de pacientes chagásicos. Que seja de nosso conhecimento este é o primeiro estudo que analisa a estrutura geral de um gene de antígeno que apresenta domínios repetitivos em cepas de *T. cruzi*.

SUMMARY

The recombinant protein B13 contains 12 amino acid tandem repeats and corresponds to the immunodominant region of the 140/116 KDa surface antigen of *T. cruzi* trypomastigotes of the Y strain. B13 protein shows high sensitivity and specificity in the serological diagnosis of Chagas disease. The analysis of anti-B13 IgG subclass distribution in sera of chronic chagas disease cardiopathy patients (CCC) and asymptomatic patients (ASY) showed the same pattern: IgG1>IgG3>IgG2>IgG4. However, the mean of reactivity to B13 was higher in the CCC group as compared with ASY. Previous data from our laboratory indicate that T cell response to B13 protein is MHC class II-restricted (HLA-DQA1*0501, DRB1*0101 and DRB5*0101 - named as group HLA+). On the other hand, data from the literature suggest that repetitive antigens from protozoa are T-independent antigens. Reactivity to B13 was analyzed by ELISA in sera of patients HLA+ and HLA- (presenting the other alleles). Similar mean ODs values were obtained for the two groups of sera suggesting that at least in the HLA- group the humoral response to B13 could be T-independent.

Competitive ELISA employing synthetic peptides derived from B13 sequence allowed concluding that the immunodominant epitope is included in the FGQAAAGDK sequence. To define the minimum epitope responsible for the anti-B13 response and to analyze a possible correlation between structural features and antigenic activity three synthetic peptides bearing the core (AAAGDK) of the immunodominant epitope (pB13 - GDKPSLFGQAAAGDKPSPLF; S4 -FGQAAAGDK e S5 -QAAAGDKPS) were assayed regarding their ability to inhibit chagasic sera reactivity to B13. A hierarchy in the inhibitory antigenic activity was observed (pB13>S4>S5), that could reflect the distinct capacity of the polypeptides to assume an ordered secondary structure. This feature was investigated by CD and NMR. Data are suggestive that the three peptides have the same hierarchy regarding their capacity to acquire a helical conformation (pB13>S4>S5).

Previous analyses of chagasic sera from nine countries of Central and South America showed variations in the mean O.D. values of B13-ELISA according to the country (eg Argentina, MD=1.79; Brazil, MD=1.51; Honduras, MD=0.91). We investigated some serological parameters that could explain the observed variation. 224 chagasic sera from Argentina, Brazil, Bolivia, Colombia, El Salvador, Honduras and Venezuela were investigated concerning the IgG subclass reactive to B13. Data indicate that all the sera displayed the same subclass distribution: IgG1>IgG3>IgG2>IgG4. It was also concluded that the same immunodominant epitope of B13 protein was recognized by the sera.

As an alternative to explain variations in the host immune response to B13 we investigated the molecular heterogeneity of the native B13 antigen in different *T. cruzi*

strains. Firstly we analyzed the molecular mass of this antigen in seven stocks derived from different hosts and geographic regions. Western blot experiments employing anti-recombinant protein B13 serum showed variations in the molecular mass of B13 antigen ranging from 100 to 190 KDa. In most of the stocks, anti-B13 serum reacted with two polypeptides. Based on these results we investigated the organization of the B13 single copy gene in the genome of the strains. It was concluded that the gene is localized in a single chromosomal band presenting size variation among the strains (1,25 to 0,9 Mbp). Southern blot analysis indicated that B13 gene has different genomic arrangement. We have also investigated the size of the region that contains the tandem repeats. Based on the sequence of a B13-homologous gene of the CA-1 strain we designed a pair of oligonucleotide primers flanking the repetitive region. Genomic DNA of 23 parasite strains was submitted to PCR with these primers. Amplification products ranging from 2.1 to 3.5 Kb were observed in 11 stocks. After sequencing of a region located at the 3' end of the repetitive portion of B13 gene of the Y strain, a second pair of primers was designed. PCR amplification was obtained in four additional strains. Most of stocks (73%) originated only one amplified band while two products were detected in the remaining strains. The two products could derive from the independent amplification of the repetitive regions of the two alleles of B13 gene. We have also analyzed the nucleotide sequence of 83 repetitive units of five *T. cruzi* strains. It is concluded that the immunodominant epitope (FGQAAAGDK) is highly conserved among the units and the various parasite strains, although few amino acid variations were detected in some units.

Taken together these data indicate polymorphism of B13 gene among *T. cruzi* strains regarding: (a) high degree of heterogeneity in the number of repetitive units (it is estimated that this number varies from 58 to 97 units); (b) discrete sequence variation upstream and downstream of the repetitive region; (c) minor variations in the codified amino acid of some repetitive units. Differences in the number of repetitive immunodominant units and in the structure of some of these repeats may have implications on the induction of humoral and cellular responses of the host to B13 antigen. These parameters in conjunction with genetic characteristics of the individuals could explain the variation of reactivity to B13 observed in sera of chagasic patients. To our knowledge this is the first report that describes the general structure of an antigen gene bearing repetitive domains in *T. cruzi* strains.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

A Doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que é encontrado desde o Sul dos Estados Unidos até a Argentina. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1991) a Doença de Chagas afeta 16 a 18 milhões de pessoas na América Central, América do Sul e no México. Estima-se que um quarto da população dessas regiões (cerca de 90 milhões de pessoas) encontra-se em áreas onde há risco de contrair a doença. Estima-se ainda que 20-30% das pessoas infectadas desenvolvam sintomas clínicos, tais como cardiopatia, megaesôfago e megacólon, que se manifestam na fase crônica da doença quando a quantidade de parasitas circulantes é reduzida (Tanowitz *et al.*, 1992). Segundo estimativas recentes, no Brasil a Doença de Chagas gera gastos anuais de 720 milhões de dólares em marcapassos e cirurgias e afasta cerca de 75000 pessoas do mercado de trabalho devido a problemas cardíacos sérios, representando uma perda de US\$ 650 milhões de dólares por ano (WHO, 1997).

A via mais importante de transmissão da Doença de Chagas, em áreas endêmicas, é o contato do homem com o inseto triatomídeo - conhecido como barbeiro, chupão ou chupança por seu hábito de picar o homem no rosto. Originalmente, esse inseto desenvolvia seu ciclo de vida em ambiente totalmente selvagem, alimentando-se de sangue de mamíferos silvestres. No entanto, a partir do momento em que o homem invadiu ou estabeleceu-se em áreas próximas às regiões silvestres, o barbeiro passou a incluí-lo em sua cadeia alimentar.

Além da transmissão vetorial, o segundo mecanismo mais importante de transmissão do *Trypanosoma cruzi* é através da transfusão de sangue, ocasionada pela migração de pessoas contaminadas de áreas endêmicas para centros urbanos de países da América Central e do Sul e, eventualmente, em países não endêmicos (Schmunis, 1991). Estima-se que milhares de novos casos de Chagas transfusional possam ocorrer anualmente. Outras formas de infecção também foram descritas como transmissão congênita, acidentes de laboratório, transplantes de órgãos e até ingestão de formas infectantes do parasita (Dias, 1979).

A transmissão do *Trypanosoma cruzi* envolve dois ciclos: o ciclo silvestre e o doméstico. No ciclo silvestre ocorre a interação entre vetores (insetos triatomídeos como:

Triatoma infestans, *Rhodnius prolixus*, *Pastrongylus megistus* e *Triatoma braziliensis*) e hospedeiros mamíferos considerados reservatórios silvestres (como tatus, gambás e roedores). De maneira geral, há um equilíbrio ecológico entre o parasita e os vetores ou hospedeiros, já que o parasitismo não causa danos aos triatomídeos ou aos reservatórios silvestres. O ciclo doméstico resulta do contato vetor-homem, quando o vetor passou a colonizar habitações construídas próximas ao seu habitat natural. O desequilíbrio ecológico causado pela invasão do homem levou à interação entre os dois ciclos onde o homem e animais domésticos como cães, gatos e roedores domésticos passaram a ser hospedeiros do *Trypanosoma cruzi*. Neste caso, o parasita causa a Doença de Chagas ao hospedeiro humano.

Em 1980 foi lançado um projeto de controle à Doença de Chagas, denominado "Iniciativa do Cone Sul", do qual participaram Brasil, Uruguai, Chile, Argentina, Paraguai e Bolívia. A iniciativa pretendia interromper a transmissão da doença a partir da eliminação de vetores domiciliados e controle nos bancos de sangue. Com essas medidas, prevê-se que a transmissão da doença seja interrompida até o ano 2001 no Brasil, Uruguai, Chile e Argentina. No entanto, o programa de vigilância dos insetos domiciliares e a conscientização da população que continua a habitar nas regiões endêmicas devem continuar para não haver uma reinfestação de moradias pelo vetor. Em alguns países da América do Sul, como Bolívia e Paraguai, os programas de controle de transmissão são incipientes, ao passo que nos demais países ainda não foram iniciados. Estes fatos indicam que a Doença de Chagas continua a ser um grave problema de saúde pública em muitas regiões de nosso Continente.

1.2 Características do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado digenético (parasita com alternância de hospedeiros invertebrado e vertebrado) pertencente à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida. Nesta família estão incluídos os protozoários que apresentam uma única mitocôndria na qual está situado o cinetoplasto, uma organela especializada que contém uma grande quantidade de DNA (kDNA). O kDNA compreende de 10-30% do DNA total do *Trypanosoma cruzi*.

O *Trypanosoma cruzi* apresenta um ciclo biológico complexo, o qual envolve diferentes estágios em distintos hospedeiros (Brenner, 1973). A infecção do hospedeiro

mamífero pelo *Trypanosoma cruzi* ocorre principalmente pela invasão de formas tripomastigotas através de mucosas ou por soluções de continuidade da pele.

Na Figura 1 resume-se o ciclo evolutivo do parasita: os tripomastigotas são formas extracelulares que circulam na corrente sanguínea (A) invadem células do hospedeiro, preferencialmente células da glia e musculares, especialmente as cardíacas (B), e se diferenciam em amastigotas, formas capazes de se multiplicar dentro da célula invadida. Após nove ciclos de multiplicação (Dvorak & Hyde, 1973), os amastigotas se

Figura 1 - Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* (figura extraída de Despomminier & Karapelou, 1987).

diferenciam novamente em tripomastigotas que rompem a célula (C), caem na corrente sanguínea onde podem invadir novas células ou serem sugados por insetos triatomídeos (D). Nesse caso, na porção inicial do intestino desses insetos, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas que se dividem por divisão binária na luz do intestino (E) e, na porção terminal do tubo digestivo (F), diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas infectantes que são eliminadas juntamente com as fezes (G) e urina do inseto enquanto este se alimenta do sangue de novos hospedeiros, recomeçando o ciclo. O acesso ao interior do organismo é feito através de coceira no local da picada (H).

1.3 Heterogeneidade das cepas de *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* não é uma população homogênea e sim um conjunto de populações circulantes entre o inseto vetor e os hospedeiros vertebrados: homem, animais domésticos e reservatórios silvestres. Considerando que a reprodução sexual não foi evidenciada em *Trypanosoma cruzi*, a estrutura clonal deste parasita (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc & Ayala, 1991) determina que, em princípio, qualquer isolado obtido de um hospedeiro naturalmente infectado seja definido como uma cepa (Brenner, 1977).

Uma característica notável em *Trypanosoma cruzi* é que o tamanho do seu genoma varia grandemente nas diferentes cepas do protozoário, bem como entre clones de uma mesma cepa. Nas diferentes cepas, o conteúdo de DNA por célula varia entre 125 a 280 fg (Dvorak *et al.*, 1982; McDaniel & Dvorak, 1993). Este valor inclui o DNA nuclear e o kDNA que representa entre 10-30% do DNA total do parasita. Em muitos protozoários, incluindo o *Trypanosoma cruzi*, a cromatina é fracamente condensada durante a mitose o que impede a visualização dos cromossomos. Assim, o estudo dos cromossomos desses parasitas só tem sido possível utilizando-se a técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE), que permite a separação dos cromossomos intactos. Após coloração com brometo de etídio é possível determinar o padrão das bandas cromossômicas de cada isolado. As diferenças de intensidade de coloração das bandas sugerem que estas contenham um número variável de cromossomos que apresentam o mesmo tamanho molecular. Quando esta técnica foi aplicada ao clone CL Brenner - organismo de referência do Projeto Genoma de *Trypanosoma cruzi* - foi possível a identificação de um total de 20 bandas cromossômicas que corresponderiam a cerca de 64 cromossomos (Cano *et al.*, 1995). Por outro lado, os clones CA-1/72 e Silvío

X10/7 apresentaram 40 e 39 bandas, respectivamente (Henriksson *et al.*, 1996). As diferenças no número de bandas observadas para os 3 clones podem ser resultado das distintas condições de PFGE utilizadas pelos autores. De um modo geral as bandas cromossômicas de *Trypanosoma cruzi* apresentam um tamanho que varia de 0,45 Mb a aproximadamente 3,5 Mb. Cabe lembrar que o cariótipo de determinada cepa ou clone é conservado nas diferentes fases de desenvolvimento do parasita.

A utilização de sondas de DNA derivadas de seqüências clonadas mostrou que determinado marcador pode ser encontrado em cromossomos de tamanhos diferentes tanto na mesma cepa quanto em cepas distintas. Este tipo de análise indica que cromossomos homólogos podem ter tamanhos diferentes. Além disso, foi sugerido que alguns cromossomos podem apresentar aneuploidia (revisado por Henriksson *et al.*, 1996).

A variabilidade no conteúdo de DNA das cepas de *Trypanosoma cruzi* pode ser explicada com base no aumento do número e tamanho dos cromossomos, bem como por mudanças na ploidia de um ou mais cromossomos. Outra hipótese bastante provável refere-se a um aumento no número de seqüências de DNA reiterado não codificante (cf Henriksson *et al.*, 1996). Estes aspectos estão sendo estudados em vários laboratórios, incluindo-se o nosso.

1.4 Fases e formas clínicas da Doença de Chagas

A Doença de Chagas apresenta duas fases: a fase aguda e a fase crônica. Uma das características da Doença de Chagas é que, muito freqüentemente, na fase aguda da doença não há manifestações clínicas perceptíveis, principalmente em adultos. Por esta razão, o diagnóstico clínico deve ser sempre considerado no contexto epidemiológico e confirmado pela presença de anticorpos contra o parasita, ou pela detecção do próprio parasita.

A fase aguda geralmente é observada um período de 7 a 10 dias após infecção e dura entre 6 a 8 semanas. Esta fase é caracterizada por grande quantidade de parasitas circulantes, que assim permanecem por um período de 1 a 2 meses. Os principais sintomas clínicos, variáveis em freqüência e intensidade, são: febre, taquicardia, inflamação dos órgãos linfóides locais, esplenomegalia, linfocitose e reação inflamatória aguda no local da picada (no rosto pode aparecer o clássico sinal de Romaña) e nos demais tecidos parasitados.

A fase crônica instala-se 1 a 2 meses após a infecção aguda e caracteriza-se por uma baixa parasitemia. A maior parte dos pacientes na fase crônica (60-70%) não apresenta manifestações clínicas por longo período de tempo e pode assim permanecer pelo resto da vida, caracterizando a forma indeterminada da doença. Por outro lado, cerca de 20-30% dos pacientes evoluem para a forma cardíaca em média 10 a 20 anos após a infecção. As manifestações podem variar desde pequenas alterações do eletrocardiograma, especialmente relacionadas à formação e condução do impulso nervoso, até morte súbita por parada cardíaca. A forma digestiva atinge 8-15% dos indivíduos chagásicos e é caracterizada por dilatações patológicas de esôfago e/ou cólon (Rezende, 1997) devido à perda gradativa de neurônios nos plexos intestinais.

A prevalência e intensidade das diversas manifestações da Doença de Chagas variam com a área geográfica. Acredita-se que o tipo de manifestação clínica seja determinado por características genéticas das cepas de *Trypanosoma cruzi* ou da população humana ou da inter-relação entre ambas.

1.5 Diagnóstico da Doença de Chagas

Durante a fase aguda da Doença de Chagas, onde, em geral, ocorre alta parasitemia, o diagnóstico pode ser efetuado por testes parasitológicos diretos, como exame de sangue a fresco, ou indiretos, como hemocultura ou xenodiagnóstico (Camargo & Takeda, 1979). Nesta fase, estes métodos apresentam sensibilidade elevada (quando a parasitemia é alta). O diagnóstico sorológico na fase aguda, devido à baixa resposta imunológica, ainda é muito restrito. Apenas o antígeno SAPA ("shed acute phase antigen") foi descrito como indutor da formação de anticorpos no início da infecção podendo ser utilizado para seu diagnóstico via anticorpos IgM (Affranchino *et al.*, 1989).

Na fase crônica, que é caracterizada pelo baixo número de parasitas circulantes e pelo alto título de anticorpos contra antígenos de *Trypanosoma cruzi*, os métodos de diagnóstico sorológico mais utilizados são: imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta, fixação de complemento, testes imunoenzimáticos e radioimunoensaios. Estes ensaios são bastante sensíveis. No entanto, têm sido demonstradas ocorrências de reações falso-positivas e falso-negativas (Camargo & Takeda, 1979). Os métodos parasitológicos indiretos, mencionados acima (xenodiagnóstico e hemocultura), também podem ser utilizados

na fase crônica, mas envolvem procedimentos laboratoriais bastante trabalhosos e apresentam sensibilidade de 50%, quando se realiza um único exame.

1.5.1 Diagnóstico parasitológico

A observação ao microscópio de parasitas em amostras de sangue a fresco está restrita à fase aguda da doença. Testes diagnósticos parasitológicos também podem ser utilizados nos casos de transmissão congênita, no acompanhamento de tratamento quimioterápico ou ainda quando os testes sorológicos fornecerem resultados duvidosos. O exame a fresco é facilitado pela mobilidade do parasita e, através de métodos de concentração da amostra, pode-se aumentar a probabilidade de detecção de parasitas circulantes. No entanto, em áreas onde se tem conhecimento da presença de *Trypanosoma rangeli*, torna-se importante fazer preparações coradas com Giemsa que permitem distinguir morfologicamente os dois parasitas (Camargo & Takeda, 1979).

Os métodos parasitológicos indiretos utilizados no diagnóstico da Doença de Chagas, tanto na fase aguda como crônica, são o xenodiagnóstico, a hemocultura e o PCR.

O xenodiagnóstico consiste em alimentar triatomídeos criados em laboratório e, portanto livres de infecção, com o sangue do paciente. Os insetos depois de 30-60 dias, tempo suficiente para multiplicação do parasita, são examinados quanto ao seu conteúdo intestinal e fecal. Este teste, além de ser desagradável ao paciente (já que a forma de alimentação do inseto é através de picadas no braço), demora mais de 30 dias para fornecer o resultado. Além disto, devido à sua baixa sensibilidade (no máximo 50%), o teste tem que ser repetido diversas vezes.

A hemocultura consiste em utilizar o sangue do paciente para inocular meios de cultura específicos visando o crescimento do parasita. Após um período de incubação de 30 a 60 dias, o meio de cultura é examinado quanto à presença de formas epimastigotas. Variações na forma da coleta, volume do inóculo, preparação do sangue, meio de cultura e período de incubação podem influir na sensibilidade desse método.

Frente ao exposto, as técnicas descritas acima ainda estão longe de serem ideais para o diagnóstico parasitológico da Doença de Chagas.

Uma alternativa para a detecção de parasitas surgiu com a aplicação de sondas de DNA. A existência de DNA repetitivo e abundante tanto no núcleo (Gonzalez *et al.*,

1984), como no cinetoplasto (Simpson, 1987) do *Trypanosoma cruzi* sugeriu que seqüências de ácidos nucleicos específicas do parasita poderiam ser detectadas através de sondas de DNA. No entanto, a sensibilidade da reação de hibridização não é suficiente para detecção de parasitas no sangue de chagásicos crônicos dada a baixa parasitemia. Sendo assim, é necessária a amplificação das seqüências-alvo por PCR. Utilizando oligonucleotídeos iniciadores dirigidos para a região constante do minicírculo de kDNA, Sturm *et al.* (1989) desenvolveram um teste de PCR que permitiu a detecção de 0,1% do kDNA de uma célula.

A amplificação de um fragmento nuclear repetitivo de 195 pb também tem sido proposta para o diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* (Moser *et al.*, 1989; Diaz *et al.*, 1992; Russomando *et al.*, 1992).

Uma das dificuldades da aplicação do PCR no diagnóstico da Doença de Chagas seria a degradação do DNA nas amostras de sangue. Avila *et al.* (1991) propuseram a técnica do lisado guanidina-EDTA-sangue (lisado GEB). Esta metodologia, além da simplicidade do tratamento das amostras, apresenta a vantagem de preservar os alvos de kDNA mesmo após longo período de armazenamento da amostra sem refrigeração. Isto permite a realização de estudos de campo em regiões sem infra-estrutura para o PCR, sendo que as amostras podem ser coletadas e armazenadas em guanidina-EDTA até o seu processamento em centros especializados.

A amplificação do kDNA foi utilizada para a detecção do *Trypanosoma cruzi* no sangue de pacientes chagásicos da área endêmica de Virgem da Lapa, MG, Brasil (Avila *et al.*, 1993). Os resultados mostraram uma alta sensibilidade (100%) do diagnóstico por PCR quando comparado com testes sorológicos. No entanto, temos que salientar que os pacientes moradores desta área apresentavam altos níveis de parasitemia (detectados por xenodiagnóstico) comparados com pacientes de outras áreas endêmicas onde o ensaio de PCR apresentou menor sensibilidade (Borges-Pereira *et al.*, 1996).

Apesar de os resultados promissores obtidos com a técnica comentada acima, a literatura apresenta algumas críticas a esse sistema sugerindo a possibilidade de reações falso-positivas. De fato, os oligonucleotídeos propostos para o PCR dirigido para o kDNA de *Trypanosoma cruzi* promovem também a amplificação da região variável do kDNA de *T. rangeli*, originando para este último um fragmento de DNA de 760 pb característico e vários outros produtos com tamanho variando entre 320 a 430 pb (Macedo *et al.*, 1995; Vallejo *et al.*, 1999). Estes produtos apresentam tamanho similar ao produto de 330 pb específico de

Trypanosoma cruzi, o que poderia confundir o diagnóstico principalmente no caso de infecção mista com os dois tripanossomatídeos.

A amplificação por PCR do domínio divergente D7a do RNA ribossômico 24S α de *Trypanosoma cruzi*, acoplada a uma etapa prévia de transcrição reversa (RT-PCR) foi proposta para a identificação do parasita (Souto & Zingales, 1993). Esta abordagem permitiu a detecção de um milésimo do conteúdo de ácidos nucleicos do organismo. Não houve reação cruzada para outros tripanossomatídeos que infectam o homem e para ácidos nucleicos humanos. A aplicabilidade desta abordagem no diagnóstico da Doença de Chagas foi investigada em 38 pacientes chagásicos crônicos do Hospital Dante Pazzanese de São Paulo (Souto, 1996), obtendo-se sinal positivo em apenas duas amostras. Este resultado pode ser atribuído à labilidade do RNA do parasita no sangue do indivíduo e/ou a parasitemia muito baixa dos pacientes analisados. Apesar de os resultados pouco promissores para a aplicação desta abordagem no diagnóstico da Doença de Chagas, os estudos realizados por Souto *et al.* (1996) referentes à amplificação da região D7a do rRNA 24S α permitiram verificar que cerca de 90 cepas de *Trypanosoma cruzi* podiam ser divididas em 3 grupos principais com base no produto da reação de PCR, sendo que no Grupo 1 origina-se um produto de 125 pb, no Grupo 2, um produto de 110 pb e no Grupo 1/2 ambos os fragmentos de DNA. Esta contribuição é relevante tendo em vista que estudos anteriores, onde foram aplicadas outras abordagens moleculares, não permitiam reunir as cepas do parasita em grupos discretos. As características epidemiológicas dos 3 grupos de cepas estão sendo definidas e mostram particularidades interessantes (Zingales *et al.*, 1998). A análise de cerca de 300 isolados de *T. cruzi* do Brasil, Colômbia e Bolívia indica que cepas de grupo 1 e 1/2 estão associadas ao ciclo doméstico da transmissão, ao passo que cepas de grupo 2 predominam no ciclo silvestre. Os dados também sugerem que cepas de grupos 1 e 1/2 promovem manifestações clínicas da Doença de Chagas mais graves quando comparadas àquelas induzidas por cepas de grupo 2 (Zingales *et al.*, 1998).

1.5.2 Diagnóstico sorológico

A técnica mais utilizada para o diagnóstico da Doença de Chagas na fase crônica é a detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* no soro dos pacientes. Neste caso, os

ensaios mais empregados são reação de fixação de complemento, aglutinação direta, hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI) e o teste imunoenzimático ELISA, com resultados que permitem o diagnóstico em mais de 95% dos infectados (Luquetti & Rassi, 2000).

A primeira técnica utilizada foi a de fixação de complemento, conhecida como reação de Machado Guerreiro, proposta em 1913 (Guerreiro & Machado, 1913). O antígeno empregado era um extrato aquoso de baço de cães infectados com *Trypanosoma cruzi*. Esta técnica é de difícil padronização devido à complexidade do preparo do antígeno e ao fato de ser uma técnica que envolve uma diversidade de reagentes, que estão sujeitos à variabilidade de lotes o que, portanto, exige uma série de controles.

Como alternativa à reação de fixação de complemento, Muniz e Freitas (1944) propuseram um ensaio de aglutinação direta que utiliza uma suspensão de parasitas íntegros e fixados. Altos títulos de anticorpos foram detectados, principalmente nos casos agudos. No entanto, resultados falso-positivos foram observados devido à presença de anticorpos heterofílicos. Além disto, dependendo do tipo de cultivo utilizado para obtenção dos parasitas, pode ocorrer aglutinação espontânea dos mesmos. Os autores compararam o teste de fixação de complemento e o ensaio de aglutinação direta e verificaram uma alta concordância entre eles.

Outro teste muito empregado é a hemaglutinação indireta onde hemácias são tratadas com ácido tânico (agente acoplante) e recobertas com extrato aquoso de epimastigotas (Knierim & Rubinstein, 1970). A presença de anticorpos no soro é evidenciada pela aglutinação das hemácias. Por ser um teste rápido, fácil, barato e que não exige nenhum cuidado especial ou equipamento específico foi recomendado pelos autores para análise de doadores de sangue em Bancos de Sangue. Algumas modificações foram propostas no formato inicial do teste, na tentativa de melhorar sua eficácia e evitar reatividade cruzada com *Leishmania* (Neal & Miles 1970; Camargo *et al.* 1973; Hoshino-Shimizu *et al.* 1978).

Atualmente o teste de hemaglutinação indireta é disponível no mercado na forma de kits que são largamente empregados na América Central e do Sul para triagem em Banco de Sangue (por exemplo: Chagas HAI-Imunoserum Kit).

A imunofluorescência indireta consiste em fixar formas epimastigotas em lâminas, incubá-las com o soro teste, e depois de lavadas, tratá-las com um anticorpo anti-IgG ou anti-IgM específico, conjugado a fluoresceína. Este teste foi considerado como

referência na sorologia da fase crônica da Doença de Chagas, mas também é capaz de detectar anticorpos IgM na fase aguda (Camargo & Amato Neto, 1974). A imunofluorescência apresenta uma alta concordância com a reação de fixação do complemento, entretanto, verifica-se uma reatividade cruzada com soros de pacientes com leishmaniose, tuberculose e lepra (Camargo, 1966). Camargo & Rebonato (1969) verificaram que a absorção prévia de soros com antígenos de *Leishmania* ou *Trypanosoma cruzi* reduzia a reatividade heteróloga, sem afetar a sensibilidade de detecção. No entanto, o fato de introduzir uma etapa de pré-absorção com antígenos heterólogos torna inviável essa metodologia para aplicação em bancos de sangue e laboratórios clínicos.

Camargo *et al.* (1977) realizaram testes comparativos entre reação de fixação de complemento, imunofluorescência indireta, hemaglutinação e floculação em lâmina (teste onde se utilizam *Trypanosoma cruzi* rompidos, liofilizados e congelados) em 3624 soros das regiões de Mambai (GO) e São Paulo. Os autores verificaram que 97% dos soros apresentaram concordância total entre os quatro testes: 0,8% dos soros, considerados positivos, reagiram em 3 testes e 1,8% dos soros, considerados negativos, somente foram positivos em um dos testes. Um total de 0,4% dos soros tiveram reatividade com apenas dois testes, sendo considerados duvidosos. Este estudo mostra uma alta concordância entre os diferentes testes diagnósticos, quando se utilizam condições padronizadas.

Um dos ensaios mais promissores para utilização como sorodiagnóstico, por apresentar a vantagem de permitir a análise de múltiplas amostras, é o imunoensaioenzimático (ELISA - enzyme linked immunosorbent assay), preparado a partir de antígenos de formas epimastigotas adsorvidos em poços de microplacas. Ferreira *et al.* (1991) padronizaram um ensaio de ELISA utilizado microplacas sensibilizadas com extrato total de *Trypanosoma cruzi* (bioELISA-cruzi - Biolab Diagnóstica S/A). O teste foi avaliado com 219 soros com diagnóstico clínico de Doença de Chagas e 104 soros de outras doenças. Além disso, comparou-se o teste de ELISA com os testes de hemaglutinação e imunofluorescência, utilizando 1325 soros. A sensibilidade observada foi superior a 99,5%. No entanto, em um total de 39 casos de leishmaniose, 15 soros reagiram positivamente com o antígeno de *T. cruzi*. Um teste comercial, desenvolvido pelos laboratórios Abbott (Pan *et al.*, 1992), foi avaliado com 1392 amostras de soros do Brasil e Argentina. Os autores afirmam que o teste apresentou 100% de sensibilidade e especificidade. A natureza do antígeno não foi comunicada.

Com exceção do teste acima, todos os outros testes sorológicos apresentam uma sensibilidade inferior a 100%. Esses testes detectam os anticorpos dirigidos contra o parasita o que está sujeito a variações individuais da resposta de cada paciente e também às variações na especificidade dos anticorpos dirigidos às diferentes cepas. Um dos principais problemas relacionados ao diagnóstico sorológico são os soros que apresentam reatividade muito próxima do valor de corte ("cut-off") previamente estabelecido. Para bancos de sangue, onde a sensibilidade deve ser máxima, soros com diagnóstico duvidoso seriam automaticamente descartados.

Para um diagnóstico correto é fundamental selecionar antígenos específicos. Os antígenos mais utilizados no diagnóstico da Doença de Chagas são constituídos por uma mistura complexa de moléculas do parasita ou de frações do mesmo (revisão em Stolf, 1992). Não é de se estranhar, portanto, que tal heterogeneidade de antígenos apresente reações falso-positivas e reatividade cruzada com soros de outras doenças infecciosas, principalmente leishmaniose. Com um extrato complexo de antígenos é também difícil detectar diferenças de resposta sorológica durante os vários estágios ou formas clínicas da doença. Várias tentativas foram feitas no sentido de utilizar antígenos purificados, na maior parte das vezes, glicoconjugados, em sorodiagnóstico (Scharfstein *et al.*, 1985; Kirchoff *et al.*, 1987; de Andrade *et al.*, 1996). No entanto, obtê-los em quantidades elevadas e com grau de pureza reprodutível é uma tarefa difícil e trabalhosa. Um teste de ELISA de quimioluminescência com um glicoconjugado de tripomastigotas mostrou sensibilidade e especificidade para monitorar os efeitos do tratamento com benzonidazol em crianças de 7 a 12 anos de zona rural do Brasil com sorologia positiva para Chagas (de Andrade *et al.*, 1996).

Antígenos recombinantes são recomendados no diagnóstico sorológico tendo em vista sua obtenção em larga escala. Genes codificadores de antígenos de *Trypanosoma cruzi* foram clonados a partir de bibliotecas de expressão utilizando soros de pacientes chagásicos ou de animais infectados (revisto em Franco da Silveira, 1992). A maioria destes antígenos é constituída por repetições seriadas de seqüências de aminoácidos bastante conservadas na molécula e imunodominantes. Misturas de antígenos recombinantes estão sendo testadas para melhorar a sensibilidade de testes sorológicos, sugerindo que uma mistura de antígenos recombinantes pode resultar em maior sensibilidade e especificidade do teste (Carvalho *et al.*, 1993; Pastini *et al.*, 1994; Umezawa *et al.*, 1999). Algumas

características das proteínas recombinantes sugeridas para uso em diagnóstico sorológico são apresentadas nas Tabelas 1A e 1B (modificada a partir de Franco da Silveira, 1999).

É importante ressaltar que genes que codificam antígenos homólogos com a mesma repetição de aminoácidos foram isolados e caracterizados independentemente em distintos laboratórios, comprovando sua imunodominância. Na Tabela 1B estes antígenos são agrupados em classes de acordo com a sequência dos elementos de repetição.

Recentemente foi publicado um estudo extenso onde se avaliou o desempenho de seis antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi* no diagnóstico sorológico de cerca de 540 soros de indivíduos de nove países da América Central e do Sul (Umezawa *et al.*, 1999). Este estudo indica variabilidades regionais quanto à reatividade dos soros de chagásicos aos diferentes antígenos. Desta forma, os resultados apontam para o uso de misturas de antígenos recombinantes visando aumentar a sensibilidade e abrangência do diagnóstico.

Peptídeos sintéticos derivados das sequências repetitivas dos antígenos de *Trypanosoma cruzi* também foram utilizados em testes de ELISA. De maneira geral, estes peptídeos apresentaram sensibilidade inferior às proteínas recombinantes correspondentes (Vergara *et al.*, 1991; 1992). No entanto, recentemente Houghton *et al.* (2000) demonstrou que peptídeos e proteínas recombinantes contendo epitopos repetitivos podem ser utilizados como reagentes para o desenvolvimento de testes sorológicos altamente sensíveis (100% de sensibilidade e mais de 99% de especificidade).

Tabela 1A - Antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi* de uso potencial no sorodiagnóstico da Doença de Chagas.

Classe	Antígeno	No. de aminoácidos da unidade de repetição	Tamanho da proteína nativa (kDa)	Diagnóstico	Característica
1	CRA Ag30 JL8 TCR27	14	225 160-225 > 170 ~ 150	Infecção crônica	Antígeno citoplasmático
2	H49 JL7 Ag1 FRA	68	> 300 > 170 > 205 > 300	Infecção crônica	Antígeno associado ao citoesqueleto
3	B13 Ag2 TCR39	12	116 -140 140 128 - 147	Infecção crônica	Antígeno de superfície
4	SAPA TCNA TS	12	165-205 85 82	Infecção congênita e aguda	Neuraminidase e transialidase
5	Ag36 JL9	38	85	Infecção crônica	Proteína associada a microtúbulos
6	Ag13	5	85-280	Infecção crônica	Não caracterizado
7	B12	20	200-230	Infecção crônica	Não caracterizado

Tabela 1B – Sequências de aminoácidos das unidades repetitivas de antígenos de *T. cruzi*.

Classe ^a	No. de aminoácidos Da repetição	Sequência da unidade repetitiva ^b	Representatividade ^c	
			Frequência	Porcentagem (%)
1	14	EKQK(R)AAEAT(M)KVAEA	10/14	71
2	68	SMNARAQELAREKKLADRAFLDQK PEGVPLRELPLDDDSDFVAMEQERR QQLEK(R)DPRRNAKEIAALEE	42/68	62
3	12	FGQA(G)A(T)A(V)GDK(R)PS(P)P(L)	10/12	83
4	12	DSS(T)AHG(S)TPSTPV(A)	9/12	75
5	38	ALPQE(V)EQ(E)EDVGPRHVDPDHF RSTTQ (H)DAYRPVDPSAYKR	26/38	68
6	5	KS(A)A(G)EP	4/5	80
7	20	PPAESPLKSVFGAPSSTAATF	16/20	80

^a: Classes de antígenos definidas na Tabela 1A.

^b: os resíduos entre parênteses podem substituir os resíduos precedentes em diferentes cópias das repetições.

^c: Representatividade dos aminoácidos mais frequentes nas unidades de repetição de antígenos de *Plasmodium*: N, A, D, V, P, E, G, S e Q (Schofield, 1991).

Um novo formato de ensaio imunodiagnóstico para a Doença de Chagas foi proposto por Rabello *et al.* (1999), o teste de anticorpos ID-Chagas, onde anticorpos anti-*T. cruzi* são identificados por esferas em gel (ID-PaGIA). Este sistema é uma adaptação de um teste em gel bastante utilizado em imuno-hematologia. Esferas ("beads") foram sensibilizadas com uma mistura de 3 peptídeos sintéticos derivados de sequências antigênicas de *Trypanosoma cruzi*: Ag2, TcD e TcE previamente descritas (Peralta *et al.*, 1994; Reed, 1996). Quando estas esferas são misturadas com soros contendo anticorpos

específicos, observa-se sua aglutinação. A mistura é centrifugada através de uma matriz de gel filtração, onde as partículas livres não aglutinadas se depositam no fundo do tubo enquanto as partículas aglutinadas permanecem retidas no topo ou distribuídas no gel. O resultado pode ser interpretado visualmente. Os autores compararam este teste com imunofluorescência, imunohemaglutinação indireta e ELISA e encontraram uma sensibilidade variando de 95,7 a 97,4% e uma especificidade de 93,8 a 98,8%. Apesar de o teste não ter apresentado uma sensibilidade e especificidade considerada excelente para um teste comercial, a técnica é bastante interessante além de ser facilmente executada e extremamente rápida (20 minutos) o que a torna bastante atraente.

1.6 Estrutura e função de domínios repetitivos de antígenos proteicos de parasitas

A presença de domínios com repetições seriadas de aminoácidos não é uma característica exclusiva de proteínas de parasitas. No entanto, nestes organismos, são encontrados com muita frequência. Na maior parte dos eucariotos, seqüências repetitivas de aminoácidos desempenham funções estruturais, como é o caso das repetições do colágeno. Por outro lado, nos parasitas as repetições seqüenciais são encontradas em proteínas de diferentes estágios evolutivos, em diferentes compartimentos celulares e desempenhando funções variadas. Um dos sistemas melhor estudados e revisto por Schofield (1991) é o de *Plasmodium* onde proteínas que apresentam domínios repetitivos incluem antígenos liberados durante a esquizogonia (antígenos S); proteínas associadas a hemácias infectadas (RESA); proteínas das roptrias e antígenos de superfície de esporozoítas e merozoítas. Neste parasita, até proteínas de choque térmico apresentam elementos repetitivos. No conjunto destes antígenos, a unidade de repetição apresenta um número de resíduos variável e pode ser reiterada de 2 a 50 vezes. A estrutura de repetição varia nas diferentes proteínas, podendo haver variantes alélicas. Além disto, mais de um tipo de repetição pode ocorrer na mesma proteína (Schofield, 1991).

Apesar de haver diversidade no tamanho, número e distribuição dos elementos repetitivos, a análise da estrutura de diversos antígenos de *Plasmodium* indicou haver maior frequência dos seguintes aminoácidos: N, A, D, V, P, E, G, Q e S, ao passo que os resíduos C, M, F, W, Y, I e L são pouco representativos (Schofield, 1991). A análise das seqüências de repetições seriadas encontradas nas classes de antígenos de *T. cruzi* utilizados no

diagnóstico sorológico da Doença de Chagas (Tabelas 1A e 1B) indica que neste parasita também há elevada representatividade dos resíduos de aminoácidos considerados mais abundantes em *Plasmodium*. De fato, a análise dos dados apresentados na Tabela 1B indica que a frequência destes resíduos varia desde 62% em antígenos da classe 2 até 83%, em antígenos da classe 3.

Outra característica importante das repetições seriadas de *Plasmodium*, que também é observada em *T. cruzi*, é a sua imunodominância. Para as espécies de *Plasmodium*, anticorpos contra esporozoito são direcionados predominantemente contra o domínio repetitivo da proteína circum-sporozoítica (CS), sendo que imunodominância análoga é observada para as repetições dos antígenos S e RESA.

Uma das hipóteses a respeito da função da imunodominância dos domínios repetitivos de antígenos parasitários, denominada "cortina de fumaça", propõe que o sistema imune do hospedeiro ao desenvolver intensa resposta contra estes domínios deixaria de reconhecer epitopos funcionais importantes da mesma molécula, permitindo assim ao parasita escapar do ataque da resposta imune (Kemp *et al.*, 1987). Esta hipótese foi discutida no contexto dos antígenos CS, antígeno S, FIRA ("falciparum interspersed repeat antigen"), RESA e SHARP ("small histidine and alanine rich protein") de *Plasmodium* (rev. Anders *et al.*, 1986) e dos antígenos SAPA/transialidase de *T. cruzi*, que apresentam epitopos imunodominantes fora do domínio catalítico da enzima (Cazzulo & Frasch, 1992).

Schofield (1991) propõe uma teoria geral para explicar a função das repetições seriadas de antígenos parasitários. Esta teoria se baseia em dados da literatura que sugerem que estruturas repetitivas, como por exemplo: poliacrilamida, carboidratos bacterianos, colágeno e flagelina causam ativação de linfócitos B independente da ação de linfócitos T, através da ligação cruzada ("crosslinking") do hapteno com imunoglobulinas específicas da superfície do linfócito B (Mosier & Subbarao, 1982). Para a proposta desta teoria, Schofield & Uadia (1990) investigaram a regulação da resposta humoral ao domínio repetitivo da proteína CS em esporozoitos intactos e verificaram que o parasita induz uma resposta timo-independente. Este tipo de resposta é, em geral, inferior a uma resposta timo-dependente, na medida em que a maturação e a formação de células de memória B e T são falhas. Schofield (1991) prediz ainda que a imunodominância das repetições pode suprimir a formação de anticorpos contra outras regiões importantes da mesma molécula. A hipótese apresentada pelo autor é corroborada pelas tentativas frustradas de obter-se

vacinas protetoras contra *Plasmodium* utilizando-se antígenos do parasita com seqüências repetitivas (rev. Graves & Gelband, 2000).

Para justificar a observação de que certos aminoácidos são mais representados nas repetições seriadas, Schofield (1991) sugere que estes epitopos devem apresentar hidrofiliidade e conformações adequadas para interagir com as imunoglobulinas da superfície das células B.

Evidências experimentais indicam que a conformação do epitopo pode ser relevante para a ligação antígeno-anticorpo (Dyson *et al.*, 1985; Dyson & Wright, 1995). Neste sentido, foi observado que peptídeos antigênicos derivados de proteínas com motivos repetitivos podem assumir conformações preferenciais que são reconhecidas por anticorpos anti-epitopos da proteína nativa (Craig *et al.*, 1998). Utilizando técnicas de DC e RNM foi possível detectar em peptídeos em solução populações com conformações estruturais de "β-turns" e 'hélices'. Embora preferências conformacionais de peptídeos não necessariamente reflitam as conformações da mesma seqüência na proteína nativa, há vários casos onde a estrutura presente em solução (detectada por DC ou RNM) reflete a conformação nativa na proteína ou no seu estado de ligação com o anticorpo (Dyson & Wright, 1995). Um dos primeiros estudos sobre estrutura de peptídeos antigênicos derivados da seqüência primária do antígeno repetitivo da superfície do esporozoito (CS) de *Plasmodium*, mostrou através de programas de predições de estrutura secundária que proteínas de CS de diferentes espécies de *Plasmodium* apresentavam uma tendência para formação de "β-turns" na região imunodominante repetitiva "in tandem" (Nussenzweig & Nussenzweig, 1986).

Devido à alta flexibilidade molecular dos peptídeos sintéticos pequenos (poucos aminoácidos), a observação de sua estrutura em água é bastante difícil. Neste sentido, foi mostrado que a adição de TFE (trifluoretanol) à solução de peptídeos que apresentassem intrinsecamente propensão para assumir uma conformação em hélice, estabilizava esta estrutura (Lehrman *et al.*, 1990; Dyson *et al.*, 1992ab). Uma possível explicação seria a de que o TFE apresenta uma constante dielétrica muito parecida àquela observada no interior da proteína (Sönnischsen *et al.*, 1992; Jasanoff & Fersht, 1994). Desta forma, a estrutura dos peptídeos em TFE estaria simulando a conformação dos mesmos quando de sua interação com a superfície do anticorpo.

No presente trabalho, apresentamos um estudo referente à estrutura conformacional de peptídeos sintéticos derivados da proteína recombinante B13, com o objetivo de caracterizar a possível estrutura do epitopo imunodominante.

Conforme discutido acima, apesar de haver evidência de que antígenos repetitivos de protozoários poderem induzir a ativação de células B sem o auxílio de células T (Schofield, 1990; 1991), dados de Cunha-Neto *et al.* (1997) indicam uma resposta proliferativa de linfócitos T de sangue periférico de indivíduos normais e chagásicos à proteína recombinante B13. Esta resposta é restrita a indivíduos portadores dos seguintes alelos de MHC de classe II (vide explicação abaixo): HLA DQA1*0501, DRB1*0101, DRB5*0101. Os autores concluem que estas moléculas de HLA teriam capacidade de apresentar domínios de B13 ou peptídeos sintéticos representativos dos elementos de repetição de B13 a linfócitos T (Cunha-Neto *et al.*, 1997). Esta observação poderia sugerir que somente portadores destes HLAs apresentariam resposta de linfócitos T a B13. Por outro lado, conforme discutido no item anterior, a presença de anticorpos anti-B13 é observada em 97% dos indivíduos chagásicos brasileiros investigados (Gruber & Zingales, 1993), valor que é superior à frequência dos alelos HLA DQA1*0501, DRB1*0101, DRB5*0101 na população brasileira que é de aproximadamente 75% (Faé *et al.*, 2000). Desta forma, uma hipótese possível seria a de que a resposta humoral a B13 poderia ser T-independente, pelo menos no grupo de pacientes não portadores dos alelos HLA referidos acima. No presente trabalho, investigamos este aspecto.

1.7 Origem dos domínios repetitivos de antígenos parasitários

A genética e possível evolução das unidades repetitivas de antígenos parasitários foi extensamente estudada no modelo representado pelo antígeno CS de diferentes espécies de *Plasmodium* por Enea e colaboradores (Enea *et al.*, 1986; Galinski *et al.*, 1987; Di Giovanni *et al.*, 1990). Este antígeno contém uma região interna com repetições seriadas que são espécie-específicas e, dentro da mesma espécie, variam de acordo com a cepa analisada. A região das repetições do gene CS é flanqueada por regiões que apresentam elevada identidade entre espécies de *Plasmodium* relacionadas. Os autores sugerem que a evolução da estrutura da repetição teria ocorrido por um mecanismo atuante a nível de DNA, semelhante àquele descrito para o DNA satélite. Este mecanismo

promoveria a reiteração e espalhamento da sequência e, ao mesmo tempo, determinaria a divergência da unidade repetitiva nos diferentes taxa. Uma simples mudança no passo de leitura da sequência originaria variantes alélicas distintas, com repetições estruturais e sorologicamente diferentes. A análise da sequência dos genes codificadores da proteína CS de isolados de *P. vivax* do Norte da Coreia e de países da América Central e do Sul, levou Arnot e colaboradores (1988) a propor que um mecanismo de "biased gene conversion" determinaria o polimorfismo observado na região das repetições destes genes. Enea e colaboradores também propõem que sequências de DNA repetitivo seriam introduzidas aleatoriamente em regiões codificantes, onde estas sequências seriam fixadas por apresentar vantagens para o parasita (por exemplo, evasão da resposta imune) (Di Giovanni *et al.*, 1990). A seleção rejeitaria mutações deletérias. Por outro lado, o organismo toleraria repetições menores e menos imunodominantes.

No caso dos antígenos de *T. cruzi* que apresentam repetições seriadas de aminoácidos, um estudo referente à conservação ou variação do motivo repetitivo nas diferentes cepas do parasita não foi realizado. Dados de Macina *et al.* (1989) referentes aos genes que codificam as proteínas Ag30 e SAPA, pertencentes, respectivamente, às classes de antígenos 1 e 4 (Tabela 1A), sugerem haver variação no número das unidades de repetição quando se comparam diversos isolados do parasita. No presente estudo analisamos o polimorfismo do gene e do antígeno B13, bem como o número e a estrutura geral da sequência das unidades de repetição deste antígeno em diferentes cepas de *T. cruzi*.

1.8 A proteína recombinante B13

A proteína recombinante B13 é uma proteína de fusão com a β -galactosidase e representa um domínio repetitivo "in tandem" de um antígeno de 140/116 kDa expresso em formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas da cepa Y, sendo que apenas nestas últimas formas é encontrado na superfície do parasita (Gruber & Zingales, 1993). A proteína recombinante B13 foi isolada de bibliotecas de expressão em λ gt11 utilizando soro de coelho hiperimune anti-tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Gruber & Zingales, 1993). Testes sorológicos com a proteína recombinante B13 mostraram que ela é reconhecida por 97% dos soros de pacientes chagásicos (Gruber & Zingales, 1993), sendo, portanto considerado um antígeno imunodominante. Apesar de a função biológica do antígeno correspondente a B13

não ser conhecida, seqüências com elevada similaridade a esse gene foram isoladas de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*, sendo denominadas clone 2 ou TcCA-2 (Buschiazzo *et al.*, 1992) e TCR39 (Hoft *et al.*, 1989).

A seqüência nucleotídica do clone B13 foi obtida pelo Dr. Arthur Gruber (comunicação pessoal). A estrutura primária da proteína B13 foi deduzida e mostrou ser formada por 19 repetições seriadas de um motivo de 12 aminoácidos parcialmente degenerado P(L)P(S, A)P(L)FGQAAA(E)G(A)D(G)K, onde os resíduos entre parênteses podem substituir os resíduos precedentes em diferentes cópias das repetições (Figura 2).

O gene B13 é um gene de cópia única (dois alelos) que apresenta na região central repetições seriadas de 36 pb. Este gene foi isolado por diferentes laboratórios, incluindo o nosso (Gruber & Zingales, 1993). Em um clone da cepa CA-1, o gene homólogo a B13 foi denominado TcCA-2 (Ibañez *et al.*, 1988). A seqüência completa desse gene foi publicada por Buschiazzo *et al.* (1992) definindo-se que este gene corresponde a uma fase aberta de leitura de cerca 4 kb. O gene TcCA-2 apresenta na extremidade 5' uma região não repetida de 645 pb, seguida por uma região de cerca de 2,7 kb que contém 75 repetições seriadas de 36 pb. Na extremidade 3' situa-se uma seqüência não repetida de 570 pb (Buschiazzo *et al.*, 1992). Um gene homólogo a B13 da cepa Silvio X10 (denominado TCR 39) foi isolado e seqüenciado parcialmente (Hoft *et al.*, 1989).

```

PPFQGAAAGDK_PSPFQGAAAGDK_PPPFQGAAAGDK_PSPFQGAAAGDK_
PPFQGAAAGDK_PSPFQGAAAGGK_PPPFQGAAAGDK_PSPFQGAAAGDK_
PPFQGAAAGDK_PSPFQGAAAGDK_PPPFQGAAAGDK_PPPFQAAEGDK_
PPFQGAAAGDK_PAPFQAAEGDK_PPPFQAAAADK_PSLFQGAAAGDK_
LSLFQGAAAGDK_PPPFQAAEGDK_PPPFQGAAAGD-

```

Figura 2 - Seqüência completa de aminoácidos correspondente ao inserto do gene B13 clonado em pMSgt11. Os elementos repetitivos de 12 resíduos estão separados por um traço. Em negrito indicam-se as variações de seqüência.

Em trabalho anterior, nosso grupo utilizou ensaios de ELISA de competição para caracterizar o epitopo imunodominante de B13. Neste ensaio, diferentes peptídeos sintéticos, derivados da seqüência da proteína B13, eram incubados com soros de pacientes

chagásicos antes de serem adicionados aos poços da placa contendo a proteína recombinante B13. Os dados obtidos permitiram concluir que o epitopo imunodominante deste antígeno é representado pela sequência FGQAAAGDK (Cunha-Neto *et al.*, 1995). Naquele trabalho também foi sugerido que a sequência AAAGDK deste epitopo poderia representar um epitopo de reatividade cruzada com o epitopo AAALDK da miosina cardíaca humana, participando em reações de autoimunidade observadas na cardiopatia chagásica (Cunha-Neto *et al.*, 1995).

A proteína B13 tem sido proposta para o diagnóstico sorológico da Doença de Chagas, tendo em vista sua elevada especificidade e sensibilidade em radioimunoensaios realizados com soros do Brasil e da Argentina (Gruber e Zingales, 1993). Estudos realizados em cerca de 300 soros de pacientes chagásicos de nove países da América Central e do Sul mostraram haver diferenças quanto à reatividade dos soros frente à proteína B13 (Umezawa *et al.*, 1999) (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição da D.O.₄₉₂ de amostras de soros de pacientes chagásicos de diferentes países em ELISA direto com a proteína recombinante B13-GST (Umezawa *et al.*, 1999). Gráfico de quartil representando a mediana (barra central) e a dispersão dos valores de reatividade a B13.

B13: B13-GST
B13: B13-GST
B13: B13-GST

Os valores de média de reatividade de IgG de soros de pacientes chagásicos à proteína B13 em imunoensaio enzimático (ELISA) variaram em função do país analisado. Por exemplo, Argentina - média da densidade óptica = 1,8; Brasil média da densidade óptica = 1,5 e Honduras - média da densidade óptica = 0,9.

No presente trabalho, no intuito de tentar explicar as diferenças de reatividade de pacientes chagásicos de alguns países da América Central e do Sul à proteína B13, analisamos algumas características desta resposta imune, bem como caracterizamos o polimorfismo do gene correspondente ao antígeno B13 em diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

- a) Caracterizar a resposta de anticorpos à proteína recombinante B13 em soros de pacientes chagásicos brasileiros quanto ao perfil de subclasses de IgG e dependência de linfócitos T;
- b) Mapear e caracterizar estruturalmente o epitopo imunodominante de B13 reconhecido por soros de pacientes chagásicos brasileiros cardiopatas e indeterminados;
- c) Analisar o reconhecimento de epitopos de B13 por soros de chagásicos de diversos países da América Central e do Sul;
- d) Estudar o polimorfismo do gene correspondente a B13 em diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* quanto à sua distribuição no genoma, estrutura gênica e massa molecular do antígeno codificado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Soluções

- **BCA**: ácido bicinchonínico
- **DMSO/DTT (DnD)**: (DTT 1 M, DMSO 90% v/v, Acetato de Potássio 10 mM pH 7,5).
- **IPTG**: 2,4% (isopropil tio- β -D-galactosídio) em água.
- **nt**: nucleotídeo
- **ONPG**: *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
- **PBS**: tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,2; NaCl 150 mM.
- **PBST**: PBS Tween 20 0,1% (v/v).
- **PSG**: tampão fosfato de sódio 60 mM, pH 8,0; NaCl 42 mM; glicose 5,4%.
- **RF1**: RbCl 100mM, MnCl₂. 4H₂O 50mM, CaCl₂. 2H₂O 10mM, acetato de potássio 30mM, glicerol 15%(p/v). O pH foi ajustado para 5,8 com ácido acético 0,2M e a solução filtrada em filtro Millipore de 0,22 μ m.
- **RF2**: (MOPS pH 6,8 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂.2H₂O 75 mM, Glicerol 15% (p/v). O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH e a solução filtrada em filtro Millipore de 0,22 μ m.
- **SDS**: lauril sulfato de sódio
- **SDS-PAGE**: gel de poliacrilamida contendo SDS
- **SSC 1x**: NaCl 0,15 M; citrato de sódio 0,015 M, pH 7,0.
- **sTE**: Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM; NaCl 0,1M.
- **TAE 1x**: Tris-acetato 4 mM; EDTA 1 mM.
- **TBE 1x**: Tris-base 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,3.
- **TE**: Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0.
- **TENS**: NaOH 0,1 M, SDS 0,5 %, Tris-HCl 0,1M pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0.
- **TFB**: (KCl 100 mM, MnCl₂.4H₂O 45 mM, CaCl₂.2H₂O 10 mM, HAcOCl₃ 3mM, K-MES 10 mM pH 6,3). A solução foi filtrada em filtro Millipore de 0,22 μ m.
- **TSM**: (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 10 mM)

3.2 Meios de cultura

3.2.1 Para *Escherichia coli*

- **LB ágar** (Luria-Bertani): Triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, ágar 15 g/L (para meio sólido) pH 7,5.
- **SOB**: triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,585 g/L e KCl 0,86 g/L. O pH foi corrigido para pH 7,5 com KOH 1 M.
- **SOC**: Meio SOB acrescido de glicose 20 mM e MgSO₄ 10 mM.
- **2TY**: triptona 16 g/L, extrato de levedura 10 g/L, NaCl 10 g /L, pH 7,4

3.2.2 Para *Trypanosoma cruzi*

- LIT modificado por Castellani *et al.*, 1967.

3.3 Bactérias

3.3.1 Genótipos da linhagem de *Escherichia coli* utilizada

- **DH5 α** (Bethesda Research Laboratories)

Genótipo relevante: F- λ -*recA1 endA1 hsdR17* (*r_k*- *m_k*+), Δ (*lacZYA-argF*), U169 ϕ 80d *lacZ* Δ M15 *supE44 thi-1 gyrA96 relA1*

Uso: Esta linhagem, defectiva em recombinação (*recA1*), foi utilizada na preparação de células competentes para os experimentos de transformação realizados em todas as clonagens. A deleção dos genes do operon lac (Δ *lac*U169) e a presença do fragmento *lacZ* Δ M15 no profago ϕ 80 permitem a utilização de α -complementação na seleção de recombinantes. A ausência de superprodução do repressor do operon lac (*lacI*^q) possibilita a realização do teste de complementação na ausência de IPTG.

3.4 Vetores de clonagem

- **pBluescript KS-** (Stratagene; Short et al., 1988).

- pUC 18 (Yanisch-Perron et al., 1985).
- pMSgt11 (Scherf et al., 1990).

3.5 Soros

Indivíduos chagásicos foram diagnosticados por pelo menos dois testes de sorologia convencional: hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta ou ELISA. Soros de indivíduos chagásicos brasileiros foram obtidos de pacientes clinicamente avaliados apresentando cardiopatia grave ou a forma indeterminada da Doença de Chagas, acompanhados no Instituto do Coração/Hospital das Clínicas da FMUSP. Os soros controle foram obtidos de indivíduos com sorologia negativa. Os soros oriundos da Argentina, Bolívia, Colômbia, El Salvador, Honduras e Venezuela foram gentilmente cedidos pela Dra. Eufrosina Umezawa do Instituto de Medicina Tropical/FMUSP a qual obteve estes soros de pesquisadores dos países acima citados, com o intuito de utilizá-los na avaliação de diferentes antígenos recombinantes de *T. cruzi* para o diagnóstico sorológico da Doença de Chagas (Umezawa et al., 1999). Os soros da Argentina foram obtidos de pacientes chagásicos crônicos do Hospital Ramos Mejía, provenientes de diversas regiões do país. Os soros da Venezuela foram obtidos de pacientes de zona endêmica (San Juan de los Morros) e de zona não endêmica; 50% de cada. Os soros da Colômbia foram obtidos de diferentes hospitais e bancos de sangue, a maior parte localizados em região endêmica. Não foi comunicada à Dra. Umezawa a origem dos soros da Bolívia, El Salvador e Honduras.

3.6 Tipagem HLA

A tipagem HLA dos indivíduos normais e pacientes chagásicos foi realizada como descrito abaixo e os dados foram gentilmente cedidos pela estudante de mestrado Kellen Cristina Faé do Laboratório de Imunologia de Transplantes do InCor.

3.6.1 Determinação dos antígenos HLA-DRB1 e DQB1 por PCR-SSP e por PCR-SSO

A identificação de antígenos HLA de classe II foi feita por PCR-SSP ("Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers" - Reação de Polimerização em

Cadeia com Iniciadores de seqüências específicas) utilizando método descrito e modificado por Olerup & Zetterquist (1992). Para discriminação alélica, foi utilizada uma técnica de maior resolução: PCR-SSO ("Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Oligonucleotides" - Reação de Polimerização em Cadeia utilizando oligonucleotídeos de seqüências específicas).

3.6.2 Extração de DNA

Amostras de sangue foram coletadas em tubos de 5 ml contendo 0,34 M de EDTA como anticoagulante. As extrações de DNA foram feitas utilizando sais de Brometo de Tetrametilamônio, conforme descrito por Gustincich (1991).

3.6.3 Determinação de HLA-DRB1 e HLA-DQB1 por PCR-SSP (Sequence Specific Primers)

A identificação de antígenos HLA de classe II feita por PCR-SSP permitiu a amplificação de grupos de alelos dos genes DRB1, DRB3, DRB4 e DRB5, que correspondem às especificidades definidas por técnicas sorológicas (DR1 α DR18) DRB1, DR51 (DRB5), DR52 (DRB3) e DR53 (DRB4).

Alíquotas do DNA foram amplificadas com um par de "primers" específicos para um dado HLA de classe II. Todos os tubos continham um par adicional de "primers" que amplificam o terceiro intron do gene DRB1. A mistura de reação de PCR continha 100 ng de DNA genômico em 2 μ L, tampão PCR (50 mM KCl / 1,5 mM MgCl₂ / 10 mM Tris-Cl, pH 8,3, 0,001% gelatina (p/p) 200 μ M de cada dNTP, 1 μ M de cada "primer", 0,2 μ M dos "primers" de controle, e 0,5 unidade de AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus). As amplificações seguiram ciclos de 94 °C (desnaturação), 65 °C (anelamento) e 72 °C (extensão), levando cerca de 1 minuto cada. Após a reação, 2,5 μ L foram aplicados a um gel de agarose/TEB (1,5% NuSieve/0,5% agarose convencional Sea Kem, FMC Bioproducts) a 80 V, incubados com brometo de etídio (1 μ g/mL) e visualizados sob luz violeta. A presença de produto amplificado em um dado par de "primers" era indicador de positividade. Em pacientes onde o PCR não resolvia os dois "alelos" ou onde a tipagem era de baixa resolução, os alelos eram

identificados por seqüenciamento de produtos de PCR de dupla fita com "primers" genéricos usando kit Sequenase conforme instruções do fabricante.

3.6.4 Determinação de HLA-DQ α por PCR-SSO (Sequence Specific Oligonucleotide Probes)

No caso de DQ α utilizamos protocolo descrito por Erlich *et al.* (1990), onde as condições de ampliação foram as seguintes: a partir de 0,5-1 μ g de DNA genômico, utilizando-se "primers" específicos para ampliar em ciclos bifásicos, onde a temperatura de anelamento e de extensão utilizada foi de 65 °C, 30 segundos e para a desnaturação 94 °C, 30 segundos, 25 vezes. A etapa de extensão foi de 10 minutos. Para a marcação terminal da sonda com P³², um volume final de 20 μ L contendo de 100 a 120 ng do oligonucleotídeo era adicionado com 2 μ L de tampão quinase 10X (Tris pH 7.5, 0.5 M / MgCl₂ 0.1 M / EDTA 1 mM), 40 μ Ci de gama ATP³² (3.000 Ci/mmol), 1 μ L T4 polinucleotídeo quinase e água. A mistura era incubada 20 minutos a 37 °C, onde era adicionado mais 1 μ L de quinase, e após 25 minutos a 37 °C de incubação a reação era inativada acrescentando-se 100 μ L de tampão para coluna Sephadex G50 (TES: Tris pH 8 10 mM / EDTA pH 8 1mM / NaCl 100 mM). O material era passado em coluna de Sephadex G50 de 1 mL e centrifugado por 5 minutos a 500g. O DNA amplificado (10 μ L da amostra) era desnaturado em 200 μ L de uma solução de NaOH 0,4 M / EDTA 25 mM a 37 °C por 10 minutos. As amostras foram colocadas nos filtros com auxílio de um aparelho de miniblót. Os poços foram lavados com 2-3 vezes com 200 μ L de TE, O filtro era seco a 80 °C durante 45 a 60 minutos. A pré-hibridização foi feita por 4 horas a 42 °C em 10 ml de 6x SSPE, 5x Denhardt, 100 μ cg/ml de SS DNA, 1% SDS, água qsp e a hibridização por 16 horas com 1 pmol/ml de sonda. Após a membrana foi lavada com SSPE / 0,5% SDS RT, 15 segundos, 1X 20 segundos a 42 °C e 1X, 20 minutos a 57 °C. Pacientes onde o PCR não resolvia os dois "alelos" foram identificados por seqüenciamento de produtos de PCR dupla fita com "primers" genéricos usando kit Sequenase conforme instruções de fabricante.

3.7 Peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintéticos, descritos na Tabela 2, representando epitopos da proteína recombinante B13, foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo Dr. Manuel E. Patarroyo (Bogotá, Colômbia) ou pelo grupo do Prof. Luis Juliano da Escola Paulista de Medicina - UNIFESP (São Paulo). Os peptídeos foram analisados por HPLC mostrando pureza acima de 80% e por espectrometria de massa para confirmação do seu peso molecular (ver item 3.3 de Resultados). O peptídeo pB13 foi usado como um controle positivo e apresenta uma repetição e meia da sequência repetitiva da proteína recombinante B13. O peptídeo pNR (peptídeo não relacionado), que apresenta a sequência de aminoácidos específica da proteína do receptor para antígenos de linfócitos T, subfamília V α 13, foi usado como controle negativo por não apresentar sequência relacionada aos peptídeos em questão.

Tabela 2 - Identificação dos peptídeos sintéticos

Peptídeo	Seqüência	Nº. de aa
pB13	GDKPSLFGQAAAGDKPSLF-NH ₂	19
S4/S5	FGQAAAGDKPS-NH ₂	11
S4	FGQAAAGDK-NH ₂	09
S5	QAAAGDKPS-NH ₂	09
hexa pB13	AAAGDK-NH ₂	06
pNR	NKSAKQFSLHIMDSQPDGS-NH ₂	19

3.7.1 Caracterização dos peptídeos sintéticos

3.7.1.1 Cromatografia líquida de alta pressão - HPLC

A análise por HPLC dos peptídeos utilizados nos ensaios aqui apresentados foi realizada juntamente com a equipe do Prof. Dr. Luis Juliano na Escola Paulista de Medicina, utilizando o sistema HPLC da Shimadzu. Nesse sistema, podemos rapidamente analisar os diferentes componentes de uma amostra através da sua passagem por uma coluna de fase reversa, sob alta pressão e do uso de solventes adequados de maneira a possibilitar a

separação e eluição diferencial dos seus componentes. Utilizamos uma coluna C18 - coluna de sílica derivatizada com hidrocarbonetos de 18 carbonos, que é uma coluna hidrofóbica. Os peptídeos foram dissolvidos em acetonitrila (ACN) 90%, e depois misturados volume a volume com água. O fluxo da coluna foi de 1,7 ml/min. As soluções utilizadas na eluição do peptídeo da coluna foram: 1) Solvente A: 0,1% de ácido fosfórico em água - confere pH ácido à solução de peptídeo, o que possibilita que estes tenham seu grupo amino-terminal na forma protonada (NH_3^+) e o grupo carboxi-terminal na forma desprotonada (COO^-), facilitando assim a interação peptídeo-grupos hidrofóbicos da coluna; 2) Solvente B: 90% de ACN, 0,1% de ácido fosfórico em água - tampão que efetivamente deslocará os peptídeos retidos na coluna. O monitoramento foi feito pela leitura da Absorbância a 220 nm. O peptídeo foi eluído da coluna variando-se a concentração do solvente B no solvente A. Os gradientes de eluição utilizados foram: 1) 10-80 % de solvente B (V/V em solvente A) em 15 minutos ou 2) 0-40% de solvente B em 10 min e logo em seguida 40-80% de solvente B em 15 minutos, dependendo do caráter mais ou menos hidrofóbico do peptídeo a ser analisado.

3.7.1.2 Espectrometria de massa - MALDI TOF-MS ("Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight" Mass Spectrometry)

Esta análise foi executada pela companhia Micromass (fabricante de espectrômetros de massa). Esse tipo de análise nos dá o peso molecular do peptídeo com uma precisão de 1 unidade de massa (um átomo de H). O procedimento adotado para este tipo de análise consiste em: cristalizar a amostra (peptídeo) em uma matriz de ácido nicotínico ou sinapínico que é ionizada por laser (266 ou 355 nm, dependendo do tipo de matriz utilizada). O laser promove a ionização da amostra + matriz que submetidos a uma diferença de potencial formam íons que "voam". Seu tempo de "vôo" num tubo de comprimento fixo é proporcional a sua massa molecular.

3.7.1.3 Seqüenciamento automático N-terminal

O seqüenciamento N-terminal do peptídeo S5 (QAAAGDKPS-NH₂) e hexa (AAAGDK-NH₂) foram realizados pela equipe do Prof. Ângelo Gambarini (Instituto de

Química - USP). O processo é baseado na Química da Degradação de Edman, tendo sido utilizado o seqüenciador automático da Perkin-Elmer.

3.8 Parasitas

3.8.1 *Trypanosoma cruzi*

As cepas utilizadas neste trabalho são caracterizadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Identificação das cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Cepa	Localidade	País	Hospedeiro	Fase da doença	Grupo ^a
CA-1*	San Luis	Argentina	Humano	crônica	1
CER 31	Santa Cruz	Bolívia	<i>Triatoma sordida</i>	-	2
CH 8 T 2	Santa Cruz	Bolívia	Cachorro	-	1/2
CL 14	R. Grande do Sul	Brasil	<i>Triatoma infestans</i>	-	1
Colombiana*	-	Colômbia	Humano	crônica	2
COT 33	Santa Cruz	Bolívia	<i>Triatoma sordida</i>	-	2
COT 38	Santa Cruz	Bolívia	<i>Triatoma sordida</i>	-	2
CL Brener*	R. Grande do Sul	Brasil	<i>Triatoma infestans</i>	-	1
Dm 28c*	-	Venezuela	<i>Didelphis marsupialis</i>	-	2
Esmeraldo cl 3*	Bahia	Brasil	Humano	aguda	1
G*	Amazonas	Brasil	<i>Didelphis marsupialis</i>	-	2
GUA 19	Santa Cruz	Bolívia	<i>Triatoma sordida</i>	-	2
HN - 040*	-	Honduras	Humano	aguda	2
Maracay	-	Venezuela	Humano	nd	1
M 6241 cl 6	Pará	Brasil	Humano	aguda	2
NR cl 3*	Salvador	Chile	Humano	crônica	1/2
SC 43 cl 1*	Santa Cruz	Bolívia	<i>Triatoma infestans</i>	-	2
SIC 3	Cochabamba	Bolívia	<i>Triatoma infestans</i>	-	2

continuação

Cepa	Localidade	País	Hospedeiro	Fase da doença	Grupo ^a
SIC 3	Cochabamba	Bolívia	<i>Triatoma infestans</i>	-	2
Silvio X10 cl 1*	Pará	Brasil	Humano	nd	2
SO3 cl5	Potosi	Bolívia	<i>Triatoma infestans</i>	-	1/2
TP 10	La Paz	Bolívia	<i>Triatoma infestans</i>	-	2
TP 27	La Paz	Bolívia	<i>Triatoma infestans</i>	-	2
Y*	São Paulo	Brasil	Humano	aguda	1
YuYu*	Bahia	Brasil	<i>Triatoma infestans</i>	-	2

^a **Grupo:** As cepas foram classificadas em três grupos com base no produto de amplificação por PCR do domínio D7a do gene de RNA ribossômico 24S α : grupo 1, produto de 125 pb; grupo 2, produto de 110 pb; grupo 1/2, produtos de 125 pb e 110 pb. Ver detalhes em Souto *et al.* (1996).

*: o asterisco indica as cepas das quais o DNA foi purificado como descrito em 3.8.3.

3.8.2 Cultivo de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de algumas cepas de *Trypanosoma cruzi* foram cultivadas no laboratório em meio LIT a 28°C, sem agitação, em repiques semanais. A contagem do número de células foi feita em câmara de Neubauer.

3.8.3 Purificação de DNA genômico dos parasitas

Neste trabalho utilizaram-se preparações de DNA de algumas cepas, gentilmente cedidas pelo Dr. Ricardo P. do Souto (IQ-USP) e obtidas por aquecimento de 5×10^6 parasitas a 100 °C por 10 minutos em 100 μ l de Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM e NaCl 150 mM.

Para as cepas assinaladas com asterisco na Tabela 3, o DNA foi purificado como segue. 10^9 epimastigotas foram ressuspensos em 1 ml de solução contendo NaCl 100 mM,

EDTA 0,25 mM, 100 µg/ml de proteinase K, lauril sarcosinato de sódio 0,5% e 10 µg/ml de RNase A (livre de DNases). Os parasitas foram lisados por incubação da suspensão de células a 50 °C por 30 min com agitação esporádica. Após este período, as amostras foram extraídas com igual volume de fenol por uma hora, com agitação suave e contínua. A fase aquosa foi recuperada por centrifugação (5 min a 1.500 g) e submetida a novos ciclos de extração de fenol até que não se verificasse mais a presença de proteínas na interface. Seguiu-se uma extração rápida com igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) para retirar fenol residual na fase aquosa. As preparações foram dialisadas contra Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM e NaCl 10 mM. O RNA remanescente na preparação foi hidrolisado pelo tratamento com 100 µg/ml de RNase A (livre de DNases) por 3 h a 37 °C. Após digestão, a RNase foi extraída com fenol e a preparação foi dialisada contra TE a 4 °C. A concentração do DNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260 nm ($1A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$).

3.9 Enzimas

- T7 DNA polimerase (Pharmacia);
- enzimas de restrição (New England Biolabs);
- fragmento Klenow de DNA polimerase I (Boehringer Mannheim);
- proteinase K (Boehringer Mannheim);
- RNase A pancreática (Sigma);
- Taq DNA polimerase (Pharmacia);
- T4 DNA ligase (New England Biolabs);
- T4 polinucleotídeo quinase (New England Biolabs);
- Vent® R DNA polimerase (New England Biolabs);

3.10 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados utilizando o programa OLIGO e sintetizados pela Escola Paulista de Medicina ou Promicro.

Oligo 1: 5' -CAAATTAAACCTCATATCACAA-3';

Oligo 2: 5' -AGACGCATCAAACACTGTT-3';

Oligo 4: 5'-AGATTGAAATGTGGTACTGG-3';

Oligo 5: 5'-AAACAGCGCCATTTGTAC-3';

Oligo 6: 5'-CTTCGAGACGCATCAAAC-3'.

Estes oligos foram derivados da sequência do gene *TcCA-2* da cepa *CA-1* de *T. cruzi* (Buschiazzo *et al.*, 1992, apresentada na Figura 4) e da sequência do gene *B13* da cepa *Y* determinada neste trabalho (ver Figura 26A de Resultados). Os oligos 1, 2, 5 e 6 flanqueiam a região que contém as sequências repetidas do gene *TcCA-2* e foram utilizados para amplificação dessa região em diferentes cepas de *T. cruzi*. O oligo 4 foi utilizado para o sequenciamento da região 3' do inserto H5H6 (Gruber & Zingales, 1993) do gene *B13* da cepa *Y* de *T. cruzi* (Figura 5, item 3.19).

```

1  ttactccgcg ggcagccact atagaatggc tccaacatct gcccttccgg cccgtaaaac
61 tagtaacaac tactcatcgg gtttgaagca tgaacagcag gcgcttggct tccctcttag
121 caaagagtat gagaccctgg caccacgttg aggtggccgg ctgagccagg gaacgaaatg
181 ctgtcatgta atgtctgtct atctctgcgc agatgttttt ttttgttgtt ttttttgtgt
241 gtgtgtgatc gtagattcca aaagaacaat tttggggaag aaaggctgca gagggtcaagt
301 gtttctaggc ttccatgatg caacaagaaa caaaagaaac actgctattt gtaagttgta
361 ctgccgtggt atgttgctgg tttgccgata tgcgccatag gacaattgag gccgttaaatt
421 tgtaattggt gcttgaggca caatttctac cttttttttt gctttttttt ttttgttttt
481 tttgtttgat tgagcacaga attatatatt ttttattttt gtttttctgt tgttgattgt
541 tgtggggtcc cgtgatttaa taaatatggc cttgcgtccc acgaaactag atgcggtctg
601 tgaagagggt catggtgaat ttgcatcgtg tggacttgca agtttacagg agctctgcca
661 gcaggtgaga ctgctgcgcg ccaatgtaca acgccttgca tccgaacaaa taccgtcgct
721 cagtctggac ataacagcgc ttcaggagcc tcacctgcac ctgccgttgc atactaattt
781 tcatgttggc atgcaggaga agaaaccggc accaggaagt gtcatctttg gtgctgagtc
841 gtccttttca cactgcaaaa ggctcactgc agactgcaca cgtgggtcgc acagggtgcc
901 cgagaaggaa cgccccacac acatgatgta cgcggtgggg tataccccc attatcccaa
961 cagaaaaatg cttttgtaca attcaaccaa atacaatgaa agagaaaaga tagaagaaaa
HindIII
1021 aaaagataca acatcgtaca caccagcaa cccctcccaa cccaacgccc aaaaagctt
oligo 1
1081 taatccttgt acggacaaat tgaatataaa ccaacaaatt aaacctcata tcacaaataa
oligo 5
1141 taaacaaaaa acaacacttg aaaaaactaa aacagaacaa aaaacagcgc catttgtaca
1201 gggcgctgca *ggtgacaaac catcgctatt tggacaggct gctgcaagg gacaaacct
1261 caccgtttgg acaggccgcc gcaggtgaca agccatcacc atttgacag gccgcgcag
1321 gtgacaaacc atcgctattt ggacaggccg ctgcaggtga caaacacca ccatttgac
1381 aggccgcagc aggtgacaaa ccatcgctat ttggacaggc cgctgcaggt gacaaacct
1441 caccatttgg acaggccgct gcaggtgaca aaccatcacc atttgacag gccgctgcag

repetições seriadas
gtgacaaacc atcgctattt ggacaggccg ctgcaggtga caaaccatca ccatttgac
aggccgctgc aggtgacaag ccatacccat ttggacaggc cgctgcaggt gacaaacct
caccatttgg acaggccgct gcaggtgaca aaccaccacc atttgacag gccgctgcag
gtgacaaacc atcgctattt ggacaggccg ctgcaggtga caaacacca ccatttgac
aggccgctgc aggtgacaaa ccatcaccat ttggacaggc cgcagcaggt gacaaacct
caccatttgg acaggccgct gcaggtgaca aaccaccacc atttgacag gctgctgcag
oligo 2
gtgacagacc atcaccattt ggacag*ggaa cagt gtttga tgcgtctcga agcactgtgt
oligo 6 (sublinhado)
ttgcgaatgc gcctggtggt gccaggtgt cgtttggaaa gccatcgac acgtttgcaa
ccacatcctt tgctgctggt ggtgggtttg gaggaccaag tgcttttgg tctattttac
agaatgttca tgctacattg cctgccggaa gcgcgttgtc tcatattgga agtgcctttg
gttctccttg aatgcattct ggcggtgcgt ttggtggagc aggtgtaagt ggtccggcaa
ttggtggtgg taaactacct gcattggagg gaagtgggtt tggtcaggct tttagtgtct
ttggcaatca tgcatacaact gttttaggaa atttttgtca gaaagaagg gagggcacct
ttggtactgt gggagcccat gggacgggtt ccgccacccc gttttcaaag accagtacca
catttcaatc ttcttctttt tccagtattg cgggaaacta caaggctctc cgcaatttaa
gagtgttttt ggtcctcatt gatatgcggt ttttttttaa tctgaatttt tgcttgtaaa
tgataatcaa ttaatttgaa gttgttttgg ggatgtttgt gcaactttgc ttgctgaaag
ccatttggtt tttggttgtt gttgttgggt tttttggctc aaggaataac atttgggcat
gtcggtgaa ttgggtgaac tggaaattaag ggaagttgaa gagggggatg taccgagctt
tttagatctt ctcaggcacc tgactgatgc accggctgtg actgcatctg cgctgcaggc
aattgctgag gcacgtcgtc aagctggcat ggtaacaaag gtttttattc acagaccaac
aaggcgtgtc gtagggactg catctctttt tgttgaaccc aaattttcgc gcggtggaaa
HindIII
atctgtggga cacattgaag catgtcgttg ttgatccctc atatcgaggc aaaagcttg
ggcaggccca ttgatgacct tgcaatattg ccgt

```

Figura 4 - Sequência nucleotídica do gene TcCA-2 de um clone da cepa CA-1 (Buschiazzo *et al.*, 1992) (Accession Number: M92049), homólogo ao gene B13 da cepa Y (Gruber & Zingales, 1993) com indicação do sítio de *HindIII* e da posição dos oligos selecionados. O início e o fim das repetições seriadas estão marcados por asteriscos (*). O número total de repetições é de aproximadamente 75 (Buschiazzo *et al.*, 1992).

3.11 Nucleotídeos radioativos

- [α - ^{32}P]dATP (3.000 Ci/mmol) (Amersham)
- [^{35}S]dATP α S (>1.000 Ci/mmol) (Activa)

3.12 Obtenção da proteína B13 recombinante

3.12.1 Preparação de células bacterianas competentes e transformação

A preparação de células competentes foi feita de acordo com o protocolo de Hanahan (1983). Uma colônia de DH5 α foi utilizada para inocular um Erlenmeyer contendo 20 ml de meio 2-TY. O frasco foi cultivado sob agitação por 16 h a 37 °C. Um inóculo desta cultura foi adicionado a 100 volumes de caldo SOB contendo 10 mM MgSO₄. Procedeu-se a uma incubação a 37 °C, sob agitação, até que a D.O.₆₀₀ atingisse um valor entre 0,4 a 0,6. O frasco foi então mantido em gelo por 10 minutos e, em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 1.000 g a 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi muito bem drenado e as células bacterianas foram ressuspensas em 1/3 do volume inicial em TFB (100 mM KCl; 45 mM MnCl₂.4H₂O; 10 mM CaCl₂.2H₂O; 3 mM cloreto de hexaminocobalto; 10 mM K-MES, pH 6,3). Seguiu-se uma incubação de 10 minutos em gelo e nova centrifugação. As células foram então ressuspensas em 1/12,5 do volume original em TFB, e adicionou-se 3,5% v/v de DnD (1 M DTT; 90% DMSO; 10 mM acetato de potássio, pH 7,5). Procedeu-se a uma incubação de 10 minutos em gelo e adicionou-se mais DnD, para completar 7,0% final, seguindo-se mais uma incubação de 10 a 20 minutos em gelo. A suspensão de células foi transferida para tubos de ensaio previamente resfriados, em alíquotas de 200 μL . Para a transformação adicionou-se o DNA do recombinante pMSgt11-B13 (obtido por Gruber & Zingales, 1993), e incubou-se por 20 a 40 minutos em gelo. As células transformadas foram então submetidas a um choque térmico a 42 °C por 90 segundos e nova incubação no gelo por 2 minutos. Em seguida, foram semeadas com alça de Drigalski em placas de LB Ágar contendo Amp 100 $\mu\text{g/ml}$. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas.

3.12.2 Expressão da proteína de fusão β -galactosidase-B13 (β -gal-B13)

Uma colônia de bactéria DH5 α contendo o vetor recombinante pMSgt11-B13 (gentilmente cedido pelo Dr. A. Gruber), que codifica a proteína de fusão β -gal-B13, e cuja sequência repetitiva de B13 é mostrada na Figura 2 - Introdução, foi inoculada em 10 ml de caldo 2-TY com Amp (100 μ g/ml). Procedeu-se a uma incubação a 37 °C, sob agitação por 16 h. No dia seguinte, utilizou-se 1 ml da cultura como inóculo de 100 ml de caldo 2-TY/Amp. O meio foi incubado sob agitação a 37 °C por 16 horas. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 6.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento bacteriano foi congelado em gelo seco/acetona e estocado a -80 °C até o momento do uso.

3.12.3 Obtenção do lisado bacteriano

O sedimento bacteriano de 100 ml de cultura foi ressuspenso em 10 ml de tampão de lise TSM (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 10 mM) adicionado de PMSF e TLCK para 1mM final e de lisozima 0,2 mg/ml. Incubou-se à temperatura ambiente por 20 minutos para que ocorresse a lise celular. O volume do lisado foi aumentado com a adição de mais 20 ml de TSM, e submetido a 4 ciclos de 20 segundos de sonicação (Modelo W185D - Heat Systems, Ultrasonics Inc.) na unidade 7 de intensidade. Este procedimento visou fragmentar parcialmente o DNA e reduzir a viscosidade da solução. Alternativamente, quando se buscava analisar por eletroforese uma pequena amostra de lisado, seguiu-se outro processo. Um volume de 1 ml da cultura foi centrifugado em tubo Eppendorf^R por um minuto. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 200 μ L de tampão de amostra 2X (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 5% β -mercaptoetanol; 20% glicerol; 0,02% azul de bromofenol). A presença de SDS no tampão provoca a lise instantânea das bactérias. A solução foi então fervida por 5 minutos, centrifugada brevemente e analisada em gel de poliacrilamida 8% com SDS (Laemmli, 1970).

3.12.4 Purificação da proteína recombinante B13.

A proteína de fusão β -galactosidade-B13 presente no lisado bacteriano foi purificada por cromatografia de afinidade, segundo o método de Steers *et al* (1971). Uma coluna contendo 3 ml de resina pAPTG-agarose (Sigma) foi montada. A resina foi equilibrada com TSM e 30 ml de lisado bacteriano (ver item 3.12.3) foram aplicados na coluna. Esse

volume foi reciclado várias vezes, com um fluxo de 0,2 ml/min. A seguir a coluna foi lavada com 90 ml de TSM e as proteínas de fusão eluídas em tampão tetraborato de sódio 0,1 M, pH 10,0. Foram recolhidas frações de 2 ml em um total de 40 ml. A coluna foi reequilibrada com TSM, podendo ser utilizada cerca de 6 a 8 vezes. No sistema de expressão DH5 α -pMSgt11 as proteínas de fusão mantêm a atividade enzimática. Dessa forma, as frações coletadas foram analisadas quanto à atividade enzimática da β -galactosidase quimérica (item 3.12.5). As frações ativas foram reunidas e dialisadas por 16 h contra 1.000 volumes de água destilada, com uma troca. Em seguida, determinou-se a concentração proteica pelo método de Bradford, utilizando-se o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 fornecido pela Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay Kit I).

3.12.5 Detecção da atividade de β -galactosidase

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

3.12.6 Eliminação de lipopolissacarídeos (LPS) da preparação da proteína recombinante B13 por cromatografia de afinidade

A proteína B13 (1-2 mg/ml em água) foi passada por coluna de polimixina B-agarose (Sigma) para eliminação de lipopolissacarídeos contaminantes (Morrison & Jacobs, 1976). O material não ligado à resina foi recolhido e sua concentração foi determinada pelo método de BCA Pierce (BCA* Protein Assay Reagent, cód. 23225, Bio-Rad).

3.12.7 Eletroforese unidimensional de proteínas em SDS-PAGE para coloração de LPS

Foi utilizado o sistema descontínuo de gel de Laemmli (1970) contendo um gel de separação de 14% com 4 M de uréia (Tsai & Frasch, 1982). Após a corrida, o gel de

separação foi então removido e mantido em uma solução fixadora de 40% etanol e 5% de ácido acético por 16 h. Essa solução foi trocada por 0,7% de ácido periódico e 40% etanol, para oxidação do LPS, mantendo-a por 5 min., agitando a 40 rpm. O gel foi lavado 3 vezes por 15 minutos com água destilada agitando a 40 rpm. A água foi retirada e adicionou-se a solução de coloração: 28 ml de NaOH 0,1 N à qual foram adicionados 2 ml de hidróxido de amônio concentrado; sob agitação adicionou-se 5 ml de AgNO₃ 20% e o volume foi completado para 150 ml com água destilada. O gel foi mantido nessa solução por 30 minutos sob agitação (70 rpm). Em seguida, a solução de corante foi removida e o gel foi lavado 3 vezes por 10 minutos com água, agitando a 40 rpm. Após esse procedimento foi colocado o reagente de revelação: 50 mg/ml de ácido cítrico e 500 µl/ml de formaldeído 37%. A solução foi agitada até o aparecimento da coloração, que pode ser bloqueada lavando-se com água. O gel foi fotografado e secado em secador de gel BioRad.

3.13 Análise de proteínas em SDS-PAGE

3.13.1 Eletroforese unidimensional de proteínas em SDS-PAGE

Este sistema baseado em Laemmli (1970) foi utilizado tanto para análise do lisado bacteriano e proteína B13 purificada (obtido como descrito no item 3.12.3) quanto para o lisado de epimastigotas de *T. cruzi*. Neste caso, cerca de 80 milhões de células de epimastigotas foram centrifugadas em microfuge (30 segundos) e lavadas uma vez com PBS. Os sedimentos foram lisados com 80 µL de tampão de amostra 2X (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 5% β-mercaptoetanol; 20% glicerol; 0,02% azul de bromofenol, acrescido de inibidores de proteases: Pepstatina (8 µg/ml), Benzamidina (2 mM), E.64 (20 µM), TLCK (1 mM), PMSF (1 mM), Leupeptina (2 µg/ml), Antipain (2 µg/ml) e Aprotinina (2 µg/ml). As amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 7,5%. Após eletroforese, o gel foi corado com azul de Coomassie, como descrito a seguir, ou transferido para membrana de nitrocelulose para "Western blot" como descrito no item 3.13.2. Para coloração do gel com azul de Coomassie foi utilizada a solução corante (0,3% de azul de Coomassie R-250 em 50% metanol/10% ácido acético) que foi aquecida em forno de microondas por 3 minutos. Em seguida, a solução de corante foi removida e substituída pela solução descorante (10% etanol/7% ácido acético). O gel foi descorado sob agitação leve,

fazendo-se várias trocas da solução descorante. Finalmente, o gel foi colocado sobre um papel mata-borrão, coberto com um plástico fino e seco, sob vácuo, em aparelho secador de gel (BioRad) a -80°C .

3.13.2 Western blot

A transferência para papel de nitrocelulose foi feita segundo Towbin *et al.* (1979). Após transferência, a membrana foi corada por 3 minutos com uma solução de Ponceau S (0,2% p/v Ponceau S; 1,0% v/v ácido acético), para marcar as posições dos pesos moleculares. A membrana foi lavada várias vezes com TBS 1X (Tris-HCl 200 mM pH 7,5, NaCl 1,5 M) até a retirada do corante. A membrana foi incubada em TBS 1X/3% leite Molico®/Tween 20 0,03% durante 60 minutos. O soro de coelho anti- β -gal-B13, obtido segundo Gruber & Zingales (1993), foi diluído 1:50 em TBS 1X/3% Molico® e incubado com a membrana por 16 h a 4°C . Após a incubação, a membrana foi lavada por 3x (10 minutos cada) com TBS 1X e bloqueada por 30 minutos com TBS/3% Molico®. A membrana foi incubada com o conjugado fosfatase alcalina anti-IgG de coelho (1:4.000) por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida foi lavada por 3x (10 minutos cada) com TBS 1X à temperatura ambiente e com tampão de substrato (Tris-HCl 100 mM final pH 9,5, NaCl 100 mM final, MgCl_2 5 mM final) por 5 minutos. A membrana foi revelada com 100 ml do tampão substrato contendo 10 mg de azul de nitrotetrazolim (NBT), 5 mg de bromo-cloro-indolil-fosfato (BCIP) em 1 ml de DMF. A reação foi interrompida, lavando-se a membrana com H_2O deionizada.

3.14 Testes de ELISA

3.14.1 Testes de ELISA direto com B13

A placa de poliestireno ("ELISA plate" Corning No. 25801-96) foi sensibilizada com a proteína B13 (30 ng/poço em tampão bicarbonato 0.005 M pH 9.6) por 16 h a 4°C . Após a lavagem com PBS, os poços foram bloqueados com PBS-2% BSA por 30 min a 37°C . Soros de pacientes chagásicos diluídos 1/50 foram incubados por 1 h a 37°C . Após 10 lavagens com PBS-Tween 20 0,1%, o conjugado anti-IgG humana-peroxidase (diluição

1:10.000) foi incubado por 30 min a 37 °C. Novamente a placa foi lavada 10 vezes com PBS-Tween 20 0,1% e após foram adicionados 50 µl da solução de substrato (4 mg de o-fenilenodiamina em 10 ml de tampão citrato pH 5,0 e 4 µl de H₂O₂ 30%). A D.O. a 490 nm foi lida após 30 min a 37 °C.

3.14.2 Testes de ELISA de competição com peptídeos sintéticos

Os ensaios de inibição competitiva da ligação de anticorpos à proteína B13 em fase sólida por pré-incubação com peptídeos sintéticos foram baseados em Dale & Beachey (1986) e Neu *et al.* (1987) que utilizaram o teste para detectar reações cruzadas entre o antígeno de fase sólida e o antígeno solúvel. Os soros de pacientes chagásicos foram incubados na diluição adequada com peptídeos sintéticos (0,1 mM final) por 16 horas a 4 °C, antes de serem adicionados ao poço contendo a proteína B13. O teste de ELISA foi realizado como descrito no item 3.14.1.

A otimização do teste de ELISA competitivo depende de titulação para identificação da diluição ideal do soro (entenda-se como diluição ideal aquela que forneça D.O. de reatividade com a proteína B13 entre 0,4 - 0,8). A porcentagem de inibição soro/peptídeo foi calculada com a seguinte fórmula, onde o peptídeo não relacionado (pNR, ver Tabela 2) foi utilizado como branco:

$$[\text{DO}(\text{soro+pNR})] - [\text{DO}(\text{soro+peptídeo teste})] / [\text{DO}(\text{soro+pNR})] \times 100$$

3.14.3 Determinação de subclasse de imunoglobulina G

Foi realizada por ELISA direto com B13 na fase sólida como descrito no item 3.14.1. Foi feita uma titulação de cada subclasse de conjugado anti-IgG humano-peroxidase e também da melhor diluição dos soros para análise das mesmas. Para a análise de IgG1, IgG2 e IgG3 o soro foi diluído 1/200, para a análise de IgG4 usou-se a diluição de 1/100. Após incubação da proteína B13 com os soros e lavagens adequadas, foram adicionados os conjugados (Pharmingen) anti-IgG1, anti-IgG3 (diluídos 1/200) e anti-IgG2, anti-IgG4 (diluídos 1/100) e incubados por 1 h a 37°C. A análise quantitativa foi feita através da curva de titulação obtida para cada subclasse de IgG (Pharmingen).

3.15 Análise estrutural por DC e RNM

Estes estudos foram desenvolvidos no laboratório do Prof. Alberto Spisni (Universidade de Parma, Itália). As amostras dos peptídeos (10-15 mM em H₂O ou 80% trifluoetanol (TFE)/H₂O) foram analisadas em um espectropolarímetro JASCO 515, com "path length" de 0,1 mm e faixa espectral de 260-185 nm. A constante de tempo de aquisição dos dados foi mantida entre 2 e 4; um espectro médio foi obtido a partir de quatro espectros. A atividade óptica foi expressa em elipticidade molar (ϵ). A percentagem de contribuição ao espectro CD final dos vários componentes estruturais do peptídeo (hélice α , folha β pregueada - "pleated sheet", voltas - "turns", etc) foi calculada usando um Algoritmo CONVEX desenvolvido por Chou & Fasman (1978). Os peptídeos para a amostra de RMN foram purificados por HPLC, liofilizados e dissolvidos (3-5 mM) em 0,7 ml de TFE-d₃/H₂O (água pesada/deuterada); a razão é de 8:2 até 7:3, dependendo do peptídeo, em pH 4,0. Os desvios químicos tiveram como referência o sinal da H₂O em 4774 ppm, T=298 K. Todos os experimentos foram realizados com uma sonda próton-seletiva de 5 mm em um espectrômetro Bruker AMX 400 (400 MHz, equipado com um magneto supercondutor Oxford Instruments e um computador Aspect 32, ou em um espectrômetro Varian Unity 600 (600 MHz), em duas temperaturas (298 e 310 K). Experimentos de temperatura variável ¹D¹H-NMR foram gravados entre 298 e 355 K, usando pontos de dados de 16 K para aquisição e 32 K para transformação. Maiores detalhes podem ser encontrados em Duranti *et al.* (1999) (trabalho em anexo).

3.16 PCR

3.16.1 Reação de PCR

Algumas amostras de DNA de diferentes isolados de *T. cruzi*, utilizadas nos ensaios de PCR foram gentilmente cedidas por R. P. do Souto de nosso Laboratório e outras foram purificadas por nós (ver item 3.8.3).

A reação de amplificação ocorreu conforme descrito por Saiki *et al.* (1988). Duzentos nanogramas de DNA foram amplificados na presença de 0,5 mM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,4 mM de cada deoxinucleotídeo (dNTP), 10 mM de Tris-HCl (pH

8,3 a 25 °C); 50 mM KCl; 3 mM de $MgCl_2$; 100 $\mu g/ml$ BSA e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase ou 1 U de Vent_R® polimerase em um volume final de 50 μl . As amostras foram desnaturadas a 94 °C por 4 minutos e submetidas a trinta ciclos de três temperaturas: 1 min a 94 °C para desnaturação, 1 min a 55 °C para anelamento e 2 min a 72 °C para extensão em termociclador "MiniCycler™, MJ Research".

É importante ressaltar que tivemos que ajustar as condições tanto de temperatura, quanto de concentração de $MgCl_2$ bem como do tipo de DNA polimerase utilizada na tentativa de melhorar a amplificação, o que será melhor discutido no capítulo de Resultados.

3.16.2 Análise dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose

A um quinto do volume da reação de amplificação foi adicionado tampão de amostra para DNA, aquecido a 67 °C por 5 minutos e aplicado em gel de agarose 0,7% em TBE (Tris-ácido bórico 90 mM pH 8,3 e EDTA 2 mM). A eletroforese ocorreu a 80 -100 V por 90 minutos em TBE 1X com brometo de etídeo 0,5 $\mu g/ml$.

Após eletroforese, o gel foi fotografado sob luz UV; a migração dos fragmentos do marcador de peso molecular foi determinada.

3.16.3 Clonagem de produtos de PCR

Após a reação de PCR, os produtos amplificados foram precipitados com acetato de amônio e 2,5 volumes de etanol a -20 °C por 16 h. O sedimento foi ressuspensão em água (1/5 do volume inicial). O DNA recuperado foi utilizado em reação de ligação com vetor pBluescript T (pBluescript clivado com *Eco* RV, ao qual foi adicionado um nucleotídeo T - Marchuck *et al.*, 1990), preparado e gentilmente cedido por Euclides Mateucci Jr (IQ-USP). A reação de ligação continha 10 ng do DNA do vetor e 30 ng de produto de PCR purificado e água suficiente para obter um volume final de 15 μL . Foi adicionado 4 μL de tampão de ligação 5X e 1 μL de T4 DNA ligase. A reação foi incubada por 16 horas a 16 °C. A transformação de *E. coli* DH5 α foi procedida como descrito no item 3.12.1.

Os clones obtidos foram isolados e seqüenciados como descrito no item 3.20.

3.17 Southern blot

Amostras de 10 µg de DNA das cepas de *T. cruzi* foram digeridas com 60 U da enzima de restrição *Hind*III a 37 °C por 7 horas no tampão apropriado. Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 0,7% como descrito no item acima (3.16.2). Após eletroforese, o gel contendo a digestão do DNA das cepas ou o produto do PCR (item 3.16.1) foi incubado à temperatura ambiente por 15 minutos na solução de depurinação (HCl 0,2 M) com agitação suave. Então, o gel foi lavado com água destilada e, em seguida, incubado com solução de desnaturação por 30 minutos (NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M) com agitação suave. O gel foi lavado com NaOH 0,25 M e NaCl 1,5 M e a seguir as amostras foram transferidas para membrana de Nylon (Amersham Hybond - N), utilizando a mesma solução de lavagem do gel. Após transferência, a posição das canaletas foi marcada na membrana a qual foi lavada rapidamente com SSC 2X e deixada para secar a temperatura ambiente. A membrana foi exposta a luz UV durante 5 minutos, com o lado que contém o DNA virado para a luz e depois colocada para secar a 80 °C por 2 horas.

3.17.1 Obtenção de sondas radioativas

Como sonda foi utilizado o inserto H5H6 do gene B13 que contém as seqüências repetidas (ver item 3.19). Foi utilizado o "kit" de marcação de Random Primer da Gibco.

Ao DNA desnaturado por 5 minutos a 100 °C (100 ng) em 23 µl de água foi acrescentado: 2 µl de dCTP; 2 µl de dGTP; 2 µl de dTTP; 15 µl de "Random Primer Buffer Mix" (HEPES 200 mM, pH 6,8; Tris-HCl 50 mM; MgCl₂ 5 mM; β mercaptoetanol 10 mM; BSA 0,4 mg/ml e hexanucleotídeos aleatórios 0,27 O.D._{260 nm}) e 4 µl [α -³²P]dATP (30 µCi). Após a mistura dos reagentes foi acrescentado 1 µl da enzima Klenow (3U). A reação prosseguiu por 2 h a temperatura ambiente. Ao final desse período, foram adicionados 5 µl de "stop buffer" (0,2 M Na₂EDTA, pH 7,5) e 45 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM). Para eliminação dos nucleotídeos não incorporados a sonda foi passada em coluna Sephadex G-50 como descrito por Sambrook *et al.* (1989). A radioatividade incorporada na sonda foi determinada em espectrômetro de cintilação líquida.

3.17.2 Hibridização e lavagem da membrana

A membrana nylon foi mantida na solução de pré-hibridização (SSC 3X; SDS 0,1%; EDTA 1 mM; Ficoll 0,1%; PVP 0,1%, e esperma de salmão 0,1 mg/ml previamente desnaturado por 5 minutos a 100 °C) por no mínimo 90 minutos a 67 °C. A sonda radioativa foi desnaturada na mesma solução de pré-hibridização durante 5 minutos a 100 °C e resfriada rapidamente em gelo. Esta solução foi adicionada à membrana e hibridizada por 16 h a 67 °C. A lavagem da membrana foi feita a 67 °C por incubações subsequentes em: SSC 3X/SDS 0,1% (60 min); SSC 1X/SDS 0,1% (60 min) e SSC 0,1X/SDS 0,1% (duas lavagens de 30 min). A membrana foi exposta a filme de raio-X em presença de tela intensificadora a -70 °C.

3.18 Eletroforese de Campo Pulsado

As amostras referentes a formas epimastigotas de diferentes cepas de *T. cruzi* foram preparadas conforme descrito anteriormente por Cano *et al.* (1995) e submetidas à eletroforese (Rapid agarose 1,1% / TBE 0,5x) utilizando-se o sistema Gene Navigator® da Pharmacia, o qual possui um conjunto de eletrodos dispostos em um contorno hexagonal. Utilizaram-se cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae* YPH80 e *Hansenula wingei* fornecidos por Gibco-BRL (MegaBase™ DNA Standard) como marcadores de peso molecular. As condições de eletroforese foram as descritas por Cano *et al.* (1995), sendo 30 h de eletroforese com pulsos de 90 s, 30 h com pulsos de 200 s, 24 h com pulsos de 350 s, 24 h com pulsos de 500 s e 24 h com pulsos de 800 s, totalizando 132 h de corrida (temperatura mantida em 9 °C). Ao final deste período o gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL durante 30 minutos para ser fotografado.

Para a transferência do DNA para membrana de nylon, o gel foi tratado sequencialmente com solução de depuração (HCl 0,25 M) por 40 minutos, solução de desnaturação (NaOH 0,5 M / NaCl 1 M) por 30 minutos e finalmente durante 20 minutos em tampão de neutralização (Tris-HCl 1 M pH8,0 / NaCl 0,5 M). A transferência foi feita sob vácuo (10 cm Hg) por 2h utilizando-se o aparelho Trans-Vac® TE 80 da Hoefer, sendo que a solução de transferência foi SSC 20X.

A membrana foi rapidamente lavada com SSC 3X e mantida à temperatura ambiente até que estivesse seca. Em seguida, a mesma foi envolvida em filme de PVC (tipo Magipack®) e irradiada sob luz UV durante 5 minutos. Após este período, foi feita uma incubação a 80°C durante 2h. A hibridização das membranas com sondas radioativas está descrita no item 3.17.2.

3.19 Clonagem do inserto H5H6 do gene B13

O inserto H5H6 (Figura 5) contém as repetições seriadas do gene B13 (área hachurada na figura) e está clonado no sítio de *Hind*III de pUC18. Este plasmídeo foi gentilmente cedido pelo Dr. Arthur Gruber (Gruber, 1994 - tese de doutoramento). No entanto, o plasmídeo pUC18 utilizado apresentava uma deleção no sítio correspondente ao "Universal primer" que impedia seu sequenciamento. Desta forma, o inserto H5H6 foi subclonado no vetor pBluescript KS⁺.

Figura 5 - Mapa de restrição da região de 32 kb do genoma de *T. cruzi* que contém os genes B11, B12 e B13 (Gruber, 1994). O quadro hachurado indica as repetições seriadas de B13. As letras e números no mapa indicam a posição dos sítios de restrição citados no texto. As flechas indicam o sentido de transcrição dos genes. Enzimas: B = *Bam*HI; E = *Eco*RI; H = *Hind*III; N = *Nco*I; S = *Sal*I; St = *Stu*I. Os números de acesso no GenBank são indicados.

3.19.1 Purificação de inserto para posterior ligação

O DNA de pUC18-H5H6 (ver posição na Figura 5) foi digerido com a enzima *Hind*III (5h a 37 °C). A amostra foi aplicada em gel de agarose 0,7%. Após eletroforese, o inserto foi purificado como descrito a seguir. O gel foi cortado com o auxílio de um bisturi em uma linha paralela acima e abaixo da banda de interesse, introduzindo-se nas fendas uma membrana DE81-Whatman. A eletroforese foi continuada até que a banda tivesse migrado completamente para a membrana (monitorado com auxílio de luz UV). Em seguida, a membrana foi retirada e lavada rapidamente em TBE e colocada em um tubo eppendorf contendo 500 µl de um tampão de alta força iônica (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; NaCl 1,5 M; EDTA 2 mM pH 8,0). A membrana foi mantida nesta solução por 60 min a 37 °C. A membrana foi retirada e foi adicionado 1 volume de etanol frio mantendo-se por 16 h a -20 °C. A amostra foi centrifugada durante 15 minutos a 4 °C e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado. Finalmente o precipitado foi seco e ressuspenso em 25 µL de água.

3.19.2 Ligação e Transferência

A ligação do inserto H5H6 com o plasmídio pBluescript KS⁺ foi realizada, em uma relação molar de 3:1 (fragmento de DNA:vetor). 28 ng do DNA do vetor digerido com enzima *Hind*III foi transferido para um tubo eppendorf, adicionado de quantidade adequada do inserto H5H6 purificado e água suficiente para obter um volume final de 7 µL. Foi adicionado 2 µL de tampão de ligação 5X e 1 µL de T4 DNA ligase. A amostra foi incubada por 16 h a 16 °C e utilizada para transformação de DH5α competentes como descrito no item 3.12.1.

3.19.3 Speed Prep de DNA plasmidial

Cada colônia obtida foi semeada em 2 ml de meio 2TY (ver item 3.2.1) acrescida de ampicilina para 100 µg/ml e mantida a 37°C sob agitação por 16 h. 1,5 ml da cultura foi centrifugado por 30 segundos, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado ressuspenso em 100 µl de solução A (Triton X-100 4%, Tris 50 mM pH 8,0, LiCl 2,5 M, EDTA 62,5 mM). A extração foi feita com 50 µl de fenol e 50 µl de clorofórmio e a fase aquosa foi transferida

para eppendorf com 200 µl de etanol frio. Após agitação leve, a amostra foi centrifugada por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado de DNA lavado com 1 ml de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e a amostra foi seca sob vácuo e ressuspensa em 10 µl de TE (Tris 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM) acrescido de RNase para 100 µg/ml. Foi feita uma incubação a temperatura ambiente por 5 minutos. Rendimento: 2 a 4 µg de DNA

3.19.4 Mid Prep de DNA plasmidial

20-25 ml da cultura bacteriana incubada por 16 h foi centrifugada a 5.000g por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 600 µl de tampão TEG (glicose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris 25 mM pH 8,0) e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,2 ml de solução NaOH 0,2 N- SDS 1%, mantendo-se em gelo por 5 minutos. Foi acrescentado 900 µl de solução gelada de acetato de potássio 3M e a amostra foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e precipitado com igual volume (2,7 ml) de isopropanol a -20 °C por 15 minutos. Foi feita uma centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi seco sob vácuo e ressuspenso em 1,5 ml de TE adicionando-se RNase para 50 µg/ml finais e incubando-se 37 °C por 20 minutos. As proteínas foram removidas por extrações com fenol e com clorofórmio, e os ácidos nucleicos precipitados com 0,1 volume de acetato de sódio 3 M e 2,5 volumes de etanol a -20 °C por 2 horas. Após centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4°C, o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspenso em 250 µl de água deionizada ou TE. Rendimento: aproximadamente 200 ng/µl de DNA

3.19.5 Preparação de plasmídeos em larga escala

500 ml da cultura foram incubados por 16 h e centrifugados a 7.000 rpm em rotor Beckman JA-14 ou Sorvall GSA por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 4 mL de solução I (Tris HCl 25 mM pH 8,0, glicose 50 mM, EDTA 10 mM). Foi adicionado 1 mL de solução de lisozima (25 mg/ml em solução I), misturando-se bem e mantendo-se a amostra à temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionou-se 10 ml de solução II (NaOH 0,2 N- SDS 1%) recém preparada, misturada lentamente por inversões e mantida em gelo

por 10 minutos. A cada tubo foi adicionada 7,5 ml de solução gelada de acetato de potássio 3 M, misturada por inversão até o desaparecimento das diferentes fases líquidas e mantida em gelo por 10 minutos. O lisado foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C em Beckman JA-20 ou Sorvall SS-34 e filtrado em 4 camadas de gaze em funil. Ao sobrenadante foi acrescentado 0,6 volumes de isopropanol, misturado e mantido à temperatura ambiente por 10 minutos. Foi feita uma centrifugação a 11.000 rpm por 20 minutos em Beckman JA-20 ou Sorvall SS-34. O sedimento foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo e dissolvido em 4ml de TE. Foi então adicionado então 4,4 g de CsCl, misturando até a completa dissolução. Foi acrescentado 0,4 ml de solução de brometo de etídio (10 mg/ml) e centrifugado a 8.000 rpm por 5 minutos em Beckman JA-20 ou Sorvall SS-34. O sobrenadante foi recuperado com pipeta ou por filtração em gaze. O índice de refração da solução foi ajustado para 1,387 (correspondente a 1,55 mg/ml de CsCl) e centrifugado a 60.000 rpm por 16-20 h (rotores VTi65 ou VTi80), ou 45.000 rpm por 48 h (rotor Ti50), ou 60.000 rpm por 24 h (rotores Ti65 ou Ti70.1), a 20°C. A banda de DNA foi coletada. Remoção do brometo de etídio: Adicionar 1 volume de n-butanol saturado com água, agitar e manter em repouso até a separação das fases. Aspirar a fase com trompa de vácuo. Repetir as etapas acima descritas até desaparecimento da cor vermelha de ambas as fases. Remover o CsCl por diálise contra 1.000 volumes de TE por 24-48 horas com 3 a 4 trocas de tampão. Precipitar os ácidos nucleicos da amostra proveniente da diálise com acetato de sódio e etanol e ressuspender em aproximadamente 1 ml de TE. Rendimento aproximado: 200 µg de DNA/500 ml de cultura

3.20 Seqüenciamento

Foi utilizado o método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977).

3.20.1 Preparação da amostra

Para a desnaturação alcalina do DNA foram preparados 2 eppendorfs (1 para cada primer) com aproximadamente 3 µg de DNA em um volume total de 15 µl (em H₂O deionizada). A cada eppendorf foi adicionado 2 µl de NaOH 2 N, EDTA 2 mM (solução

preparada na hora) e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram acrescentados 3 µl de acetato de sódio 3 M pH 5,3; 7 µl de água deionizada e 75 µl de etanol, misturados e mantidos a -70 °C (banho de etanol e gelo seco) por 5 minutos. Após essa rápida incubação a solução foi centrifugada a 10.000 g a 4 °C por 5 minutos e o sobrenadante foi aspirado. O precipitado foi lavado com 200 µl de etanol 70% gelado e secado a vácuo.

3.20.2 Reação de seqüenciamento

Realizada com o T7 Sequencing Kit da Pharmacia.

Ao DNA desnaturado e seco, foi adicionado 5,0 µl de primer (1 pmol/µl) e 2,0 µl de "annealing buffer" e 7 µl de água deionizada. A amostra foi centrifugada rapidamente e incubada seqüencialmente por 2 minutos a 67 °C, 15 minutos a 37 °C, 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 3 µl de "labelling mix", 2 µl T7 DNA polimerase (diluída 1:5) e 1 µl de dATP ³⁵S (12,5 µCi/µl) e incubando-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Enquanto isso, os tubos eppendorf com 2,5 µl do mix das bases (short A, short T, short C e short G) foram aquecidos a 37 °C por pelo menos 1 minuto. Após a incubação de 5 minutos, transferiu-se 4,5 µl de "labelling reaction" para cada tubo mix base pré- aquecido, deixando-se por 5 minutos a 37 °C. Foi adicionado 1 µl de TdT "mix" (diluída 1:19) e manteve-se a 37 °C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 5 µl de "stop solution".

3.20.3 Gel de seqüenciamento

Utilizou-se o sistema Sequi-Gen® Nucleic Acid Sequencing Cell (Bio Rad) segundo as instruções do fabricante.

Gel mix: 6% solução acrilamida: bis-acrilamida 1:19, uréia 7 M, TBE 1X, azul de bromofenol. Acrescentar 1 µl/ml de TEMED e persulfato de amônio 25% e aplicar entre as placas. Pré-aquecer o gel a 45W (corrente e voltagem máximas) por 1 hora até a temperatura da placa atingir ± 50 °C antes de aplicar as amostras, pré-aquecidas a 85 °C e transferidas para gelo. A eletroforese foi realizada a 40 W. Em seguida, o gel foi mantido

em solução fixadora (10% ácido acético-10% etanol) por 30-40 minutos e seco a vácuo a 75 °C por 30-40 minutos.

3.20.4 Análise computacional dos dados das seqüências nucleotídicas

3.20.4.1 Programa DNAsis

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

3.20.4.2 Programa de alinhamento de seqüências

Para o alinhamento e comparação de seqüências foi utilizado o programa ALIGN.

3.20.4.3 Recuperação de seqüências pelo Network Entrez

O programa Network Entrez foi obtido no endereço ncbi.nlm.nih.gov. Através dos números de acesso dos genes, foi possível obter os dados completos das seqüências nucleotídicas e protéicas, bem como os respectivos resumos de publicações disponíveis no banco de dados Medline.

3.21 Análise Estatística

Todas as comparações estatísticas foram realizadas através do teste não paramétrico de soma de postos (Mann-Whitney Rank Sum). Para o teste de correlação entre B13-βgal e B13-GST foi utilizado o teste "Spearman Rank Order Correlation". Os testes foram executados utilizando o software Sigma Stat 2.0 - Jandel Scientific.

4. RESULTADOS

PARTE A - Caracterização da resposta de anticorpos à proteína recombinante B13

4.1 Obtenção e caracterização da proteína recombinante B13

4.1.1 Obtenção e purificação da proteína recombinante B13

O DNA do plasmídeo recombinante pMSgt11, que contém aproximadamente 19 repetições seriadas do antígeno B13 (gentilmente cedido pelo Dr. Arthur Gruber e obtido conforme descrito em Gruber & Zingales, 1993) foi utilizado para transformação de bactérias DH5 α . Das diversas colônias recombinantes obtidas, uma foi inoculada em meio LB/Amp para a expressão da proteína de fusão e posterior purificação da proteína B13 por cromatografia de afinidade. Na Figura 6 mostra-se o padrão em eletroforese em poliacrilamida 8% - SDS do lisado das culturas de DH5 α não transformada (canal 1) e transformada com pMSgt11-B13 (canal 2). A partir do lisado da cultura transformada, a proteína recombinante B13 foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de *p*APTG agarose. A fração não retida na coluna e a proteína B13 purificada (140 kDa) são mostradas nos canais 3 e 4, respectivamente. O padrão eletroforético da proteína B13, anteriormente purificada no laboratório, é mostrado no canal 5. Na proteína B13 purificada por nós observam-se algumas bandas de mais baixo peso molecular (canal 4).

Dados de "Western blot" obtidos anteriormente mostram que estas bandas são produtos de degradação da B13 (Gruber, tese de doutoramento, 1994). Partindo-se de 800 ml de cultura foram obtidos aproximadamente 50 mg de proteína B13.

4.1.2 ELISA direto com a proteína recombinante B13

Utilizando a proteína B13, produzida como descrito no item 4.1.1, realizamos um teste piloto em ELISA direto nas condições anteriormente padronizadas (Cunha-Neto *et al.*, 1995), e como descrito no item 3.14.1 de Material e Métodos, com soros de indivíduos Chagásicos e Normais. Observamos que os soros de indivíduos Normais apresentavam alta reatividade à proteína B13, média de D.O. = 0,65. É possível que contaminantes tipo

lipopolissacarídeos ou outros glicoconjugados bacterianos, presentes na preparação da proteína B13, fossem os responsáveis por esta reatividade inespecífica (Mattern *et al.*, 1994). Assim, procedemos a uma etapa adicional de purificação de B13 (item 3.12.6).

Figura 6 - Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% - SDS corado com azul de Coomassie. (1) lisado de DH5α; (2) DH5α-pMSgt11-B13; (3) fração não retida em *pAPTG* agarose; (4) fração retida em *pAPTG* agarose: B13 purificada; (5) proteína B13 padrão.

4.1.3 Cromatografia de afinidade em coluna de Polimixina B - agarose

No intuito de eliminar lipopolissacarídeos bacterianos, a preparação de B13 foi submetida à cromatografia em coluna de Polimixina B - Agarose (poli B), tendo em vista que este composto se liga à porção lipídica de lipopolissacarídeos (Morrison & Jacobs, 1976).

A preparação de B13 foi analisada antes e após cromatografia em polimixina B por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguida por coloração com prata em um sistema que revela preferencialmente lipopolissacarídeos (Tsai & Frasch, 1982). Os resultados são mostrados na Figura 7.

Nesta figura observa-se que a proteína recombinante B13 padrão (canal 7) não apresenta contaminação com lipopolissacarídeos, enquanto B13 purificada apenas por *pAPTG* agarose apresenta muitas bandas de baixo peso molecular além daquela correspondente à

proteína recombinante B13 (canal 1). Após cromatografia em coluna de poli B muitas dessas bandas são removidas (canal 2). No canal 4, mostra-se o padrão de uma preparação de LPS de *E. coli* (Sigma).

Figura 7 - Análise em gel de poliacrilamida 14%, 4M de uréia - SDS da proteína recombinante B13 com coloração que revela lipopolissacarídeos - (1) B13 antes da coluna de poli B; (2) B13 após coluna de poli B; (3) marcador de PM; (4) lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* comercial; (5) β -galactosidase; (6) marcador de PM; (7) B13 padrão.

4.1.4 Padronização do teste de ELISA com B13

Utilizando a proteína B13 após cromatografia em polimixina B, procedemos à padronização da quantidade de B13 a ser ligada à placa de ELISA, utilizando 4 soros de indivíduos normais e 4 soros de chagásicos, na diluição 1/50. Os dados obtidos são mostrados na Figura 8. A concentração de 30 ng/poço foi escolhida por ser a menor concentração onde a reatividade dos soros dos indivíduos chagásicos apresentava um valor adequado de absorbância a 490 nm (Média = 1,21), próximo ao valor obtido anteriormente por Gruber & Zingales (1993).

(A)

(B)

Figura 8 - Titulação por ELISA direto da massa da proteína recombinante B13 (após polimixina B) ligada ao poço com soros (diluição 1:50) de indivíduos (A) Normais - SN A a SN D e (B) Chagásicos - SC A a SC D.

4.1.5 Reatividade da proteína recombinante B13 em ELISA direto com soros Chagásicos e Normais

Visando confirmar os dados obtidos, analisamos em paralelo a reatividade de 16 soros de pacientes Chagásicos (SC) e 16 soros de indivíduos Normais (SN) em ELISA direto com a proteína recombinante B13 padrão e B13 antes da purificação e após purificação em polimixina B.

Os dados são apresentados na Figura 9 e Tabela 4, onde confirmamos que o tratamento da preparação da proteína B13 com polimixina B reduz a reatividade de soros Normais.

(A)

(B)

Figura 9 - Comparação entre a reatividade em ELISA direto de 16 soros Normais (A) e 16 soros Chagásicos (B), diluição 1/50 com 3 diferentes preparações da proteína recombinante B13. B13 padrão; B13 antes e após purificação em coluna de polimixina B (30 ng/poço).

Para os soros normais a reatividade a B13 apresenta média de absorbância $\pm$ desvio-padrão de $0,654 \pm 0,227$ antes de poli B e $0,360 \pm 0,113$ após poli B. Para os soros SC a média de reatividade $\pm$ desvio-padrão foi de $2,48 \pm 0,289$ antes da eliminação de LPS e de $2,26 \pm 0,217$ após eliminação de LPS por poli B (Tabela 4). A relação da média de D.O. SC/SN antes de poli B é de 3,8 e, após poli B é de 6,3, indicando que a retirada de LPS além de diminuir a reatividade inespecífica nos soros normais, ainda melhora a discriminação entre SC e SN. Essa reatividade em soros de indivíduos normais reflete a presença de anticorpos contra antígenos bacterianos.

A média de D.O. em SC foi de 1,91 para proteína recombinante B13 padrão e 2,26 para B13 pós-purificação ($R=0,97$, "Spearman Rank Order Correlation"). Para os soros normais testados com a proteína B13 padrão a média de D.O. foi de 0,207 e com a proteína B13 pós-purificação a média foi de 0,36, tendo um coeficiente de correlação entre os dois lotes testados de $R=0,88$ ("Spearman Rank Order Correlation"), demonstrando a adequação da B13 pós-polimixina B como antígeno para ELISA direto.

Tabela 4 – Média e desvio padrão das D.O.s de soros de indivíduos normais e chagásicos em ELISA com três preparações de B13.

	Soros Normais (N = 16)			Soros Chagásicos (N = 16)		
	B13 padrão	B13 ^a antes	B13 ^a após	B13 padrão	B13 ^a antes	B13 ^a após
Média	0,207	0,654	0,360	1,91	2,48	2,26
DVP	0,058	0,227	0,113	0,206	0,289	0,217

a: antes e após eliminação de LPS em coluna de polimixina B

4.2 Caracterização da resposta humoral à proteína B13

4.2.1 Anticorpos anti-B13: Perfil de subclasses de IgG e dependência de linfócitos T

Conforme apresentado na Introdução, antígenos repetitivos podem induzir a produção de anticorpos sem o auxílio de células T, uma resposta denominada T-

independente. Para verificar se esta hipótese se aplica ao antígeno B13 de *T. cruzi*, comparamos, em testes de ELISA, a reatividade à proteína B13 em soros de 76 pacientes chagásicos portadores dos alelos de HLA respondedores a B13 (Abel, 1999): DQA*0501, DRB1*0101, DRB5*0101 (denominados HLA+) e em 36 pacientes portadores de outros alelos (denominados HLA-).

Os resultados são apresentados na Figura 10, onde se mostra a mediana dos dados obtidos. As medianas de D.O. dos anticorpos anti-B13 foram muito semelhantes nos dois grupos de pacientes, sendo 0,709 para o grupo HLA+ e de 0,751 para o grupo HLA-, $p=1,00$ ("Mann-Whitney Rank Sum Test"). Estes resultados podem sugerir que, pelo menos para o grupo HLA-, a resposta à proteína B13 observada seria do tipo T-independente.

Figura 10 - ELISA direto com B13 em fase sólida com soros de 76 pacientes portadores de HLA apresentador da proteína B13 a linfócitos T (HLA+: HLA DQA*0501; DRB1*0101; DRB5*0101) e 36 não portadores (HLA-: outros HLAs). A barra horizontal mostra a mediana das D.O. $p=1,00$ ("Mann-Whitney Rank Sum Test").

Tendo em vista que uma resposta T-independente pode apresentar um perfil de subclasses de IgG diferente de uma resposta T-dependente (predominância de IgG1 e de IgG2 respectivamente, Barret & Ayoub, 1986; Nahm *et al.*, 1987), analisamos o perfil de subclasses de IgG reativas a B13 em 53 soros de pacientes chagásicos HLA+ e em 34 soros

de HLA-. Na Figura 11 observamos que a distribuição das subclasses de IgG anti-B13 nos dois grupos foi comparável, sendo $IgG1 \gg IgG3 > IgG2 > IgG4$. Estes resultados serão discutidos adiante.

Figura 11 - Perfil de subclasses de IgG em soros de pacientes chagásicos brasileiros. HLA+: pacientes portadores de HLA apresentador da proteína B13 a linfócitos T (53 soros). HLA-: pacientes não portadores (34 soros). 1: IgG1; 2: IgG2; 3: IgG3; 4: IgG4. A barra horizontal representa a mediana dos dados obtidos.

4.3 Forma clínica da Doença de Chagas e caracterização da resposta à B13

A resposta humoral à proteína B13 foi investigada em soros de pacientes chagásicos brasileiros com comprometimento cardíaco (SCC) e indivíduos assintomáticos (forma indeterminada) (SCI) para verificarmos possível correlação entre peculiaridades da resposta anti-B13 e a forma clínica da Doença de Chagas.

A reatividade à proteína B13 foi analisada em 72 soros de SCC e 40 soros de SCI, obtendo-se as medianas de D.O. de 0,756 e 0,681, respectivamente (Figura 12). A análise estatística desses resultados pelo "Mann-Whitney Rank Sum Test" mostrou uma diferença significativa com $p=0,007$.

Figura 12 - ELISA direto com B13 em fase sólida com soros de 72 pacientes chagásicos cardiopatas (SCC) e 40 pacientes chagásicos indeterminados (SCI) A barra horizontal mostra a mediana das D.O. $p=0,007$ ("Mann-Whitney Rank Sum Test").

Analisamos também a reatividade de soros de pacientes chagásicos HLA+ e HLA- (ver item 4.2.1) com as duas manifestações clínicas (Figura 13) e encontramos que a mediana para os HLA+ no grupo dos SCC (50 soros) é de 0,742 e no grupo dos SCI (26 soros) de 0,596, mostrando uma diferença significativa ($p=0,001$, "Mann-Whitney Rank Sum Test"). Já no caso dos soros com HLA- a análise dos resultados mostrou que a mediana dos

dois grupos é muito semelhante: 0,771 para os SCC (21 soros) e 0,741 para os SCI (15 soros) ($p=0,724$).

Figura 13 - ELISA direto com B13 em fase sólida com soros pacientes chagásicos. **SCC**: chagásicos cardiopatas. **SCI**: chagásicos indeterminados. **HLA+**: pacientes portadores de HLA apresentador da proteína B13 a linfócitos T (HLA DQA*0501; DRB1*0101; DRB5*0101). **HLA-**: pacientes não portadores (outros HLAs). A barra horizontal mostra a mediana das D.O. Maiores detalhes no texto.

No item 4.2.1 também foi mostrado que a subclasse IgG1 dos soros de pacientes chagásicos é a principal responsável pelo reconhecimento da proteína B13. Aqui analisamos a reatividade de subclasses de IgG em função da manifestação clínica e do HLA dos pacientes. Como podemos observar na Figura 14 a distribuição das subclasses de IgG responsável pelo reconhecimento de B13 é semelhante tanto no grupo dos SCC como do SCI. Os valores das medianas de IgG1 obtidas no estudo são mostrados na Tabela 5, e aparentam diferenças entre os SCC e SCI tanto no grupo HLA+ quanto no HLA-, no entanto essa diferença não é significativa ($p=0,376$).

Figura 14 - Perfil de subclasses de IgG reativas a B13 em soros de pacientes chagásicos brasileiros. **SCC**: chagásicos cardiopatas. **SCI**: chagásicos indeterminados. **A: HLA+**: pacientes portadores de HLA apresentador da proteína B13 a linfócitos T (HLA DQA*0501; DRB1*0101; DRB5*0101). **B: HLA-**: pacientes não portadores (outros HLAs). 1: IgG1; 2: IgG2; 3: IgG3; 4: IgG4. A barra horizontal mostra a mediana das D.O.

Tabela 5 - Valores de medianas de concentração de IgG1 (ng/ml) em soros de pacientes chagásicos cardiopatas (SCC) e indeterminados (SCI) nos grupos HLA+ e HLA-.

HLA	SCC (ng/ml)	SCI (ng/ml)
HLA+	752	620
HLA-	796	541

4.4 Mapeamento do epítipo da proteína recombinante B13

4.4.1 Caracterização dos peptídeos sintéticos

Os peptídeos utilizados nos ensaios de ELISA de competição pB13, S4/S5, S4, S5, hexa pB13 e pNR, identificados na Tabela 6, foram analisados por HPLC para a definição do grau de pureza e por espectrometria de massa para a confirmação de seus pesos moleculares.

A análise por HPLC de todos os peptídeos mostrou uma porcentagem de pureza acima de 70%, sendo que 70% é considerado como padrão mínimo para utilização em atividades biológicas (Dr. Luis Juliano, Escola Paulista de Medicina/UNIFESP, comunicação pessoal).

A análise por espectrometria de massa dos peptídeos pB13, S4/S5, S5, S4 e pNR confirmou os pesos moleculares dos mesmos, como mostrado na Tabela 6. O peptídeo hexa pB13 foi analisado por sequenciamento, mostrando a presença de todos os aminoácidos esperados.

Tabela 6 – Análise dos peptídeos sintéticos por espectrometria de massa.

Peptídeo	Seqüência	Nº. de aa	PM teórico	PM obtido
pB13	GDKPSLFGQAAAGDKPSLF-NH ₂	19	1906,2	1904
S4/S5	FGQAAAGDKPS-NH ₂	11	1046,2	1045,9
S4	FGQAAAGDK-NH ₂	09	863,9	865,76
S5	QAAAGDKPS-NH ₂	09	841,9	841,7
hexa pB13	AAAGDK-NH ₂	06	531,6	*
pNR	NKSAKQFSLHIMDSQPDGS-NH ₂	19	2090,4	2089,4

* - analisado apenas por seqüenciamento N-terminal

4.4.2 Mapeamento do epítipo de B13 por ELISA de competição

Em trabalho publicado anteriormente (Cunha-Neto *et al.*, 1995), caracterizamos o epítipo imunodominante do antígeno recombinante B13, utilizando um ensaio de ELISA onde diferentes peptídeos sintéticos, derivados da seqüência de B13, eram utilizados como competidores para a ligação de anticorpos de pacientes chagásicos à proteína recombinante B13 imobilizada na placa. Naquele trabalho, a análise de seis soros mostrou que o peptídeo S4 (FGQAAAGDK-NH₂) inibia cerca de 85% a ligação dos anticorpos, sugerindo que este peptídeo continha o epítipo imunodominante.

Com a finalidade de ampliar o estudo anterior e visando mapear o epítipo mínimo da proteína recombinante B13 que é reconhecido por soros de indivíduos com Doença de Chagas, analisamos 46 soros de pacientes chagásicos brasileiros. Destes, 23 indivíduos apresentavam a forma indeterminada (soros SCI1 a SCI23, ver Tabela 7) e 23 indivíduos apresentavam comprometimento cardíaco (soros SCC24 a SCC46, ver Tabela 7). Os dados em ELISA de competição com peptídeos sintéticos derivados da seqüência da proteína recombinante B13 são apresentados na Tabela 7 e Figura 15A.

A análise dos dados obtidos para 46 soros de pacientes chagásicos (Tabela 7) fornece uma mediana de inibição de: 89% para pB13; 91% para S4/S5; 85% para S4; 63% para S5 e 21% para hexa pB13. A comparação entre os resultados obtidos para os soros SCC e SCI será feita adiante.

Dos 46 soros testados apenas 6 apresentaram porcentagem de inibição abaixo de 60% com pB13, sendo 4 indivíduos com cardiopatia e 2 com a forma indeterminada (indicados com asterisco na Tabela 7). Nestes 6 soros, as medianas de inibição para pB13, S4/S5, S4, S5 e hexa pB13 são de 35%, 23%, 17%, 1% e 14%, respectivamente, mostrando que uma baixa reatividade ao epitopo contido em pB13 é acompanhada por baixa inibição promovida pelos outros peptídeos testados. Considerando ainda que entre os soros que apresentam porcentagem de inibição maior que 60% para pB13 (N=40), 87% também apresentam porcentagem de inibição maior que 60% com os peptídeos S4/S5 e 90% com o peptídeo S4 (Tabela 6), passamos a analisar mais detalhadamente estes soros (ver Figura 15B).

A alta porcentagem de inibição (acima de 60%) de pB13 em 87% (40/46) dos soros analisados confirma a imunodominância do epitopo contido no pB13.

A análise dos dados para o peptídeo S4 indica que a maior parte dos soros apresenta inibição superior a 80%. Alguns soros (10/40) apresentam inibições inferiores a este valor o que faz com que a mediana de inibição para S4 seja 86%. Para o peptídeo S5 o comportamento é mais heterogêneo (Figura 15B) havendo uma mediana de inibição de 68%.

Quando se utilizou o peptídeo S4/S5 que contém a sequência integrada de S4 e S5 observa-se que a mediana de inibição é de 91% valor igual àquele observado para o peptídeo pB13 (Figura 15B, Tabela 7).

O hexapeptídeo de pB13 (AAAGDK-NH₂), apesar de conter os 6 aminoácidos representativos do centro do epitopo imunodominante de pB13, não mostra uma atividade inibitória significativa para a maior parte dos soros (mediana de 22%).

A análise mais detalhada da Tabela 7 (considerando apenas os soros com % de inibição para pB13 > 60%), mostra que a grande maioria (13 a 15) dos 18 soros que apresentam porcentagem de inibição abaixo da mediana para pB13 (< 91%) também apresentam porcentagem de inibição abaixo das respectivas medianas para os peptídeos S4/S5 (< 91%) e S4 (< 86%), mostrando que um mesmo soro apresenta comportamento semelhante para os diferentes peptídeos testados.

Tabela 7 - Porcentagem de inibição da ligação de anticorpos de pacientes chagásicos à proteína recombinante B13 - Efeito de peptídeos sintéticos.

Soros (a)	Diluição	D.O.	% de inibição				
			pB13	S4/S5	S4	S5	Hexa
SCI2	1/4000	0,556	97	96	88	68	24
SCI18	1/3000	0,487	95	97	95	90	13
SCI20	1/2500	0,528	92	94	87	55	20
SCI23	1/360	0,580	92	96	94	81	4
SCI3	1/600	0,713	92	93	93	71	35
SCI13	1/2000	0,486	91	93	93	90	22
SCI16	1/800	0,364	91	88	87	3	57
SCI22	1/3000	0,406	91	94	85	17	7
SCI6	1/800	0,405	91	90	88	70	42
SCI10	1/600	0,771	90	91	81	62	26
SCI11	1/1000	0,447	88	91	85	54	19
SCI7	1/1000	0,570	88	89	84	40	35
SCI9	1/500	0,491	88	91	90	82	24
SCI8	1/1500	0,589	87	86	80	49	27
SCI19	1/1000	0,497	86	86	84	76	22
SCI4	1/500	0,393	82	80	78	65	38
SCI17	1/1500	0,430	77	33	4	0	11
SCI21	1/4000	0,506	67	49	47	31	18
SCI14	1/200	0,520	60	29	21	0	13
SCI1*	1/800	0,399	59	40	42	2	23
SCI5*	1/600	0,608	35	0	0	0	0
SCI12*	1/500	0,832	34	41	14	19	19
SCI15*	1/500	0,381	30	6	1	0	9

continuação

Soros (a)	Diluição	D.O.	% de inibição				
			pB13	S4/S5	S4	S5	Hexa
SCC26	1/4000	0,398	100	100	97	97	12
SCC36	1/2000	0,357	98	99	89	64	0
SCC28	1/2000	0,657	97	97	90	88	27
SCC29	1/2500	0,685	96	98	85	87	23
SCC33	1/1500	0,695	95	93	91	73	36
SCC34	1/2000	0,558	94	94	88	59	21
SCC25	1/12000	0,465	93	95	88	75	20
SCC39	1/500	0,833	93	95	94	55	53
SCC42	1/2000	0,563	93	94	70	72	15
SCC46	1/1000	0,767	93	96	88	47	27
SCC32	1/1500	0,810	92	92	91	88	30
SCC38	1/600	0,623	92	91	91	75	0
SCC40	1/1400	0,477	92	92	86	76	21
SCC31	1/1200	0,759	87	84	82	53	20
SCC24	1/2000	0,413	86	87	85	83	0
SCC35	1/300	0,568	83	85	86	70	7
SCC43	1/800	0,631	81	81	78	61	23
SCC45	1/400	0,536	78	74	63	68	6
SCC44	1/200	0,334	71	68	74	69	30
SCC41	1/500	0,492	63	56	65	42	33
SCC27	1/1500	0,519	61	58	54	37	14
SCC37*	1/1000	0,601	53	54	43	43	20
SCC30*	1/1500	0,677	28	0	19	0	1
Medianas ^b			89	91	85	63	21
Medianas ^c			91	91	86	68	21

- (a) - Soros SCI1 a SCI23: soros de pacientes chagásicos com a forma indeterminada;
 - Soros SCC24 a SCC46: soros de pacientes chagásicos com comprometimento cardíaco. Resultados apresentados em ordem decrescente de inibição com pB13 dentro de cada grupo de soros.
- * - Soros com % de inibição para pB13 abaixo de 60%.
- b - Mediana dos 46 soros testados.
- c - Mediana dos soros com % de inibição para pB13 maior ou igual a 60%.

A

B

Figura 15 - Distribuição da porcentagem de inibição em ELISA com a proteína recombinante B13 para os peptídeos sintéticos pB13, S4/S5, S4, S5 e hexa. Análise em soros de pacientes chagásicos do Brasil. As barras representam as respectivas medianas.

A) Análise de 46 soros

B) Análise com 40 soros que apresentam % de inibição com pB13 maior ou igual a 60%

Analisamos o efeito inibitório dos peptídeos no grupo de pacientes SCC e SCI. Considerando apenas os soros com porcentagem de inibição para pB13 maior que 60%, observamos uma mediana de porcentagem de inibição para os peptídeos pB13, S4/S5, S4, S5 e hexa de 90%, 91%, 85%, 62%, 22% para o grupo de SCC e de 92%, 92%, 86%, 70% e 21%, respectivamente para o grupo de SCI. A análise estatística dos resultados mostrou não haver diferença significativa na porcentagem de inibição promovida pelo mesmo peptídeo nos dois grupos de pacientes ("Mann-Whitney Rank Sum Test").

Os dados da Figura 15B mostram que a atividade inibitória do peptídeo S5 apresenta comportamento heterogêneo (maior dispersão dos dados) nos soros testados, quando comparada com a atividade de pB13, S4/S5 e S4. Soros com porcentagem de inibição alta para pB13, S4/S5 e S4 têm porcentagem de inibição para o peptídeo S5 variável entre 0 e 97%, sendo que a maior parte deles apresenta % de inibição acima da mediana.

A observação referente ao peptídeo S5 é discordante dos resultados publicados anteriormente (Cunha-Neto *et al.*, 1995). Visando elucidar esta questão, analisamos em paralelo 4 soros de pacientes chagásicos com dois lotes do peptídeo S5 (lote 1 utilizado por Cunha-Neto *et al.*, 1995, e lote 2 utilizado no presente estudo). Na Tabela 8 são apresentados os resultados que confirmam que o lote 1 de S5 não apresenta atividade inibitória.

Uma análise do peptídeo S5 lote 1 por RNM e por sequenciamento N-terminal mostrou que este peptídeo apresentava deleção do aminoácido ácido aspártico - D - que faz parte do epitopo imunodominante de B13 (S5 lote 1 = QAAAG_KPS). Muito provavelmente a ausência de inibição promovida pelo peptídeo S5 (lote 1) deve ser atribuída a esse fato.

Tabela 8 - Comparação da atividade inibitória de dois lotes do peptídeo S5 em ELISA de competição frente à proteína recombinante B13.

Soros	% de inibição	
	Lote 1*	Lote 2**
Soro 1 (SCI)	23	40
Soro 2 (SCI)	22	82
Soro 3 (SCC)	0	68
Soro 4 (SCC)	9	47

*Lote 1 - QAAAG_KPS-NH₂

**Lote 2 - QAAAGDKPS-NH₂

4.5 Análise estrutural por DC e RNM

Os dados obtidos no item anterior, a respeito do mapeamento fino do epitopo imunodominante de B13, mostraram haver uma aparente hierarquia na atividade antigênica inibitória dos peptídeos (pB13>S4>S5). Conforme apresentado na Introdução, a atividade antigênica poderia estar relacionada com uma distinta capacidade dos peptídeos em assumirem uma estrutura secundária ordenada (Craig *et al.*, 1998) na região AAAGDK.

Com base nesses dados, um estudo em colaboração referente às propriedades estruturais dos peptídeos pB13, S4 e S5 (lote 2) foi realizado por DC e RNM pelo grupo do Prof. Alberto Spisni, da Universidade de Parma (Itália). Neste trabalho, focalizou-se a atenção no potencial desses peptídeos em adquirir alguma estrutura secundária em hélice: propriedade conhecida como helicidade. Estes resultados foram publicados anteriormente (Duranti *et al.*, 1999).

As análises de DC (Figura 16) foram realizadas em PBS e em uma mistura de 30% PBS/ 70% trifluoroetanol (TFE), uma vez que é conhecido que o TFE é um co-solvente capaz de estabilizar hélices em regiões polipeptídicas que já tenham intrinsecamente propensão para este tipo de estrutura secundária (Lehrman *et al.*, 1990; Dyson *et al.*, 1992ab).

Na Figura 16 (A, B e C), a linha descontínua mostra o perfil de DC para, respectivamente, os peptídeos pB13, S4 e S5, em 3 mM de PBS pH 6,0 e temperatura de 25°C e a linha contínua mostra o espectro dos mesmos em 30% PBS/70% TFE a 25°C. A presença de uma forte banda negativa na região de 220 nm pode ser indicativa de estruturas em hélice, enquanto a presença de forte absorção negativa por volta de 195 nm está associada com organização estendida, característica de estruturas "random coil". Analisando os espectros segundo esses parâmetros, os dados da Figura 16A indicam que o peptídeo pB13 na presença de PBS existe preferencialmente em uma conformação estendida, enquanto que na presença de TFE, pB13 se encontra parcialmente na forma de hélice (Figura 16A). Para os outros dois peptídeos (Figuras 16B e 16C) em PBS o perfil de DC novamente é indicativo de conformação estendida. No entanto, na presença de TFE a mudança no perfil de DC sugere uma reorganização estrutural parcial, indicativa de uma alta flexibilidade molecular.

De maneira a melhor definir o tamanho e a localização da possível estrutura em hélice, um estudo de 2D ^1H MNR (espectrometria bidimensional de ressonância magnética nuclear de próton) em 30% PBS/ 70% TFE foi realizado. Os dados de deslocamento químico ($\Delta\delta$) obtido no ^1H RMN dos prótons α de cada resíduo de aminoácido componentes dos três peptídeos são mostrados na Figura 17 (a,b,c).

Pode-se observar que para pB13 e S4, oito resíduos de aminoácidos estão envolvidos na extensão da estrutura em hélice (apresentando um $\Delta\delta$ negativo), englobando o hexapeptídeo **AAAGDK**, no centro do epitopo imunodominante. No caso do peptídeo S5, há um decréscimo no número de resíduos sequenciais com $\Delta\delta$ negativo, indicando uma menor capacidade de assumir configuração em hélice.

Figura 16 - Espectro de DC a 0.1 mM de peptídeos a 25 °C em 3 mM PBS, pH 6, (linha descontínua) e em 30% PBS/70% TFE, v/v, (linha contínua). A) pB13; B) S4; C) S5.

Figura 17 - Diferenças entre os desvios químicos dos prótons α ($\delta_{\alpha\text{peptídeo}} - \delta_{\alpha rc}$) observados e "random coil" (Wishart *et al.*, 1992) para a) pB13, b) S4 e c) S5 em 30% PBS/70% TFE- d_3 , (v/v) a 25 °C. Os dados são plotados resíduo por resíduo contra a sequência inteira do peptídeo em questão.

4.6 Reatividade de soros de pacientes chagásicos de países da América Central e do Sul à proteína recombinante B13

Tendo analisado o comportamento inibitório de peptídeos sintéticos contendo o epitopo imunodominante de B13 e a subclasse responsável pela resposta anti-B13 em soros de pacientes chagásicos brasileiros, passamos a realizar um estudo análogo em soros de chagásicos de vários países da América Central e do Sul, que apresentavam reatividade diferencial à proteína recombinante B13 (Umezawa *et al.*, 1999), conforme comentado na Introdução (ver Fig. 3).

Tendo em vista que Umezawa *et al.* (1999) utilizaram nos ensaios de ELISA a proteína recombinante B13 em fusão com a GST (B13-GST), foi necessário ensaiar soros de indivíduos de países da América Central e do Sul com nossa proteína recombinante em fusão com a β -galactosidase para verificar se o mesmo padrão de reatividade e dispersão de resposta relatado anteriormente se mantinha. Para este fim, utilizamos uma amostra representativa dos soros de indivíduos chagásicos usados no estudo anterior (Umezawa *et al.*, 1999), gentilmente cedidos pela Dra. E. Umezawa do IMT/FMUSP. Os soros foram utilizados na mesma diluição descrita naquele trabalho (1:50).

Os valores individuais de D.O. dos soros (24 soros de cada país, com exceção de Brasil e El Salvador onde foram testados 48 e 49 soros, respectivamente) em ELISA com B13- β gal são mostrados na Figura 18. O comportamento dos soros quanto à reatividade relativa à proteína recombinante B13 e dispersão nos valores de D.O. segue o mesmo padrão descrito anteriormente por Umezawa *et al.* (1999) e mostrado na Figura 3 da Introdução, ou seja, soros da Argentina, Bolívia, Colômbia e Venezuela apresentam alta reatividade à proteína recombinante B13, ao passo que Brasil, El Salvador e Honduras apresentam reatividade mais baixa.

Na Tabela 9 comparam-se os valores das médias e desvio-padrão obtidos no estudo de Umezawa *et al.* (1999) e no presente estudo. A análise dos dados indica que empregando-se B13-GST, obtém-se médias de valores de D.O. maiores do que aquelas obtidas com B13- β gal. Isto pode ser explicado por diferenças no formato do teste de ELISA: a) quantidades diferentes de proteína recombinante por poço (para a B13- β gal, foram utilizados 30 ng/poço enquanto que para B13-GST, 25 ng/poço; além disto, deve ser lembrado que a β -galactosidase tem peso molecular de 116 kDa, ao passo que a Glutathione S-

transferase (GST) apresenta cerca de 28 kDa; desta forma, foi utilizada uma quantidade maior de proteína B13 no sistema B13-GST); b) tempo de incubação com o conjugado: para Umezawa *et al.* (1999), 1h a 37 °C; no presente estudo, 30 min a 37 °C.

Aplicando-se o teste "Spearman Rank Order Correlation" para relacionar as médias de D.O. obtidas no sistema B13-GST e B13- β gal obtivemos um índice de correlação de 0,89 ($p > 0,001$), indicando uma boa equivalência entre os dois sistemas.

Os dados obtidos indicam que os soros provenientes da Argentina, Bolívia, Colômbia e Venezuela apresentam maior reatividade a B13 com média de D.O. entre 0,71 e 0,83, sendo que Argentina e Venezuela apresentam uma baixa dispersão dos valores de D.O. Já para os soros do Brasil, El Salvador e Honduras observamos uma reatividade mais baixa com médias de D.O. de 0,58, 0,55 e 0,46, respectivamente, e uma alta dispersão entre os valores obtidos.

Visando analisar as diferenças observadas nos valores de D.O. para os soros dos países frente a B13- β gal aplicamos o teste "Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks". Verificamos que não há diferença significativa entre os valores de D.O. obtidos para AR, BO, CO e VE ($p = 0,164$). Também não foi encontrada diferença significativa quando se compara BR, EL e HO ($p = 0,154$). Usando o teste "Mann-Whitney Rank Sum Test" para compararmos os dois grupos acima identificados verificamos que há uma diferença significativa entre eles com um $p = < 0,001$. Dessa maneira, podemos classificar os soros dos países analisados em dois grupos: um de maior reatividade (AR, BO, CO e VE) e outro com menor reatividade (BR, EL e HO) à proteína recombinante B13.

Figura 18 - Distribuição da D.O. de amostras de soros de pacientes chagásicos de diferentes países em ELISA direto com a proteína recombinante B13. A barra horizontal indica a média das D.O. obtidas.

Tabela 9 - Comparação das médias e desvios-padrão obtidos da análise de soros de pacientes chagásicos de diferentes países em ELISA direto com dois tipos de proteína recombinante B13.

País	B13-GST ^b		B13-βgal ^c	
	N ^a	MD D.O.	N ^a	MD D.O.
VE	30	1,91 ± 0,38	24	0,83 ± 0,14
AR	32	1,79 ± 0,61	24	0,81 ± 0,25
BO	32	1,77 ± 0,60	24	0,79 ± 0,28
CO	26	1,82 ± 0,41	24	0,71 ± 0,26
BR	38	1,51 ± 0,55	48	0,58 ± 0,24
EL	49	0,93 ± 0,53	49	0,55 ± 0,24
HO	32	0,91 ± 0,40	24	0,46 ± 0,26

a - Número de soros

b - B13 em fusão com GST (Umezawa *et al.*, 1999) - (25 ng/poço)

c - B13 em fusão com β-galactosidase (item 4.1) (30 ng/poço)

4.7 Isotipagem de IgG nos soros chagásicos da América Central e do Sul

Com a finalidade de verificar se a diferença quantitativa com relação à resposta humoral à proteína B13, descrita no item 4.6, poderia corresponder a uma diferença qualitativa de imunoglobulinas, analisamos a subclasse de IgG responsável pelo reconhecimento da proteína B13 em 224 soros da América Central e do Sul por ELISA direto. Os resultados são apresentados na Figura 19. Como verificado nos soros do Brasil, em todos os soros dos países estudados, IgG1 é a principal subclasse de IgG responsável pelo reconhecimento de B13, mantendo o mesmo padrão encontrado (IgG1>>IgG3>IgG2>IgG4).

Um dado que chama a atenção na Figura 19 é que a concentração de IgG1 reativa a B13 dos soros provenientes de El Salvador é bastante elevada e maior que a concentração de IgG1 dos soros da Colômbia, Venezuela e Brasil. Esta observação não concorda com os valores de reatividade total dos soros apresentados na Tabela 9. Além disto, observa-se que soros de El Salvador apresentam concentrações de IgG 2, 3 e 4 reativas a B13 ligeiramente superiores àsquelas encontradas nos demais soros da América Central e do Sul.

Figura 19 - Perfil de subclasses de IgG responsáveis pelo reconhecimento da proteína B13 em soros de pacientes chagásicos de diferentes países. AR: Argentina; BO: Bolívia; CO: Colômbia; HO: Honduras e VE: Venezuela. Os dados do Brasil (BR) são reapresentados aqui a título de comparação. As barras horizontais representam as respectivas medianas.

4.8 Mapeamento do epítipo de B13 por ELISA de competição em soros de pacientes chagásicos da América Central e do Sul

Tendo em vista que as diferenças na reatividade à proteína recombinante B13 em soros de diversos países da América Central e do Sul não estavam relacionadas a diferenças nas subclasses de IgG, decidimos investigar a natureza do epítipo de B13 reconhecido por estes soros. Neste estudo, procedemos à análise do efeito inibitório com

peptídeos sintéticos derivados de B13 (ver Tabela 2), analogamente ao que havíamos executado para soros de pacientes chagásicos brasileiros (ver item 4.4.2 e Duranti *et al.*, 1999).

Em estudo inicial e como forma de avaliar se o epitopo contido na sequência do pB13 também é imunodominante nos diferentes países da América Central e do Sul, analisamos nestes países qual a porcentagem de soros que apresenta inibição com pB13 maior que 60%. Os dados obtidos (não mostrados) foram AR = 72%; BO = 73%; BR = 86%; CO = 100%; EL = 92%; HO = 95% e VE = 88%. Esses resultados confirmam a imunodominância do epitopo contido no pB13 nos diferentes países analisados.

Estudamos então o efeito inibitório dos peptídeos pB13, S4 e S5 por ELISA de competição, nos soros com porcentagem de inibição para pB13 maior que 60%, e os dados são mostrados nas Figuras 20, 21 e 22 (a barra horizontal indica a mediana das D.O. obtidas). Para o peptídeo pB13 (Figura 20) o comportamento dos soros dos diferentes países é semelhante com valores de medianas de inibição entre 86 e 95%. Este comportamento também é observado para o peptídeo S4 (Figura 21) com medianas de inibição entre 83 e 88%. Tanto para pB13 quanto para S4 dentro de cada país a dispersão dos valores de inibição é baixa. Já para o peptídeo S5 (Figura 22) há dispersão elevada no grau de inibição em soros de todos os países analisados (exceto Honduras), com mediana de inibição variando entre 62 e 79%.

Figura 20 - Porcentagem de inibição de ELISA com B13 para o peptídeo pB13 com soros de pacientes chagásicos de diferentes países. A barra horizontal indica a mediana das D.O. obtidas.

Figura 21 - Porcentagem de inibição de ELISA com B13 para o peptídeo S4 com soros de pacientes chagásicos de diferentes países. A barra horizontal indica a mediana das D.O. obtidas.

Figura 22 - Porcentagem de inibição de ELISA com B13 para o peptídeo S5 com soros de pacientes chagásicos de diferentes países. A barra horizontal indica a mediana das D.O. obtidas.

Tomados em conjunto, os dados sugerem que apesar de os soros dos diferentes países apresentarem diferenças quantitativas de reatividade à proteína recombinante B13, o epítipo reconhecido por esses soros é o mesmo.

No item 4.4 relatamos o mapeamento do epítipo reconhecido por anticorpos anti-B13 de soros de pacientes chagásicos do Brasil com peptídeos sintéticos em ensaio de competição, obtendo medianas de porcentagem de inibição de 87% para pB13, 80% para S4 e 61% para S5. Os dados de inibição com peptídeos sintéticos de soros brasileiros cedidos pela Dra. Umezawa mostraram medianas de porcentagem de inibição muito semelhantes às demonstradas no item 4.4 (91% para pB13; 86% para S4 e 68% para S5) onde se utilizou uma outra amostragem de soros.

PARTE B - ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE DE B13 EM CEPAS DE *T. cruzi*

Nos estudos apresentados a seguir caracterizamos o polimorfismo do gene B13 em diferentes cepas de *T. cruzi* quanto à massa molecular do antígeno por ele codificado e à sua estrutura gênica.

4.9 Heterogeneidade do antígeno B13

A proteína B13 corresponde ao domínio imunodominante de repetições de 12 aminoácidos do antígeno nativo de 140-116 KDa da cepa Y (Gruber & Zingales, 1993). Visando caracterizar este antígeno em cepas de *T. cruzi*, realizamos um ensaio de Western blot, onde lisados totais de epimastigotas de sete cepas do parasita, após transferência para membrana de nitrocelulose, foram incubados com soro de coelho contra a proteína recombinante B13 da cepa Y, obtido por Gruber & Zingales (1993). Os resultados apresentados na Figura 23 mostram que este soro reconhece um ou dois antígenos majoritários em todas as cepas analisadas (exceto na cepa Colombiana onde várias proteínas foram detectadas), indicando sua ubiquidade, homologia imunológica e heterogeneidade de massa molecular.

Tendo em vista que não há dados referentes à glicosilação do antígeno B13, os valores de massa molecular apresentados na Tabela 10 devem ser considerados aparentes. As bandas de peso molecular abaixo de 90 KDa presentes em vários lisados podem corresponder a produtos de degradação do antígeno B13, conforme descrito anteriormente (Gruber & Zingales, 1993).

Figura 23 - Western blot - Lisados de epimastigotas de diferentes cepas foram separados por SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados com soro de coelho contra a proteína recombinante B13.

Tabela 10 - Antígeno(s) reconhecido(s) por soro de coelho anti-proteína B13 da cepa Y em lisados de epimastigotas de *T. cruzi* de diversas cepas.

Cepa	Antígeno B13 (KDa)*
CL Brener	145 e 116
Colombiana	190, 170; 130, 110 e 100
Dm28c	150 e 145
Esmeraldo cl 3	138 e 125
NR cl3	160
Silvio X10 cl 1	150 e 116
Y	140 e 116

* - massa molecular aparente

4.10 Distribuição do gene B13 nos cromossomos de diversas cepas do parasita

Os cromossomos de cepas de *T. cruzi* foram separados por eletroforese de campo pulsado de acordo com Cano *et al.* (1995). Após transferência do DNA para membrana de Zeta probe, esta foi hibridizada com a sonda H5H6 que contém repetições seriadas do gene B13 (ver Figura 5). Na Figura 24 observa-se que este gene de cópia única por genoma haplóide (Gruber & Zingales, 1993) hibridiza com bandas cromossômicas de tamanho molecular de aproximadamente 1,25 Mpb nos isolados CL Brener, Y, NR cl 3, SO3 cl 5, SC43 cl 1, e em bandas de menor tamanho molecular (cerca de 0,9 Mpb) nos isolados G, YuYu, Dm28 e Dm28c.

Estes resultados confirmam a ubiquidade do gene B13 no genoma de cepas do parasita.

Figura 24 - Os cromossomos de cepas de *T. cruzi* foram separados por PFGE e hibridizados com sonda derivada do gene B13 (H5H6) que contém as repetições seriadas. Os marcadores de tamanho molecular são indicados.

4.11 Arranjo genômico do gene B13

O DNA genômico de diferentes cepas de *T. cruzi* foi digerido com *Hind* III (que cliva o gene B13 da cepa Y em diversas posições, dentre as quais na região que flanqueia as repetições seriadas, ver Figura 5 - item 3.19 de Material e Métodos). Após eletroforese e transferência, o Southern blot foi hibridizado com a sonda H5H6. Conforme pode ser visto na Figura 25, esta sonda hibridiza com uma ou duas bandas de diferente tamanho molecular.

Figura 25 - Southern blot de DNA de formas epimastigotas de diferentes cepas de *T. cruzi* digerido com *Hind*III e hibridizado com sonda H5H6 do gene B13. Marcadores de peso molecular, em quilobases, estão indicados.

Estes valores são mostrados na Tabela 11 (incluindo-se a análise da cepa CA-1 que não aparece na Figura 25) e indicam polimorfismo de restrição no gene B13. As bandas de hibridização de tamanho maior que 10 Kb, observadas em algumas cepas, podem indicar uma digestão parcial do DNA genômico ou serem originadas pela perda de sítios de *Hind* III em uma das duas cópias do gene B13. Salienta-se que *T. cruzi* é um organismo diplóide e, que portanto, apresenta dois alelos do gene B13. Estes alelos podem ter tamanho diferente (Henriksson *et al.*, 1990), como será discutido adiante.

Tabela 11 - Tamanho da banda de DNA genômico de *T. cruzi* digerido com *Hind*III que hibridiza com sonda H5H6.

CEPA	BANDA* (Kb)
CA-1	3,5
CL Brener	3,5
	3,9
Colombiana	6,2
	18,0
Dm 28	3,9
	15,7
Silvio X10 cl 1	4,4
	15,7
HN040	19,7
NR cl 3	7,8
	4,2
Esmeraldo cl 3	3,4
	3,5
Y	3,5
	4,0

* - o tamanho dos fragmentos maiores que 10 Kb é aproximado.

4.12 Análise do tamanho da região que contém as repetições seriadas

Visando analisar o tamanho da região que contém as repetições seriadas do gene B13 nas diferentes cepas, foram desenhados dois oligonucleotídeos que flanqueiam esta região (oligo 1 e oligo 2, ver Figura 4 em Material e Métodos) com base na sequência do gene TcCA-2 (homólogo a B13) descrita para um clone da cepa CA-1 (Buschiazzo *et al.*, 1992). O DNA de 23 cepas de *T. cruzi* foi submetido a amplificação por PCR com estes dois iniciadores. O produto de amplificação foi analisado após eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. Os primeiros ensaios realizados com a enzima *Taq* DNA polimerase mostraram amplificação em poucas cepas (dados não apresentados). Tendo em vista que a região a ser amplificada é bastante grande (cerca de 2 a 3 Kb), realizamos um estudo sistemático em que variamos a natureza da DNA polimerase, a concentração de íons Mg, tempos e temperaturas de amplificação. Finalmente chegamos a uma condição de PCR que tem as seguintes características: 0,5 mM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,4 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfato (dNTP), 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3 a 25 °C); 50 mM KCl; 3 mM de MgCl₂; 100 µg/ml BSA e 1 U de Vent_R® polimerase em um volume final de 50 µl. Utilizando estes parâmetros, obtivemos amplificação em 11 das 23 cepas, com produtos cujo tamanho molecular variou entre 2,1 e 3,5 Kb (Tabela 12).

Para a cepa CA-1 foi obtido um fragmento de cerca 2,6 Kb, condizente com a presença de 75 repetições seriadas de 36 pb no gene TcCA-2 desta cepa (Buschiazzo *et al.*, 1992). Esta observação corrobora a eficiência de nosso ensaio de PCR para amplificação da região de repetições seriadas. A não amplificação em algumas cepas poderia ser explicada pela qualidade do DNA utilizado como molde (lembra-se que apenas para as cepas assinaladas com asterisco na Tabela 3 o DNA foi purificado por métodos convencionais) ou, pelo não anelamento dos oligos 1 e/ou 2 nas regiões que flanqueiam as repetições.

Tabela 12 - Produto do PCR em cepas de *T. cruzi* com os oligos 1 e 2 derivados da sequência do gene TcCA-2 de um clone da cepa CA-1.

CEPA	HOSPEDEIRO	PAÍS	PRODUTO (pb)
CA-1	Humano	Argentina	2600
CER 31	<i>Triatoma sordida</i>	Bolívia	neg
CH8T3	Cachorro	Bolívia	2900
CL 14	<i>Triatoma infestans</i>	Brasil	neg
Colombiana	Humano	Colômbia	3500
COT 33	<i>Triatoma sordida</i>	Bolívia	2800
COT 38	<i>Triatoma sordida</i>	Bolívia	neg
CL Brener	<i>Triatoma infestans</i>	Brasil	2900
Dm28c	<i>Didelphis marsupialis</i>	Venezuela	2600/2900
Esmeraldo	Humano	Brasil	2100/3200
G	<i>Didelphis marsupialis</i>	Brasil	3000
GUA 19	<i>Triatoma sordida</i>	Bolívia	neg
HN040	Humano	Honduras	neg
Maracay	Humano	Venezuela	neg
M6241 cl 6	Humano	Brasil	neg
NR cl 3	Humano	Chile	neg
SC 43 cl 1	<i>Triatoma infestans</i>	Bolívia	neg
SIC 03	<i>Triatoma infestans</i>	Bolívia	3400
Silvio X10 cl 1	Humano	Brasil	neg
TP 10	<i>Triatoma infestans</i>	Bolívia	2800
TP 27	<i>Triatoma infestans</i>	Bolívia	neg
Y	Humano	Brasil	neg
YuYu	<i>Triatoma infestans</i>	Brasil	2400

* neg.: ausência de amplificação

4.13 Seqüenciamento da região a 3' das repetições seriadas do gene B13 da cepa Y e análise comparativa com seqüências de genes homólogos

Dentre as cepas nas quais não houve amplificação de produto com os oligos 1 e 2 estava a cepa Y (ver Tabela 12), para a qual estava disponível apenas a seqüência localizada a 5' das repetições seriadas (Gruber, 1994). O alinhamento do oligo 1 com a região homóloga do gene B13 da cepa Y mostrava variação em 4 bases (indicadas em **negrito e sublinhado**):

Oligo 1 (cepa CA1): 5' CAAATTAAACCTCATATCACAA 3'

B13 (cepa Y) : 5' CAAAATAAGCCTCATATTGCAA 3'

Visando verificar a seqüência da região a 3' das repetições seriadas no gene B13, onde anelaria o oligo 2, decidimos seqüenciá-la a partir do fragmento H5H6 (ver Figura 5). O procedimento adotado está descrito no item 3.20 de Material e Métodos. O inserto H5H6 (cerca de 3 Kb) do gene B13 da cepa Y estava clonado no vetor pUC 18. Este inserto foi liberado por digestão com *Hind*III, purificado e ligado ao vetor pBluescript linearizado com *Hind*III. Após transformação de DH5 α , o DNA do plasmídeo foi submetido ao sequenciamento com os iniciadores "universal" e "reverse" de M13. Com esta abordagem foi possível ler cerca de 400 pb de ambas extremidades 5' e 3'. A leitura da extremidade 5' permitiu atingir as unidades repetitivas e confirmar a seqüência obtida anteriormente por Arthur Gruber (GenBank - Accession number U15616). O sequenciamento de cerca de 400 pb da região 3' do inserto não foi suficiente para atingir as unidades repetitivas. Desta forma, foi sintetizado um oligonucleotídeo (oligo 4, ver item 3.10 de Material e Métodos) para o prosseguimento da leitura. A seqüência parcial do inserto H5H6 do gene B13 da cepa Y é mostrada na Figura 26 onde são indicadas as posições dos sítios de *Hind*III e a posição do oligo 4. Ressalta-se que foram seqüenciadas apenas algumas unidades de repetição.

H5 (sítio de *Hind*III)

AAG CTTTAATCCT TGTACGGACA AATTGAAGAT AAACCAACAA

AATAAGCCTC ATATTGCAAA TAATAACAA AAAACAACAC TCGAAAAAAC TCAAACAGAA

oligo 5

CAAA**AAACAG CGCCATTGG** **AC**AGGCCGCA GCAGGTGACA AA*CCATCACC ATTTGGACAG

GCCGCAGCAG GTGACAAACC ACCACCATTG GGACAGGCCG CAGCAGGTGA CAAACCAGCA

CCATTTGGAC AGGCCGCAGC AGGTGACAAA CTATCAGTAT TTGGACAGGC CGCAGCAGGT

GACAAACCAG CACCATTGG ACAG

repetições seriadas

GCCGCAGC AGGTGACAAA CCATCACCAT

TTGGACAGGC CGCAGCAGGT GACAAACCAT CACCATTGG ACAGGCCGCA GCAGGTGGCA

AACCATCACC ATTTGGACAG GCCGCAGCAG GTGTCAAACC ATCACCATTG GGACAGGCCG

CAGCAGGTGA CAAACCATCT CCATTTGGAC AGGCCGCAGC AGGTGGCAAA CCATCACCAT

TTGGGCAGGC CGCAGCAGGT GACAAACCAT CACCATTGG ACAG*GGAACA **GCTTTGATG**

oligo 6

CCTCTCGAAG CACTGTGTTT GCGAATGCGC CTGGTGTGTC CCAGGTGTCTG TTTGGAAAGC

CATCGACGGC TTTTGCAACC ACATCCTTTG CTGCTGGTGG TGGGTTTGGA GCACCAAGTG

CTTTTGTTTC TATGTTACAG AATGTTTCATG CTACATTGCC TGCTGGAAGC GCGTTGCCTC

ATATTGGAAG TGCCTTTGGT TCTCCTGGAA TGCATTCTGG CGGTGCGTTT GGTGGAACAG

GTGTAAGTGG TCCGGCAATT GGTGGTGGCA AACCATCTGT ATTGGAGGGA AGTGGGTTTG

GTCAGGCTTT TGGTGCTTTT GGTAATCATG CATCAACTGT TTAGGAGGT TTTGGTCGGA

ATGAAGGTGA CGGCACCTTT GGTGCTGTGG GAGCCCATGG GACGGGTTC GCCACCCAT

TTTCAAAGCC **AGTACCACAT TTCAATCTTC** TTCTTTTCC AGTATTGCGG GAAACTACAA

oligo 4

GGCCCCCTCCG CAATTTAAGA GTGTTTTTGG TCCTCATTGA TTTGTGTTTT TTTTTTTTTT

TTTTTGAATC TGAATTTTTG CTTGTGAATG ATAATGAATT AATTTGAAGT TCTTTTGAGG

ATGTTTGTGC AACTTTGCTT GCTGAAAGCC ATTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTGGC

TCAAGGAATA ACATTTGGGC ATGTCGGATG ATTTAGGTGA ACTGGAATTA AGGGAAGTTG

AAGAGGGGGA TGTACCGAGT CTTTATAGATC TTCTAAGGCA CCTGACTGAT GCACCGGCTG

TGACTGCATC TGCCTGCAG GCAATTGCTG AGGCACGTCG TCAAGCCGGC ATGGTAACAA

AGGTTTTTAT TCACAGGCCA ACCAGGCGCG TCGTAGGGAC TGCATCTCTG TTTGTGGAAC

CCAAGTTTTT CCGCGGTGGA AAATCCGTGG GACACATTGA AGATGTCGTT GTTGATCCCT

H6 (sítio de *Hind*III)

CATATCGAGG CAAA**AAGCTT**

Figura 26 - Sequência parcial do inserto H5H6 do gene B13 da cepa Y, com indicação dos sítios de *Hind*III em negrito; da região das repetições seriadas (*) e a posição dos oligos selecionados (oligo 4, para o sequenciamento, e oligos 5 e 6 para amplificação).

O alinhamento da sequência nucleotídica a 3' das repetições seriadas até o sítio de *Hind*III (H6) com a sequência da região homóloga do gene *TcCA-2* (Buschiazzo *et al.*, 1992) é mostrada na Figura 27. O grau de identidade entre as duas sequências é de 94%. A posição do códon de parada é indicada nas duas sequências. Chama-se a atenção para o deslocamento do códon de parada nos dois genes em função de uma região rica em T que, aparentemente, foi parcialmente deletada no gene *TcCA-2*.

B13	1	GACAAACCATCACCATTTGGACAGGGAACAGCGTTTGGATGCCTCTCGAAGCACTGTGTTT ::: ::
TcCA-2	1862	GACAGACCATCACCATTTGGACAGGGAACAGTGTGTTGATGCGTCTCGAAGCACTGTGTTT
B13	61	GCGAATGCGCCTGGTGTTGCCAGGTGTCGTTTGGAAAGCCATCGACGGCTTTTGAACCC ::: : ::::::::::
TcCA-2	1922	GCGAATGCGCCTGGTGTTGCCAGGTGTCGTTTGGAAAGCCATCGACGACGTTTGAACCC
B13	181	ACATCCTTTGCTGCTGGTGGTGGGTTTGGAGCACCAAGTGCTTTTGGTTCTATGTTACAG ::: ::::
TcCA-2	1982	ACATCCTTTGCTGCTGGTGGTGGGTTTGGAGCACCAAGTGCTTTTGGTTCTATTTTACAG
B13	241	AATGTTTCATGCTACATTGCCTGCTGGAAGCGCGTTGCCTCATATTGGAAGTGCCTTTGGT ::::::::::::::::::::::::::::: ::::::::::::::: ::::::::::::::::::::::::::::::
TcCA-2	2042	AATGTTTCATGCTACATTGCCTGCCGGAAGCGCGTTGTCTCATATTGGAAGTGCCTTTGGT
B13	301	TCTCCTGGAATGCATTCTGGCGGTGCGTTTGGTGGAACAGGTGTAAGTGGTCCGGCAATT ::
TcCA-2	2102	TCTCCTGGAATGCATTCTGGCGGTGCGTTTGGTGGAGCAGGTGTAAGTGGTCCGGCAATT
B13	421	GGTGGTGGCAAACCATCTGTATTGGAGGGAAGTGGGTTTGGTCAGGCTTTTGGTGCTTTT ::::::::: :::: : :::: ::: ::::::::::
TcCA-2	2162	GGTGGTGGTAAACTACCTGCATTGGAGGGAAGTGGGTTTGGTCAGGCTTTTAGTGCTTTT
B13	481	GGTAATCATGCATCAACTGTTTTAGGAGGTTTTGGTCGGAATGAAGGTGACGGCACCTTT :: ::::::::::::::::::::::::::::::::::: ::::::::::: :: ::::::::::: ::::::::::
TcCA-2	2222	GGCAATCATGCATCAACTGTTTTAGGAAATTTTGGTCAGAAAGAAGGTGAGGGCACCTTT
B13	541	GGTGCTGTGGGAGCCCATGGGACGGGTTCGCCACCCCATTTTCAAAG-CCAGTACCACA ::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::
TcCA-2	2282	GGTACTGTGGGAGCCCATGGGACGGGTTCGCCACCCCGTTTCAAAGACCAGTACCACA
B13	601	TTTCAATCTTCTTCTTTTTTCCAGTATTGCGGGAAACTACAAGGCCCTCCGCAATTTAAG ::: : ::::::::::::::::::
TcCA-2	2342	TTTCAATCTTCTTCTTTTTTCCAGTATTGCGGGAAACTACAAGG-CTCTCCGCAATTTAAG
B13	661	AGTGTTTTTGGTCCTCATTGATTTGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAATCTGAATTTTT ::::::::::::::::::::::::::::: :: : ::::::::::: ::::::::::::::::::::::
TcCA-2	2401	AGTGTTTTTGGTCCTCATTGATATGCGTTTTTTTTTTT-----AATCTGAATTTTT
B13	721	GCTTGTGAATGATAATGAATTAATTTGAAGTTCTTTTGGAGATGTTTGTGCAACTTTGCT ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::: ::::: ::::::::::::::::::::::::::
TcCA-2	2451	GCTTGTGAATGATAATCAATTAATTTGAAGTTGTTTTGGGGATGTTTGTGCAACTTTGCT
B13	781	TGCTGAAAGCCATTTTTTTTTTT-----TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTCAAGGAATAACA ::::::::::::::::::::: ::::: : : : : : ::::::::::::::::::::::::::
TcCA-2	2511	TGCTGAAAGCCATTTGTTTTTTGGTTGTTGTTGTTGTTGTTTGGCTCAAGGAATAACA
B13	841	TTTGGGCATGTCGGATGATTTAGGTGAAGTGAATTAAGGGAAGTTGAAGAGGGGGATGT ::::::::::::::::::::: :: ::
TcCA-2	2571	TTTGGGCATGTCGGATGAATTGGGTGAAGTGAATTAAGGGAAGTTGAAGAGGGGGATGT
B13	901	ACCGAGTCTTTTAGATCTTCTAAGGCACCTGACTGATGCACCGGCTGTGACTGCATCTGC ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::::::::
TcCA-2	2631	ACCGAGTCTTTTAGATCTTCTCAGGCACCTGACTGATGCACCGGCTGTGACTGCATCTGC
B13	961	GCTGCAGGCAATTGCTGAGGCACGTCGTCAAGCCGGCATGGTAACAAAGGTTTTTTATTCA ::: ::::::::::
TCCA-2	2691	GCTGCAGGCAATTGCTGAGGCACGTCGTCAAGCTGGCATGGTAACAAAGGTTTTTTATTCA

A sequência do gene B13 (mostrada na Figura 27) foi traduzida em aminoácidos e alinhada com sequências proteicas de regiões homólogas do antígeno TcCA-2 e TCR39 (derivado da cepa Silvio X10) (Figura 28). Ressalta-se que para o gene TCR39 não se encontra disponível no banco de dados a sequência nucleotídica e que a sequência de aminoácidos depositada corresponde a cerca de 42 nucleotídeos antes do códon de parada referente ao gene TcCA-2. Desta forma, o alinhamento dos 185 resíduos de aminoácidos dos produtos dos três genes homólogos a B13, mostrado na Figura 28, foi feito com os dados disponíveis. A análise dos alinhamentos indica 83% de identidade entre B13 e TcCA-2 e 70% de identidade entre B13 e TCR39. O alinhamento entre TcCA-2 e TCR39 mostra 66% de identidade. Chama-se a atenção para a identidade entre o bloco de resíduos de aminoácidos de 24 a 56 (em azul) de B13 e a região homóloga de TcCA-2 (em azul) e o bloco de resíduos de 158 a 175 de B13 e a região homóloga de TCR39 (em vermelho).

B13	1	GDKPSPFGQGTAFDASRSTVFAN APGVAQVSFGKPSTAFATTSFAAGGGFGAPSA FGSIL
TcCA-2		:: :::::::::: :: ::
		GDRPSPFGQGTVFDA SRSTVFAN APGVAQVSFGKPSTTTTATTSFAAGGGFGAPSA FGSIL
		:: :::::::::::::::::::::::::: :: :: ::
TCR39		GDKPSPFGQGTVFDA SRSTVFAN-GLVLPSLVWKAIDGFCNHILCCWWWVSTKCFGSIL
B13	61	QNVHATLPAGSALPHIGSAFGSPGMHSGGAFGGTGVSGPAIGGGKPSVLEGSFGQAFGA
TcCA-2		:::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::::::: :::::::::: ::
		QNVHATLPAGSALSHIGSAFGSPGMHSGGAFGGAGVSGPAIGGGKLPALEGSFGQAFSA
		:: :::::::::: ::
TCR39		QNVHATLPAGSALSHIGSAFGSPGMHSGGAFGGAGVSGPAIGGGKLSALEGSFGQAFSA
B13	121	FGNHASTVLGGFGRNEGDGTFGAVGAHGTGSATPFSK PVPHFNLLLLFPVLR ETTRPLRNL
TcCA-2		:::::::::: :: :: :: :: :::::::::::::::::: :: :: ::
		FGNHASTVLGNFGQKEGEGTFGTVGAHGTGSATPFSKTSTTFQSSSFSSIAGNYKALRNL
		:::::::::::::::::::::::::::::::::: :: :: ::
TCR39		FGNHASTVLGNFGQKEGEGTFGTVGAHGTVP PPRFQR PVPHFNLLLLFPVLR ETTRLPQFK
B13	181	RVFL-V
TcCA-2		::: :
		RVFL-V
		::
TCR39	316	SVFGPH

Figura 28 – Alinhamento de aminoácidos da sequência a 3' das repetições seriadas do gene B13 da cepa Y, TcCA-2 da cepa CA1 e TCR39 da cepa Silvio X10 até o aminoácido 321 da cepa Silvio X10 (conforme sequência depositada no GenPep - Accession Number F60110) e regiões correspondentes dos genes B13 e TcCA-2. Na sequência de B13 atribuiu-se uma numeração arbitrária para efeito de comparação.

Tendo em vista que estávamos analisando comparativamente as seqüências de B13 disponíveis nos bancos de dados, decidimos alinhar as seqüências nucleotídicas e sua tradução em aminoácidos de B13 e TcCA-2 desde o ATG inicial (metionina) até o início das repetições. Estes alinhamentos são mostrados nas Figuras 29 e 30, respectivamente. A análise dos dados indica 96% de identidade a nível de seqüência nucleotídica e 94% a nível de aminoácidos. Para o gene TCR39 esta seqüência não foi relatada.

[illegible]

B13		CCGACACCAGGAAGTGTCACTCTTTGGTGCTGAGTCGCTCCTTTTCACTGCAAAAGGCTC	
TcCA-2	806	CCGGCACCAGGAAGTGTCACTCTTTGGTGCTGAGTCGCTCCTTTTCACTGCAAAAGGCTC	
B13		ACTGCGGACTGCACACGTGGGTGCGCACAGGCTGCCCGAGAAGGAACGCCCCACACACATG	
TcCA-2	866	ACTGCGGACTGCACACGTGGGTGCGCACAGGCTGCCCGAGAAGGAACGCCCCACACACATG	
B13		ATGTACGCGGTGGGTATACCCCTAATTATCCCAACAGAAAAATGCCTTTGTACAATTCA	
TcCA-2	926	ATGTACGCGGTGGGTATACCCCTAATTATCCCAACAGAAAAATGCCTTTGTACAATTCA	
B13		ACCAAATACACTGAAAGAGAAAAATAGAAGAAAAAAGATACAACACCGTACGCTCCC	
TcCA-2	986	ACCAAATACAATGAAAGAGAAAAATAGAAGAAAAAAGATACAACATCGTACACACCC	
B13		AGCAACCCGTCCCACGCGGACGCCCAAAAAAGCTTTAATCCTTGTACGGACAAATTGAAG	
TcCA-2	1046	AGCAACCCCTCCCAACCCACGCCCAAAAAAGCTTTAATCCTTGTACGGACAAATTGAAT	
B13		ATAAACCAACAAAAATAAGCCTCATATTGCAAATAATAAACAAAAACAACACTCGAAAAA	
TcCA-2	1106	ATAAACCAACAAATTAAACCTCATATCACAATAATAAACAAAAACAACACTTGAAAAA	
B13		ACTCAAACAGAACAAAAAACAGCGCCATTTGGACAGGCCGCGCAGCA	1473
TcCA-2	1166	ACTAAAACAGAACAAAAAACAGCGCCATTTGTACAGGGCGCTGCA	1210

Figura 29 - Alinhamento da sequência nucleotídica de B13 da cepa Y (Gruber, 1994) com região homóloga do gene TcCA-2 da cepa CA1 (Buschiazzi *et al.*, 1992) desde o ATG inicial até o início das repetições seriadas. A numeração da sequência de TcCA-2 corresponde àquela depositada no GenBank (M92049).

B13	1	MALRPTKLDAVCEEVHGEFASGLASLQELCQQVRLLRANVQRLASEQIPSLSLDITALQ	
TcCA-2		MALRPTKLDAVCEEVHGEFASGLASLQELCQQVRLLRANVQRLASEQIPSLSLDITALQ	
B13	61	EPHLHLPLHTNFHVGMQEKKPTPGSVI FGAESLLSHCKRLTADCTRGSHRLPEKERPTHM	
TcCA-2		EPHLHLPLHTNFHVGMQEKKPAPGSVI FGAESLLSHCKRLTADCTRGSHRLPEKERPTHM	
B13	121	MYAVGYTPNYPNRKMPLYNSTKYTEREKIEEKDTPYAPSNPSHADAQKSFNPCTDKLK	
TcCA-2		MYAVGYTPHYPNRKMPLYNSTKYNEREKIEEKDTSYTPSNPSQPNQKSFNPCTDKLN	
B13	181	INQQNKPHIANNKQKTTLEKTQTEQKTAPFGQAAA	
TcCA-2		INQQIKPHITNNKQKTTLEKTKTEQKTAPFVQGAA	

Figura 30 - Alinhamento da sequência de aminoácidos de B13 e TcCA-2 desde a metionina inicial até o início das repetições seriadas.

4.14 Análise do tamanho da região das repetições seriadas do gene B13 - continuação dos estudos

Visando a amplificação da região das repetições seriadas do gene homólogo a B13 das cepas que não haviam sido amplificadas com os oligos 1 e 2 (ver item 4.12, Tabela 12), foram desenhados dois novos oligos (5 e 6) a partir da sequência obtida para o fragmento H5H6 do gene B13 da cepa Y. A posição destes oligos é indicada na Figura 26. Na Figura 31 comparam-se as sequências referentes aos oligos 1 e 2 para o gene TcCA-2 com as sequências correspondentes no gene B13 da cepa Y, observando-se variação em quatro posições no oligo 1 e duas posições no oligo 2. Os dados do sequenciamento confirmam haver diferenças nos genes homólogos a B13 entre as duas cepas e justificam o fato de não ter havido amplificação na cepa Y utilizando os oligos 1 e 2.

OLIGO 1 (CA-1): 5'CAA ATT AAA CCT CAT ATC ACA A 3' (posição 1115-1136, Fig. 4)
(Y): CAA AAT AAG CCT CAT ATT GCA A

OLIGO 2 (CA-1): 5'AGA CGC ATC AAA CAC TGT T 3' (complementar à sequência vista na Fig. 4)
(Y): AGA GGC ATC AAA CGC TGT T

OLIGO 5 (CA-1): 5'AAA CAG CGC CAT TTG TAC 3' (em substituição ao oligo 1, nt 1182-1199, Fig. 4)
(Y): AAA CAG CGC CAT TTG GAC

OLIGO 6 (CA-1): 5'CTT CGA GAC GCA TCA AAC 3' (em substituição ao oligo 2, ver Fig. 4)
(Y): CTT CGA GAG GCA TCA AAC

Figura 31 - Comparação da sequência dos dois pares de oligos. Em negrito e sublinhado as bases variantes no gene B13 da cepa Y em relação ao gene TcCA-2 da cepa CA-1.

Em experimento inicial seis cepas foram submetidas a amplificação com os oligos 5 e 6: Dm 28c, Esmeraldo, HN040, NR cl3, Silvio X10 cl1, e Y. Após análise em gel de agarose corado com brometo de etídio, as bandas amplificadas eram muito tênues. Decidimos realizar um experimento de Southern blot onde o produto da reação de PCR, após transferência para membrana de nylon, foi hibridizado com sonda radioativa do fragmento H5H6. Os dados de um dos experimentos são apresentados na Figura 32.

Figura 32 - Southern blot. O DNA amplificado por PCR com os oligos 5 e 6 foi hibridizado com sonda H5H6.

O tamanho dos fragmentos amplificados é mostrado na Tabela 13. Subseqüentemente outras 10 cepas de *T. cruzi* foram submetidas à amplificação com os oligos 5 e 6, seguindo-se análise por Southern blot. Para algumas destas cepas havia sido observada amplificação com os oligos 1 e 2, ao passo que, para outras, a amplificação com estes oligos havia sido negativa. O tamanho dos fragmentos amplificados é resumido na Tabela 13 onde também se repetem, para efeito de comparação, os dados obtidos por PCR com os oligos 1 e 2. Observa-se que dentre as 16 cepas amplificadas com os oligos 5 e 6 houve sinal positivo para sete delas.

Tabela 13 - Comparação dos produtos do PCR em diferentes cepas de *T. cruzi* amplificados com os oligos 1 e 2 e 5 e 6.

CEPA	Produto (pb)	
	oligos 1 e 2	oligos 5 e 6
CA-1	2600	2200
CER 31	neg	neg
CH8T3	2900	nd
CL 14	neg	2100
Colombiana	3500	neg
COT 33	2800	nd
COT 38	neg	neg
CL Brener	2900	2100
Dm 28c	2600/2900	neg
Esmeraldo	2100/3200	2100/2500/3100
G	3000	nd
GUA 19	neg	neg
HN040	neg	2300/2700
Maracay	neg	nd
M6241 cl 6	neg	neg
NR cl 3	neg	neg
SC 43 cl 1	neg	neg
SIC 03	3400	nd
Sylvio X-10	neg	neg
TP 10	2800	nd
TP 27	neg	2500
Y	neg	2200/2900
YuYu	2400	nd

Neg - ausência de amplificação

nd - não determinado

Para as cepas CA-1, CL Brener, e Esmeraldo observa-se amplificação a partir dos dois pares de oligos. É interessante observar que nas cepas CA-1 e CL Brener o tamanho dos fragmentos amplificados pelos dois pares de oligos é diferente. Este resultado será discutido adiante.

Tomados em seu conjunto, os dados indicam haver heterogeneidade nas sequências que flanqueiam as repetições seriadas e no tamanho desta região do gene B13 em diferentes cepas de *T. cruzi*. Este último resultado sugere que as cepas teriam número variado de repetições seriadas.

4.15 Sequência nucleotídica das repetições

Conforme discutido acima, observamos amplificação de fragmentos de DNA de tamanho molecular diferente nas cepas de *T. cruzi*. A conclusão mais lógica seria que a diferença de tamanho observada é decorrente do número de repetições seriadas. No entanto, outra possibilidade (menos provável) seria a de que haveria diferença no tamanho do trecho situado entre os oligos e o início das repetições. Para verificar esta última hipótese, os fragmentos amplificados por PCR a partir do DNA de algumas cepas foram recuperados por precipitação, clonados em vetor pBluescript-T (ver item 3.16.3 de Material e Métodos) e seqüenciados parcialmente.

Os dados são apresentados na Figura 34, onde se mostra o alinhamento das sequências obtidas (traduzidas em aminoácidos) localizadas a 5' das repetições para as cepas Dm 28c (a partir do oligo 1) e Y (a partir do oligo 5). Para o isolado Esmeraldo cl 3 não foi possível recuperar um clone que contivesse o oligo iniciador 1 ou 5. Observa-se que a sequência que antecede a primeira repetição seriada apresenta o mesmo tamanho (25 aminoácidos) nas sequências analisadas. Na Figura 34 mostra-se também a sequência obtida para Dm 28c (a partir do oligo 2) e Esmeraldo cl 3 e Y (a partir do oligo 6), notando-se que o trecho que está a 3' das repetições seriadas têm igual tamanho (7 aminoácidos) nas quatro cepas. Salienta-se que a sequência de CA-1 foi obtida a partir do banco de dados e é apresentada aqui para efeito de comparação. Desta forma, os resultados obtidos indicam que a diferença de tamanho nos fragmentos amplificados a partir do DNA das cepas (Tabela 13) seja resultante do número variável de repetições seriadas.

Seqüências a 5' das repetições seriadas:

CA-1: QIKPHITNNKQKTTLEKTKTEQKTA | PFVQGAAGDK | PSLFGQAAAGDK | PSPFGQAAAGDK | PSP
 Dm 28c: QIKPHITNNKQKTTLEKTKTEQKTA | PFVQGAAGDK | PP_FGQAAAGDK | PSPFGKAAAGDK | PSP
 Y: QNKPHIANNKQKTTLEKTKTEQKTA | PFGQAAAGDK | PSPFGQAAAGDK | PPPFGQAAAGDK | PAP

Seqüências a 3' das repetições seriadas:

CA-1: PSPFGQAAAGDK | PPPFGQAAAGDR | PSPFGQGTVFDAS
 Dm 28c: PSPFGQ_AAGDK | PSPFGQAAAGDK | PSPFGQRTVFDAS
 Esmeraldo: PSPFGQAAAGDK | PPPFGQAAAGDK | PSPFGQGTVFDAS
 Y: PSPFGQAAAGGK | PSPFGQAAAGDK | PSPFGQGTAFDAS

Figura 34 - Alinhamento da seqüência de aminoácidos obtida a partir do produto de PCR dirigido para a região repetitiva do gene B13 em cepas de *T. cruzi* (ver texto). As repetições estão separadas por risco perpendicular. Em vermelho e verde, respectivamente, os aminoácidos a 5' e 3' das repetições.

Outra questão abordada no presente estudo se relacionou à análise da seqüência das unidades de repetição nas diferentes cepas. Assim foram obtidas as seqüências parciais dos produtos amplificados por PCR, conforme discutido acima. Na Tabela 14 resumem-se os dados da seqüência de aminoácidos de algumas repetições seriadas de cinco cepas de *T. cruzi*, incluindo-se dados da literatura referentes a Silvio X10 (Hoft *et al.*, 1989) que não conseguimos amplificar com os dois pares de oligos e dados da cepa CA-1. Nesta tabela mostramos a freqüência relativa de cada unidade de repetição e as variações encontradas no motivo de cada repetição.

Tabela 14 – Variação na sequência de aminoácidos das repetições seriadas do gene B13 em cepas de *T. cruzi*.

CEPA	SEQÜÊNCIA	FREQÜÊNCIA	VARIAÇÕES NO MOTIVO DA REPETIÇÃO
CA1 (TcCA-2) n = 17	PSPFGQAAAGDK	9/17	L
	PSLFGQAAAGDK	4/17	PSPFGQAAAGDK
	PPPFGQAAAGDK	3/17	P R
	PPPFGQAAAGDR	1/17	
Dm28c n = 22	PSPFGQAAAGDK	10/22	P V
	PPLFGQAVAGDK	3/22	K
	PSPFGKAAAGDK	2/22	PSPFGQAAAGDK
	PSPFEQAAAGDK	2/22	E
	PSPFGQAA_ GDK	2/22	L GV
	PSPFGQAVAGDK	1/22	
	PSLFGQAAAGDK	1/22	
	PSLFGQGVAGDK	1/22	
Esmeraldo n = 13	PSPFGQAAAGDK	7/13	L
	PSLFGQAAAGDK	2/13	T
	PTPFGQAAAGDK	2/13	PSPFGQAAAGDK
	PPPFGQAAAGDK	1/13	P E
	PSPFEQAAAGDK	1/13	
Sylvio X10 (TCR 39) n = 10	PSLFGQAAAGDK	3/10	P E
	PSPFGQAAAGEK	3/10	PP
	PPPFGQAAAGDK	2/10	PSLFGQAAAGDK
	PSPFGQAAAGDK	1/10	
	PSTFGQAAAGDK	1/10	T
Y (B13) n = 21	PSPFGQAAAGDK	7/21	P
	PPPFGQAAAGDK	7/21	A E
	PPPFGQAAEGDK	2/21	PSPFGQAAAGDK
	PAPFGQAAEGDK	1/21	L L A
	PPPFGQAAAADK	1/21	S G
	PSLFGQAAAGDK	1/21	
	LSLFGQAAAGDK	1/21	
	PSPFGQAAAGGK	1/21	

n - número de repetições seqüenciadas

5. DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da resposta de anticorpos anti-B13

O estudo por ELISA da distribuição das subclasses de IgG anti-B13 em soros de pacientes chagásicos crônicos brasileiros mostrou o seguinte perfil de resposta: IgG1>>IgG3>IgG2>IgG4 (Figura 11). Este é o mesmo perfil encontrado em soros de pacientes chagásicos crônicos utilizando-se testes de ELISA e/ou RIA com: antígeno total da cepa Y (Scott & Goss-Sampson, 1984); antígeno total de *T. cruzi* da cepa Brasil (Morgan *et al.*, 1996); peptídeo R-13 derivado do antígeno recombinante JL-5 (Levitus *et al.*, 1991); ou antígeno KMP-11 compartilhado com *Leishmania* (Trujillo *et al.*, 1999).

A análise da resposta humoral à proteína B13 em soros de pacientes chagásicos cardiopatas (SCC) e indeterminados (SCI) mostrou que a mediana de reatividade à proteína B13 apresenta uma diferença significativa entre os dois grupos, com maior reatividade no grupo SCC (Figura 12). Em estudo anterior, Cunha-Neto *et al.* (1995) relataram haver níveis aumentados de anticorpos de reação cruzada entre B13 e miosina cardíaca em soros de cardiopatas chagásicos quando comparados com pacientes com a forma indeterminada. Com base nestas observações é possível que a maior reatividade a B13 encontrada nos SCC, seja, pelo menos em parte, relacionada com estes anticorpos de reação cruzada com miosina.

Com relação à subclasse de IgG responsável pelo reconhecimento da proteína B13 observamos que tanto os SCC quanto os SCI apresentam o mesmo perfil de subclasse: IgG1>>IgG3>IgG2>IgG4 (Figura 14). Alguns autores tentam associar o perfil de subclasse de IgG com a forma clínica da doença de Chagas. Cerban *et al.* (1993) encontraram altos níveis de anticorpos IgG1 e IgG3 em pacientes com cardiomiopatia chagásica, mas foram incapazes de associar esses resultados com a severidade da cardiomiopatia. Por outro lado, Levin *et al.* (1990) verificaram uma associação entre altos níveis de IgG1 anti-proteína P ribossomal de *T. cruzi* e cardiomiopatia chagásica severa. Morgan *et al.* (1996) apesar de encontrarem níveis elevados de IgG1 em soros de pacientes chagásicos, não notaram diferenças entre os níveis de IgG1 e as diferentes formas clínicas. No nosso estudo, não observamos diferenças no perfil das subclasses de IgG reativas a B13 entre os dois grupos de pacientes. Por outro lado, observamos que os valores das medianas da concentração de IgG1 (Tabela 5) nos SCC são maiores do que nos SCI, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa.

Antígenos protéicos de vários protozoários patogênicos apresentam freqüentemente repetições seriadas de aminoácidos que são imunodominantes (Schofield & Uadia, 1990; Frasc *et al.*, 1991). Pouco se conhece a respeito dos mecanismos moleculares que determinam a imunodominância destas repetições, tendo sido sugerido que antígenos repetitivos de protozoários podem induzir ativação de células B levando à produção de anticorpos sem o auxílio de células T "helper", determinando, portanto, uma resposta do tipo T-independente (Schofield & Uadia, 1990).

Cunha-Neto *et al.* (1997) estudando uma série de 10 moléculas de MHC classe II, mostraram que as moléculas HLA DQA1*0501, DRB1*0101, e DRB5*0101 apresentam capacidade de ligação a peptídeos sintéticos representativos dos elementos de repetição da proteína recombinante B13. Como esperado, a resposta de linfócitos T de sangue periférico de indivíduos chagásicos à proteína B13 basicamente só foi encontrada em portadores desses mesmos alelos de MHC de classe II (Abel, 1999).

Estimativas recentes indicam que 75% dos indivíduos chagásicos brasileiros são portadores dos alelos HLA acima definidos (Faé *et al.*, 2000). Por outro lado, anticorpos anti-B13 foram encontrados em 97% dos soros de indivíduos chagásicos brasileiros analisados (Gruber & Zingales, 1993). Desta forma a maior porcentagem de indivíduos com anticorpos anti-B13 em relação à porcentagem de indivíduos com capacidade de apresentar resposta T a B13 sugere que pelo menos para alguns indivíduos a resposta humoral a B13 pode ser T-independente.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a resposta de anticorpos à proteína recombinante B13 foi quantitativamente semelhante no grupo de pacientes chagásicos portadores dos alelos HLA DQA*0501, DRB1*0101 e DRB5*0101 (HLA+), e portanto capazes de apresentar respostas T a B13 e no grupo de não portadores desses alelos (HLA-) (Figura 10). Este resultado sugere que a proteína recombinante B13, pelo menos no grupo de pacientes não portadores dos alelos HLA envolvidos (grupo HLA-) e que não apresentam resposta via linfócitos T, poderia estar induzindo uma resposta do tipo T-independente, confirmando a hipótese feita anteriormente por Schofield & Uadia (1990). No entanto, tendo em vista que Cunha-Neto *et al.* (1997) estudaram a ligação de peptídeos de B13 apenas para um grupo de 10 moléculas MHC de classe II, em um universo com mais de 200 tipos descritos (Bodmer *et al.*, 1999), não se pode descartar a hipótese de que alguns dos pacientes denominados HLA- (para as moléculas estudadas) possam apresentar resposta celular à proteína B13, através de outras moléculas HLA de classe II diferentes daquelas testadas anteriormente. Entretanto, vale ressaltar que apenas 33% (6/18) dos pacientes HLA- testados simultaneamente para proliferação de linfócitos T a B13 e reatividade anti-B13 em ensaios de ELISA apresentaram resposta proliferativa de linfócitos T a B13, enquanto que 67% de indivíduos HLA- e que não têm resposta T a B13, apresentam anticorpos reativos à mesma e em níveis semelhantes ao grupo positivo para respostas proliferativas de linfócitos T anti-B13 ($p=0,504$), mostrando que nestes pacientes, os anticorpos anti-B13 podem estar sendo produzidos via T-independente. Um outro fator a ser considerado é que o "efeito" HLA sobre a resposta de anticorpos anti-B13 pode ter caráter quantitativo, ou seja, determinar títulos maiores ou menores. Esta hipótese não foi avaliada no presente estudo, visto que utilizamos uma única diluição dos soros (1:50) para a análise da reatividade à proteína recombinante B13 em ensaios de ELISA.

Quando se compara a resposta humoral à proteína B13 em grupos HLA+ e HLA-

com manifestação clínica da Doença de Chagas (Figura 13) observamos que no grupo HLA+ os soros SCC apresentam uma mediana de reatividade de 0,742, ao passo que os soros SCI apresentam mediana de 0,596, com diferença significativa ($p=0,001$). No grupo HLA- a mediana da reatividade a B13 é de 0,771 e 0,741 para os SCC e SCI, respectivamente, não havendo diferenças estatísticas ($p=0,724$). A partir dessa análise, conclui-se que a diferença de reatividade observada entre os grupos SCC e SCI é resultante da menor reatividade observada no grupo HLA+ SCI em comparação ao HLA+ SCC e os grupos HLA-. O motivo pelo qual este fenômeno acontece é ainda obscuro.

Dados da literatura sugerem que antígenos polissacarídicos bacterianos são antígenos T-independentes de tipo 2, que induzem a formação de anticorpos de clones e isotipos restritos: IgM e IgG3 em camundongos; IgM e IgG2 (predominante) em humanos (Sarvas *et al.*, 1983; Perlmuter *et al.*, 1978 e Barret and Ayoub, 1986). Vale lembrar que a IgG3 de camundongo é imunologicamente análoga a IgG2 humana no que se refere ao fato de ser a principal subclasse induzida pela maior parte dos antígenos T-independentes. O fato de o grupo HLA- (candidato potencial a uma resposta T-independente ao antígeno repetitivo B13 e que teoricamente produziria como principal subclasse de imunoglobulina a IgG2) apresentar como principal subclasse a IgG1 da mesma forma que o grupo HLA+, sugere o envolvimento de mecanismos imunoregulatórios complexos associados com o "switch" de isotipos de anticorpos. É possível imaginar que a abundância de antígenos glicoproteicos da membrana do *T. cruzi* (Acosta *et al.*, 1994) esteja relacionada à abundância de anticorpos IgG1 encontrada contra a B13 e os diversos antígenos do parasita, a exemplo do descrito por Granoff *et al.* (1993) para a imunização com polissacarídeos bacterianos conjugados a proteínas em camundongos ou humanos. Os mecanismos que influenciam este fenômeno não são claros, mas podem estar relacionados com a genética do hospedeiro (Powell & Wassom, 1993) e com os tipos de citocinas produzidas, tais como interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-4 (IL-4), as quais são conhecidas reguladoras tanto da resposta imune humoral como celular.

Abel (1999) mostrou que o perfil de citocinas em resposta à proteína B13 apresenta um desvio para citocinas do tipo T1, com altos níveis de IFN- γ e supressão recíproca de IL-4 em pacientes chagásicos cardiopatas e indeterminados. Embora o IFN- γ estimule o "switch" para IgG2a em camundongos, a única evidência que esta citocina induza "switching" para qualquer isotipo de imunoglobulina é o aumento da expressão de RNA do germline g2 por células B mIgM+ mIgG-(onde m = membrana); entretanto, não é conhecido se isto se correlaciona com o aumento do "switching" para IgG2 (Kitani & Strober, 1993). Embora o aumento de IFN- γ e anticorpos anti-IFN- γ inibam a secreção espontânea de IgG2 por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) *in vitro*, este efeito é anulado pela depleção de células mIgG2+, sugerindo que o IFN- γ age seletivamente sobre células B que já tenham feito o "switch" para este isotipo de imunoglobulina e, portanto, não está operando como fator de "switch" (Kawano *et al.*, 1994). Os dados da literatura a esse respeito são controversos. Inoue *et al.* (1995) mostraram que pacientes humanos que apresentam

imunodeficiência seletiva de produção de IgG2 também apresentam deficiência da produção de IFN- γ ; enquanto que Widhe *et al.* (1998) estudando Lyme borreliosis correlacionaram a presença de IFN- γ com produção dos isotipos IgG1 e IgG3. No entanto, vale lembrar que geralmente as funções atribuídas às citocinas foram identificadas pela análise dos efeitos de citocinas recombinantes, freqüentemente em concentrações não fisiológicas, adicionadas individualmente em sistemas *in vitro*. *In vivo*, raramente as citocinas agem sozinhas; as células alvo geralmente são expostas a uma mistura de citocinas, as quais combinam efeitos sinérgicos e/ou antagônicos podendo ter muitas conseqüências diferentes. E ainda podem induzir a produção de outras citocinas, resultando em cascatas de ativação nas quais as citocinas produzidas podem influenciar a resposta das citocinas produtoras. Neste sentido, Butch *et al.* (1989) mostraram *in vitro* que linfócitos B estimulados com antígenos de estafilococos e IL-1, IL-2, IL-4 ou IFN- γ foram incapazes de aumentar a produção de qualquer isotipo de IgG, o que indica a necessidade da presença de uma mistura de citocinas para a produção de subclasses de IgG. No caso da infecção crônica por *T. cruzi* vale ressaltar que diferentes antígenos, além da proteína B13, são simultaneamente processados e apresentados por células apresentadoras de antígenos a linfócitos T específicos que são ativados, secretam citocinas que, dentre vários efeitos, estimulam linfócitos B a produzir anticorpos contra os diferentes antígenos apresentados. Isto resultaria em um ambiente com diferentes tipos de citocinas dependentes da natureza do antígeno desencadeante. É possível que esta complexidade de citocinas produzida em resposta à complexa mistura de antígenos de *T. cruzi* possa influenciar e acabar determinando o perfil de subclasse produzida em resposta a um determinado antígeno.

Tomadas em conjunto, as evidências apresentadas neste trabalho demonstram respostas de anticorpos anti-B13 em indivíduos aparentemente incapazes de apresentar respostas de linfócitos T anti-B13. Demonstrações diretas da produção de anticorpos T-independentes poderiam ser realizadas utilizando protocolos clássicos de imunização em camundongos (Schofield & Uadia, 1990) ou estudos de produção de Imunoglobulinas *in vitro* (Butch *et al.*, 1989; King and Nutman, 1993).

5.2 Mapeamento e análise estrutural dos epitopos de B13

Em trabalho anterior (Cunha-Neto *et al.*, 1995), analisamos a antigenicidade de sete peptídeos sintéticos derivados da sequência da proteína B13 com um número limitado de soros de pacientes chagásicos, utilizando o teste de ELISA de competição com a proteína recombinante B13. Os estudos realizados no presente trabalho, analisando um número maior de soros (46), estendem e complementam os dados obtidos anteriormente, permitindo um mapeamento mais fino e definitivo do epitopo imunodominante da proteína B13. Neste estudo, utilizamos dois peptídeos adicionais, o peptídeo S4/S5 FGQAAAGDKPS-

NH₂, que compreende as seqüências de ambos os nonapeptídeos S4 e S5, e o peptídeo hexa pB13, que apresenta apenas a seqüência correspondente ao hexapeptídeo central **AAAGDK**-NH₂.

Os resultados apresentados na Figura 15 indicam um decréscimo na atividade antigênica quando se analisa a capacidade inibitória dos peptídeos pB13, S4/S5, S4, S5 e hexa pB13, respectivamente, apesar de todos eles conterem o centro ("core") do epitopo imunodominante, a seqüência **AAAGDK**. Isto sugere que esta seqüência é necessária mas não suficiente para um bom reconhecimento pelos anticorpos anti-B13. É provável que os resíduos flanqueadores do epitopo modulem a capacidade do peptídeo de ser reconhecido por esses anticorpos, como no caso dos peptídeos S4 - FGQ**AAAGDK**-NH₂ e S5 QAAAGDKPS-NH₂ que mostram atividades antigênicas marcadamente diferentes apesar de compartilharem 7 dos 9 resíduos de aminoácidos. Iwai (1999) analisou neste mesmo tipo de ensaio a inibição promovida por peptídeos de 7 resíduos: QAAAGDK-NH₂ e **AAAGDKP**-NH₂, observando valores médios de porcentagem de inibição de 64 e 56%, respectivamente, contra percentagens de inibição de 22% utilizando-se o peptídeo **AAAGDK**-NH₂. Desta forma, o acréscimo de um único resíduo de aminoácido flanqueando o "core" **AAAGDK**, na região amino- ou carboxi-terminal, resulta em aumento da capacidade de reconhecimento desses peptídeos por anticorpos anti-B13.

Dados da literatura sugerem que a atividade antigênica dependente dos resíduos flanqueadores do epitopo pode estar associada com as capacidades distintas que os peptídeos apresentam em assumir uma estrutura secundária ordenada (Craig *et al.*, 1998) e que hélices são um dos determinantes conformacionais mais freqüentemente reconhecidos pelos anticorpos (Dyson *et al.*, 1985; O'Hern, 1991; Dyson & Wright, 1995).

Os dados de DC obtidos com os peptídeos pB13, S4 e S5 (Figura 16) sugerem que, sob condições ambientais apropriadas (PBS/TFE), estes peptídeos podem ser capazes de passar de uma conformação estendida para uma conformação em hélice, fato observado mais claramente com o peptídeo pB13 (Figura 16A). O fato da helicidade do peptídeo ser expressa somente na presença de TFE é particularmente interessante, quando considerado que este solvente apresenta capacidade de induzir e estabilizar hélices em estruturas com propensão para tal. Além disto, este solvente apresenta uma constante dielétrica semelhante àquela observada dentro ou na superfície da proteína (Sönnischsen *et al.*, 1992; Jasanoff & Fersht, 1994). Com base nesses dados, sugere-se que as mudanças conformacionais induzidas por TFE sobre os peptídeos derivados de B13 podem também ocorrer na interface peptídeo-anticorpo anti-B13. Dados obtidos por outros autores sugerem que a interface antígeno-anticorpo pode induzir uma interconversão dos peptídeos de uma conformação estendida inativa para uma estrutura ativa (Fieser *et al.*, 1987), em um processo denominado "ajuste induzido por seleção conformacional" (Leder *et al.*, 1995).

Tomados em conjunto os dados de DC discutidos acima, os dados de RMN (Figura 17) mostrando os resíduos nos peptídeos pB13, S4 e S5 que estão envolvidos em uma

possível estrutura em hélice e os dados de ELISA de competição com esses peptídeos mostrando diferenças na capacidade inibitória dos mesmos, sugerem a existência de uma correlação direta entre o grau de antigenicidade dos peptídeos estudados e sua propensão em assumir estruturas em hélice ao longo da região do "core" AAAGDK. Os resultados também indicam o efeito dos resíduos de aminoácidos flanqueadores do epitopo modulando a estrutura secundária do "core" do peptídeo que simultaneamente afeta sua antigenicidade. Finalmente, a coincidência entre a posição de um único epitopo do domínio repetitivo "in tandem" da proteína recombinante B13 e a região que tem a capacidade de assumir uma conformação em hélice sugere que este aspecto estrutural pode ser responsável pela imunodominância.

Levando em consideração a natureza do ELISA de competição com a proteína B13 recombinante na fase sólida, os resultados indicam que os peptídeos que possuem tanto a sequência AAAGDK quanto a propensão à formação de hélice naquela região (pB13 e S4) podem competir mais eficazmente pela ligação de anticorpos com a proteína B13 recombinante. Estas observações reforçam a possibilidade da estrutura nativa da sequência repetitiva "in tandem" da proteína B13 poder também incluir componentes repetitivos em hélice, como observado em outros antígenos (Dyson *et al.*, 1990).

A espectroscopia de DC e RNM também tem sido utilizada para investigar a conformação das unidades tetrapeptídicas (NANP) repetidas "in tandem" do antígeno circunsporozoita (CS) de *Plasmodium falciparum*. Os dados são consistentes com a presença de formas contendo preferências conformacionais para estruturas localizadas e/ou estruturas em hélice em rápido equilíbrio dinâmico com formas estendidas (Dyson *et al.*, 1990). Estudos baseados na análise da sequência de aminoácidos utilizando programas de predição de estrutura secundária mostraram que proteínas CS de diferentes espécies de *Plasmodium* apresentavam um desvio significativo para "β-turns" na região imunodominante repetitiva "in tandem" (Nussenzweig & Nussenzweig, 1986). Em conclusão, acreditamos que, pelo menos nos casos documentados do antígeno B13 de *T. cruzi* e da proteína CS de *P. falciparum*, a imunodominância de regiões repetitivas "in tandem" possa estar associada com a habilidade de epitopos de proteínas multivalentes mostrarem uma conformação similar em cada unidade repetitiva, que é capaz de ser reconhecida por um único tipo de anticorpo, propiciando a expansão de clones de linfócitos B. Além disso, a expansão preferencial de clones de células B que secretam anticorpos contra essas regiões repetitivas pode levar a um acúmulo, nos soros de pacientes, de anticorpos com especificidade dirigida para este tipo de epitopo. Em *Trypanosoma cruzi*, a sequência de aminoácidos na unidade de repetição de muitos genes, inclusive B13 como mostrado na Tabela 13, é bastante conservada entre diferentes cepas e isolados, sugerindo um papel estrutural e/ou fisiológico para estes epitopos repetitivos (cf. Franco da Silveira, 1992). De acordo com a hipótese denominada "cortina de fumaça" (Kemp *et al.*, 1987), a imunodominância das repetições representaria um artifício desenvolvido pelos parasitas para proteger-se, desviando a resposta imune e

evitando que ela seja direcionada para domínios funcionais catalíticos de determinados antígenos (rev. Anders *et al.*, 1986; Cazzulo & Frasch, 1992). Pode ser hipotetizado que seqüências de aminoácidos com preferências conformacionais e de potencial antigênico aumentado podem ter sido selecionadas durante a evolução de protozoários parasitas constituindo domínios imunodominantes repetitivos "in tandem". Esses domínios repetitivos com preferências conformacionais, por apresentarem repetições de padrões estruturais definidos, acabam por representar um estímulo a clones restritos de linfócitos B, capazes de produzir imunoglobulinas com um mesmo padrão de reatividade e levando à geração de anticorpos em grande quantidade (imunodominância).

No caso do *P. falciparum* foi proposta uma vacina constituída por múltiplos peptídeos antigênicos (MAPs) contendo epitopos repetitivos de célula T e B (T1 e (NANP)₃), da proteína CS (de Oliveira *et al.*, 1994), no entanto sua eficácia não foi comprovada. Que seja do nosso conhecimento nenhuma vacina contendo antígenos repetitivos de *Trypanosoma cruzi* foi proposta, tanto em modelos experimentais, como no homem (ver revisões: Reis & Lopes, 2000; Brodyskyn & Barral-Netto, 2000).

A existência de reconhecimento dependente de preferências conformacionais, pelo menos em dois casos estudados de antígenos repetitivos de protozoários (B13 e CS, comentados acima), pode estar estruturalmente relacionada à sua imunodominância. Conforme dados obtidos a partir do seqüenciamento parcial de unidades repetitivas em genes homólogos a B13 em diferentes cepas e clones de *T. cruzi* (Figura 28 e Tabela 13), podemos observar que freqüentemente variações na seqüência nucleotídica não implicam em substituições de aminoácidos. Por outro lado, na Tabela 13 descrevemos a presença de variações na seqüência de algumas unidades repetitivas, por exemplo: Alanina (A) por Valina (V); A por ácido glutâmico (E); ácido aspártico (D) por E ou por glicina (G); ou G por A. Estes resíduos de aminoácidos são conhecidos não quebradores de hélice (Chou & Fasman, 1978). De qualquer forma um soro anti-B13 reconhece o antígeno correspondente a B13 de diferentes cepas em Western (Figura 23), mostrando a conservação dos epitopos.

É importante ressaltar que em outros genes de protozoários que apresentam unidades de repetição também foram observadas pequenas variações na seqüência de aminoácidos de algumas repetições (Schofield, 1990).

5.3 Análise qualitativa e quantitativa da resposta anti-B13 de soros de pacientes chagásicos da América Central e do Sul

A observação dos dados da Figura 18 confirma os dados obtidos por Umezawa *et al.* (1999) (mostrados na Figura 3 - Introdução) que indicam que soros de pacientes chagásicos de diversos países da América Central e do Sul apresentam reatividade diferencial à proteína recombinante B13. Soros da Argentina, Bolívia, Chile, Colômbia e

Venezuela apresentam alta reatividade à proteína recombinante B13, ao passo que Brasil, El Salvador, Guatemala e Honduras apresentam reatividade mais baixa.

Outro dado que chama a atenção na Figura 3, é o padrão da dispersão da reatividade dentro de um mesmo país. Por exemplo os soros do Chile, apresentam alta dispersão nos valores de D.O. no teste de ELISA, enquanto que na Venezuela a dispersão é muito baixa. Já para os soros oriundos do Brasil e Guatemala observa-se uma reatividade média à proteína recombinante B13 e uma dispersão elevada, enquanto que para os soros de El Salvador e Honduras nota-se uma menor reatividade, sendo que os soros de El Salvador apresentam maior dispersão do que os soros de Honduras. Este comportamento pode ser decorrente das características das amostras dos soros coletados em cada país, ou seja, soros coletados em uma mesma região geográfica (zona endêmica ou não) ou de várias regiões do país ou de bancos de sangue (ver Material e Métodos, item 3.5). Outra alternativa é que o comportamento desses soros na reatividade à proteína recombinante B13 reflita, de fato, padrões intrínsecos regionais relacionados com as características genéticas dos indivíduos afetados e/ou das cepas circulantes de *T. cruzi*. Ambas características estariam refletidas na resposta imunológica à infecção pelo parasita.

Independentemente do fato de as diferenças observadas na reatividade à proteína B13 refletirem a realidade do contingente de pacientes chagásicos de determinado país, realizamos uma série de estudos nas amostras de soros disponíveis, uma vez que, de fato, estas amostras apresentavam diferenças sorológicas à proteína B13.

O perfil de subclasses de imunoglobulinas responsáveis pelo reconhecimento da proteína B13 em soros de diferentes países da América Central e do Sul mostrou o mesmo perfil observado para os soros de pacientes chagásicos brasileiros ou seja, IgG1>>IgG2>IgG3>IgG4 (Figura 19).

No entanto, algumas diferenças entre os níveis de anticorpos puderam ser observadas. Por exemplo, as amostras de soros da Colômbia, Honduras e Venezuela apresentam concentração de IgG1 menor que nos demais países. Também foi observado que soros de pacientes que apresentavam baixa reatividade de IgG total a B13, apresentavam um nível de IgG1 mais elevado do que soros com alta concentração de IgG total, como no caso de soros de El Salvador. Uma das explicações para estes resultados pode ter suas bases nos reagentes utilizados no teste de ELISA. De fato, nos ensaios utilizamos conjugados (disponíveis no mercado) anti-subclasse de IgG obtidos de populações caucasianas. É possível que estes conjugados tenham afinidades diferentes por imunoglobulinas de populações de etnias diferentes, como pode ser o caso de indivíduos de regiões da América Central e do Sul.

As diferenças de reatividade à proteína B13 nos soros foram também investigadas a nível do padrão da inibição dos peptídeos derivados da sequência de B13, analogamente ao estudo realizado para soros de pacientes chagásicos no Brasil, conforme apresentado no item 4.3 e publicado recentemente (Duranti *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos por ELISA de competição mostram que os anticorpos anti-B13 de soros da América Central e do Sul reconhecem o mesmo epitopo dos soros do Brasil, independente do país de origem. Ou seja, o teste de ELISA de competição utilizado para mapeamento do epitopo de B13 reconhecido pelos soros de chagásicos da América Central e do Sul mostra a existência de anticorpos anti-B13 que reagem cruzadamente com os mesmos peptídeos dos soros do Brasil.

O conjunto de dados indica por um lado, que há diferenças na reatividade a B13 em amostras de soros de chagásicos da América Central e do Sul e, por outro, que estas diferenças não derivam de diferenças nas subclasses de Ig reativas, ou do padrão de inibição promovido por peptídeos derivados da sequência primária da proteína B13.

Um aspecto que não foi abordado refere-se à natureza do antígeno que induziu a resposta de anticorpos anti-B13 nos pacientes dos vários países, ou seja, quão conservado em cepas de *Trypanosoma cruzi* é o epitopo da proteína recombinante B13 utilizada no ELISA.

Para abordar esta questão, analisamos algumas características do gene B13 em diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*.

5.4 Heterogeneidade do gene B13 em cepas de *T. cruzi*

Conforme discutido na Introdução, as cepas de *T. cruzi* apresentam elevada heterogeneidade em parâmetros biológicos e genéticos. Tendo em vista que não dispúnhamos dos isolados de *T. cruzi* de pacientes da América Central e do Sul, cujos soros havíamos analisado nos testes de ELISA, decidimos investigar algumas características estruturais do gene B13 e do antígeno por ele codificado em cepas consideradas padrão e em isolados recentes, especificados na Tabela 3 de Material e Métodos.

O primeiro aspecto investigado foi o tamanho molecular do antígeno B13, indutor da resposta imune, utilizando ensaios de Western blot com soro anti-proteína recombinante B13. Os dados indicam que este antígeno é ubíquo nas sete cepas analisadas, originárias de diferentes regiões geográficas e de diversos hospedeiros mamíferos e insetos vetores (Tabela 3).

De fato, observamos em experimentos de Western blot que este antígeno pode variar desde aproximadamente 100 a 190 KDa dependendo da cepa analisada e que, na maior parte das cepas, dois polipeptídeos de tamanho diferente podem ser detectados. Nos isolados CL Brener, Silvio X10 cl 1 e Y, a variação da massa molecular entre os dois polipeptídeos é de 30 KDa, ao passo que nos clones Dm28c e Esmeraldo cl 3 a variação é de 5 e 15 KDa, respectivamente. Por outro lado, na cepa Colombiana observamos vários polipeptídeos reativos ao soro anti-proteína B13, variando entre 190 e 100 KDa. Deve ser ressaltado que não há dados referentes à possível glicosilação do antígeno B13 de *T. cruzi*;

desta forma, os valores de massa molecular acima relatados devem ser considerados aparentes.

Até o momento não foram descritos processos de "splicing" alternativo em transcritos de *T. cruzi*. Assim, a presença numa mesma cepa de dois polipeptídeos correspondentes a B13 poderia ser ocasionada por um processamento diferencial do produto de transcrição e/ou tradução, ou ainda serem resultantes de mRNAs de tamanho diferente codificados pelos dois alelos do gene B13, que conteriam número distinto de repetições seriadas (ver discussão a seguir). De fato, em pelo menos quatro cepas (Y, Tulahuen, Silvio X10/4 e Corpus Christi) foi verificada a presença de dois transcritos derivados do gene B13 (Hoft *et al.*, 1989; Gruber, 1994).

O gene B13 é um gene de cópia única por genoma haplóide (Gruber & Zingales, 1993), cuja estrutura foi elucidada a partir de um gene homólogo da cepa CA-1, denominado TcCA-2 (Ibañez *et al.*, 1988). O seqüenciamento completo deste gene (Buschiazzo *et al.*, 1992) mostrou a presença de uma fase aberta de leitura de cerca 4 Kb. Na extremidade 5' há uma região de 645 pb, seguida por uma região de cerca 2,7 Kb que contém 75 repetições seriadas de 36 pb. O domínio 3' do gene é constituído por 570 pb (Buschiazzo *et al.*, 1992). Para um clone da cepa CA-1, denominado CA1-72, Henriksson *et al.* (1990) observaram uma diferença de cerca 800 pb entre as regiões que contém as repetições seriadas dos dois alelos do gene. Até o momento, a função do antígeno B13 em *T. cruzi* não é conhecida. Dados de imunomicroscopia indicam que esta proteína estaria associada à membrana plasmática da forma epimastigota (Hoft *et al.*, 1995) e ensaios de imunoprecipitação com parasitas marcados com iodo mostram que B13 estaria na superfície apenas de tripomastigotas (Gruber & Zingales, 1993).

Em nossos estudos, investigamos a possibilidade de que nas diferentes cepas de *T. cruzi* haveria variação no tamanho da região das repetições seriadas do gene B13. Para esta finalidade, utilizamos ensaios de PCR com oligonucleotídios iniciadores ("primers") que flanqueiam a região em questão. O primeiro ponto a ser considerado nos experimentos discutidos a seguir refere-se ao tamanho da região a ser amplificada, sempre maior que 2 Kb. Nos ensaios, mesmo após otimização das condições de reação, o maior fragmento que conseguimos amplificar foi de 3,5 Kb. Utilizando dois pares diferentes de oligonucleotídios amplificadores (ver abaixo), o DNA genômico de 23 isolados de *T. cruzi* foi submetido a PCR. Obtivemos amplificação em 15 amostras (65%) com um dos pares de "primers" ou com ambos (Tabela 13). Em quatro das amostras onde houve amplificação (Dm 28c; Esmeraldo cl 3; HN040 e Y), obtivemos produtos de tamanho diferente. Estes resultados podem indicar que na maior parte das cepas os dois alelos do gene B13 contém o mesmo número de repetições seriadas, ou que nos nossos ensaios tenhamos amplificado apenas um dos dois alelos. A não amplificação do outro alelo poderia ser ocasionada pelo seu maior tamanho, incompatível com as condições de nosso PCR ou ao não anelamento dos iniciadores empregados. Nas cepas em que não houve amplificação, as hipóteses acima também são

válidas, além da possibilidade de que o DNA genômico utilizado estivesse em baixa concentração (dificultando a amplificação de um gene de cópia única); estivesse degradado ou contivesse inibidores da PCR.

Nas cepas em que houve amplificação, detectamos fragmentos variando entre 2,1 e 3,5 Kb. Tendo em vista que a repetição seriada é de 36 pb, uma estimativa aproximada indicaria que o número de repetições varia entre 58 a 97 nas diferentes cepas. Esta variação corresponderia a uma variação de cerca de 60 KDa no antígeno codificado pelo gene B13, o que explicaria os dados obtidos por Western blot.

Fazendo uma correlação entre os valores de massa molecular aparente dos antígenos homólogos a B13 detectados por Western blot (Figura 23) e o tamanho da região de repetições seriadas obtido por PCR (Tabela 12), verificamos que uma variação de 30 KDa entre a massa molecular dos polipeptídeos de uma mesma cepa (CL Brener, Silvio X10 cl 1 e Y), corresponderia a uma variação de cerca 750 pb codificantes (cerca de 20 unidades de repetições de 36 pb). Para o clone CL Brener, observamos amplificação de um fragmento de 2,9 Kb (com oligos 1 e 2) e de 2,1 Kb (com oligos 5 e 6). Especulando que cada produto de amplificação se originaria a partir de um alelo do gene B13, e que, portanto, cada par de oligo amplificaria um dos alelos, teríamos uma variação de cerca 800 pb entre as regiões de repetição dos dois alelos, condizente com a diferença de 30 KDa observada entre os dois antígenos de B13 deste clone. Esta hipótese é de comprovação experimentalmente complicada, fugindo ao escopo do presente trabalho. Em nosso laboratório, Aurélio Pedroso Júnior, estudante de mestrado, está analisando por Northern blot os transcritos do gene B13 em diferentes cepas de *T. cruzi*.

Dados anteriores (Gruber, 1994) indicam que a cepa Y apresenta duas espécies de mRNA de 3,5 e 4,2 Kb transcritas a partir do gene B13; estes tamanhos de mRNA são condizentes com a massa molecular dos antígenos de B13 de 140 e 116 KDa. Para esta cepa, obtivemos produtos de amplificação da região das repetições seriadas de 2,9 e 2,2 Kb, apenas com os oligos 5 e 6 (Tabela 13). A diferença de 700 pb observada seria compatível com uma diferença de cerca 30 KDa entre os dois antígenos B13, e apoiaria a hipótese de que cada transcrito seria originário de um alelo diferente. Tendo em vista que antígenos de B13 foram localizados associados à membrana de epimastigotas e na superfície da forma tripomastigota surge a possibilidade (ainda não investigada) de que cada um dos transcritos origine um polipeptídeo que tenha uma localização celular diferente nos estágios do parasita.

Para o clone Dm28c, apenas os oligos 1 e 2 originam produtos de PCR de 2,9 e 2,6 Kb (Tabela 13). Neste caso, a diferença de 300 pb é um pouco maior que a diferença de 5 kDa observada entre os dois antígenos de B13 reconhecidos por Western blot (Tabela 10).

No caso da cepa Colombiana, foi obtida amplificação apenas com oligos 1 e 2, originando o maior produto de amplificação detectado de cerca de 3,5 Kb. Coincidentemente, para esta cepa obtivemos os antígenos de B13 de maior massa molecular (190 e 170 KDa) além de outros de menor tamanho (até 100 KDa), os quais poderiam ser

produtos de degradação (Tabela 10). Provavelmente, em virtude das limitações da PCR para amplificar regiões de DNA extensas, não foi possível detectar outros produtos amplificados.

Para o clone Esmeraldo cl 3, a interpretação dos dados é mais complicada. As repetições seriadas do gene B13 são amplificadas tanto com os oligos 1 e 2 (produtos de 3,2 e 2,1 Kb), quanto com os oligos 5 e 6 (produtos de 3,1; 2,5 e 2,1 Kb), havendo concordância no tamanho de dois dos fragmentos amplificados pelos dois pares de oligos. Este fato sugere haver pequenas diferenças de sequência na região que flanqueia as repetições seriadas que permitiria um anelamento com os dois pares de oligos. A origem do fragmento de 2,5 Kb, amplificado apenas com os oligos 5 e 6, poderia ser explicada supondo-se a presença de uma cópia extra do gene B13, hipótese bastante especulativa. No entanto, aneuploidia de cromossomos de *T. cruzi* já foi verificada (Henriksson *et al.*, 1993). No Western blot do lisado de Esmeraldo cl3 foram detectados dois antígenos de 138 e 125 KDa, não tendo sido visualizado um polipeptídeo de mais alta massa molecular codificado, putativamente, pelo alelo que conteria número elevado de repetições (amplificação de 3,2 Kb). Uma das hipóteses é que este antígeno tenha se degradado durante a preparação do lisado.

Conforme comentado acima, Henriksson *et al.* (1990), utilizando experimentos de Southern blot com DNA genômico do clone CA1-72 da cepa CA-1 digerido com diferentes enzimas de restrição e hibridizado com sondas da região das repetições seriadas e da extremidade 3' do gene homólogo a B13, concluíram haver uma variação de cerca 800 pb na região das repetições dos dois alelos do gene. Nos nossos ensaios com a cepa-mãe CA-1 obtivemos com os oligos 1 e 2, um fragmento de 2,6 Kb e com os oligos 5 e 6, um fragmento de 2,2 Kb. O fragmento de 2,6 Kb apresenta um tamanho condizente com a presença de 75 repetições seriadas descritas para o gene TcCA-2 (Buschiazzo *et al.*, 1992), sendo que o par de oligos 1 e 2 foi desenhado a partir da sequência deste gene. Este par, no entanto, gerou apenas um produto de amplificação. Por outro lado, os oligos 5 e 6 geraram um produto de 2,2 Kb, que corresponderia a 61 repetições seriadas e que poderia derivar do outro alelo do gene B13. A diferença entre os dois produtos de PCR obtida por nós não coincide com o valor de 800 pb relatado por Henriksson *et al.* (1990) para a região de repetições dos dois alelos. É possível que as discrepâncias sejam devidas a diferenças genéticas entre a cepa CA-1 e o clone CA1-72. Neste sentido, os mesmos autores mostram heterogeneidade no arranjo e estrutura do gene B13 em dois clones da cepa Tulahuen (Henriksson *et al.*, 1990). Infelizmente não temos no laboratório culturas da cepa CA-1 para realização de experimentos de Western blot que poderiam elucidar melhor a questão em pauta a partir da análise da massa molecular dos antígenos de B13.

Embora alguns resultados sejam de difícil interpretação, nossos dados mostram claramente haver diferenças no tamanho da região que contém as repetições seriadas do gene B13 entre cepas de *T. cruzi* e indicam que este fator é responsável pela variação da

massa molecular do antígeno por ele codificado. Além disto, a observação de que diferentes pares de oligonucleotídeos devem ser empregados para obter-se amplificação em algumas cepas é consistente com a existência de diferenças na sequência nas regiões que flanqueiam as repetições, como, aliás, comprovado por seqüenciamento da região 3' do gene B13 da cepa Y e por alinhamento das seqüências homólogas a B13 disponíveis em bancos de dados.

Experimentos de Southern blot por digestão do DNA de algumas cepas com a enzima de restrição *Hind* III (Figura 25) indicam haver variação na estrutura e arranjo genômico do gene B13. Para as cepas CA-1 e Y foi determinada a presença de sítios de *Hind* III flanqueando a região das repetições (ver Fig. 4 para CA-1 e Fig. 26 para Y). A análise dos dados da Tabela 11 e Fig. 25 indica que cepas de grupo 1 (CA-1; CL Brener; Esmeraldo cl3 e Y) apresentam uma ou duas bandas de DNA na região entre 3,5 e 4,0 Kb que hibridizam com sonda derivada da repetição. Por outro lado, em cepas de grupo 2 (Colombiana; Dm 28c; Silvio X10 cl1 e HN040) observa-se hibridização com uma banda de peso molecular de 3,2 a 6,2 Kb e com uma de alto peso molecular (maior que 10 Kb). Estes estudos mostram haver diferenças na estrutura do gene B13 nas cepas do parasita com um padrão que poderia ser grupo-específico. A hibridização da sonda com bandas de tamanho molecular maior que 10 Kb sugere uma possível perda do sítio de *Hind* III em um dos alelos do gene. De qualquer forma, um estudo mais completo deverá ser feito futuramente para elucidar estes aspectos.

O gene B13 está localizado em uma única banda cromossômica de tamanho aproximado de 1,25 Mpb em cinco das oito cepas analisadas, as quais pertencem aos grupos 1 e 1/2 (Souto *et al.*, 1996), enquanto em três cepas de grupo 2, encontra-se em uma banda de tamanho um pouco menor (cerca de 0,9 Mpb) (Figura 24). Estes dados indicam que os dois alelos do gene B13 estão em cromossomos homólogos de igual tamanho molecular. Salienta-se que dada a plasticidade do genoma de *T. cruzi*, nem sempre os cromossomos homólogos apresentam o mesmo tamanho (Henriksson *et al.*, 1996). O mapeamento de muitas seqüências expressas de *T. cruzi* nas bandas cromossômicas de nove cepas do parasita está sendo conduzido por Nancy Vargas e Aurélio Pedroso Júnior em nosso laboratório. Os dados obtidos indicam que uma porcentagem significativa das sondas hibridiza com bandas cromossômicas de maior tamanho molecular nas cepas de grupos 1 e 1/2 em relação a cepas de grupo 2, analogamente ao observado para o gene B13. Atualmente Nancy Vargas, estudante de doutorado, está caracterizando seqüências gênicas próximas ao gene B13, visando verificar a manutenção de sua ligação ("linkage") em diferentes cepas do parasita.

Os estudos do arranjo do gene B13 no DNA genômico e nos cromossomos das cepas sugerem haver um padrão grupo-específico. Além de termos investigado o polimorfismo entre as cepas quanto ao tamanho da região das repetições seriadas do gene B13, os ensaios de PCR confirmaram haver heterogeneidade na seqüência nucleotídica que flanqueia esta região. De fato, dois diferentes pares de oligonucleotídeos foram utilizados para amplificação deste domínio: em onze cepas dentre as 23 analisadas obtivemos

amplificação com oligos 1 e 2 e em sete cepas dentre as 16 analisadas houve amplificação com oligos 5 e 6. Em sete cepas não houve amplificação com nenhum dos dois pares. Investigamos ainda o tamanho da região que antecede e sucede a região das repetições seriadas em um número limitado de cepas. Os dados da Figura 28 mostram que para os isolados CA-1, Dm28c e Y há 25 aminoácidos situados a 5' da primeira repetição. É interessante notar que estes resíduos são 100% conservados nas duas primeiras cepas e apresentam duas substituições na cepa Y (I por N e T por A). Nas cepas CA-1, Dm28c, Esmeraldo cl3 e Y encontramos sete aminoácidos a 3' da última repetição seriada (incompleta). Neste caso a sequência é idêntica para as cepas CA-1 e Esmeraldo, havendo um resíduo variante para o clone Dm28c (G por R) e um para a cepa Y (V por A) (Figura 28). Desta forma, os dados sugerem haver conservação do tamanho das regiões adjacentes às repetições, pelo menos em três cepas analisadas.

Neste trabalho sequenciamos a região a 3' das repetições seriadas do gene B13 da cepa Y, tendo como objetivo principal desenhar um oligo que permitisse amplificar esta região na cepa Y e em outras que não haviam sido amplificadas com os oligos 1 e 2. Os dados do sequenciamento permitiram fazer algumas comparações interessantes com sequências depositadas em bancos de dados para genes homólogos a B13 de outras cepas. O alinhamento da sequência nucleotídica a 3' das repetições seriadas de B13 com sequência homóloga do gene TcCA-2 mostrou 94% de similaridade em cerca de 1150 pb. Esta comparação levou em conta a região codificadora (até o códon de parada TGA) e a região 3' UTR (cerca de 400 pb) (ver Fig. 27). Quando comparamos a sequência correspondente aos primeiros 185 aminoácidos (após as repetições seriadas) entre o gene B13 e TcCA-2 obtivemos 83% de identidade. Para o gene TCR39 do clone Silvio X10 cl4, só está depositada a sequência de aminoácidos. Supondo não ter havido erros de sequenciamento, os 185 resíduos de aminoácidos deste antígeno apresentam 70% e 66% de identidade com os antígenos B13 e TcCA-2, respectivamente. O alinhamento da Fig. 28 mostra (em azul) um bloco de aminoácidos na posição 24 a 55 (da sequência de B13) que é encontrado em B13 e TcCA-2 e está ausente em TCR39. É bem verdade que nesta última sequência observa-se uma possível ausência de um aminoácido antecedendo este bloco (Fig. 28), o que poderia sugerir erro de sequenciamento. No entanto, próximo ao final da sequência de B13 (posição 158 a 175; indicadas em vermelho) há um outro bloco de aminoácidos compartilhado com TCR39 e ausente em TcCA-2. Este bloco apresenta elevada proporção de resíduos hidrofóbicos, ao passo que na sequência de TcCA-2 nesta região há predominância de aminoácidos polares não carregados. Submetemos as sequências C terminais de B13 à busca de sinais para ligação de âncora de GPI, mas os programas utilizados não detectaram nenhum sítio putativo.

A presença de dois blocos de aminoácidos em um gene de cópia única (B13) que são compartilhados por duas das três cepas analisadas é uma observação bastante interessante. Isto poderia sugerir algum processo de recombinação entre os alelos do gene

ou entre genes de duas cepas (troca genética - "genetic exchange"). Por outro lado, reprodução sexuada em *T. cruzi* nunca foi comprovada em laboratório, havendo alguma indicação de que ela poderia ocorrer na natureza (Bogliolo *et al.*, 1996; Carrasco *et al.*, 1996). Tendo em vista que a presença de blocos de aminoácidos diferentes em genes homólogos de cepas de *T. cruzi* é um achado inédito neste parasita, acreditamos ser importante explorá-lo futuramente. Uma possível abordagem seria desenhar oligonucleotídeos dirigidos para estas duas regiões e submeter DNA dos isolados a ensaios de PCR seguido por seqüenciamento. Outra abordagem seria desenhar oligos internos para cada bloco de seqüências e utilizá-los como sondas para investigar nas diferentes cepas ou nos alelos do gene B13 de capa cepa a presença de cada bloco. A confirmação da presença de mosaicos de seqüências no gene B13 que codifica um antígeno imunodominante indicaria processos de recombinação, não descritos neste parasita. É possível que uma análise mais extensa demonstre que este processo também ocorra em outros genes.

O alinhamento da seqüência desde a metionina iniciadora até o início das repetições seriadas mostrou 96% e 94% de identidade a nível de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente, entre os genes B13 e TcCA-2. Nesta região não foi identificada uma seqüência sinal para endereçamento ao retículo endoplasmático. O conjunto de dados sugere haver elevada conservação de seqüência nucleotídica nas regiões que flanqueiam as repetições seriadas no gene B13 das cepas Y e CA-1.

Nas proteínas circumsporozoíticas (CS) de *Plasmodium* as repetições seriadas imunodominantes também estão localizadas na porção central. A 5' e 3' desta porção existem duas regiões que apresentam aminoácidos carregados e que podem apresentar estrutura em alfa-hélice. A outra região carregada está próxima ao C-terminal e é flanqueada por um par de cisteínas. Na porção N-terminal e C-terminal, encontram-se, respectivamente, o peptídeo sinal e a seqüência para adição de âncora de GPI (revisto em Nussenzweig & Nussenzweig, 1985). A clonagem e seqüenciamento de genes de CS de várias espécies de *Plasmodium* bem como de subespécies e cepas permitiu concluir que as regiões que flanqueiam as repetições apresentam elevada similaridade de seqüência a nível de nucleotídeos (95%) e de aminoácidos (*cf* Colomer-Gould & Enea, 1990). Por outro lado, a região das repetições apresenta grande variabilidade entre espécies e sub-espécies de *Plasmodium* no que se refere a tamanho, número e seqüência de aminoácidos; podendo apresentar dois conjuntos de motivos repetidos diferentes (Colomer-Gould & Enea, 1990; Di Giovanni *et al.*, 1990).

A família de genes que codificam mucinas de *T. cruzi* foi bastante estudada (Di Noia *et al.*, 1996). Estas moléculas altamente glicosiladas (até 80%) estariam envolvidas em processos de adesão e invasão do parasita na célula hospedeira, dentre outros (Ruiz *et al.*, 1993; Almeida *et al.*, 1994). O seqüenciamento dos genes de mucinas mostrou que o domínio central da molécula contém seqüências repetidas com o consenso T8KP2. Em resíduos de treonina e serina ocorre a adição de açúcares. O número de repetições pode variar de 1 a

10 e o número de treoninas de cada repetição pode ser 7, 8 ou 10, com variações entre as cepas e entre genes da mesma cepa. Os genes das mucinas apresentam um domínio central muito polimórfico flanqueado por regiões 5' e 3' conservadas. É interessante observar que nestas moléculas os resíduos que constituem a unidade de repetição (T; K e P) não estão incluídos na lista dos resíduos propostos por Schofield (1991) como abundantes em epitopos imunodominantes que induziriam uma resposta humoral T-independente (ver Tabela 1B). A partir deste exemplo fica claro que existem diferentes classes de antígenos parasitários com repetições seriadas e que a estrutura da repetição deve estar relacionada com diferentes funções dos antígenos na "biologia" do organismo.

Neste trabalho analisamos a sequência de 83 repetições seriadas do gene B13 de cinco cepas. Estas sequências foram determinadas por nós ou a partir de dados publicados. É importante salientar que algumas das sequências foram obtidas a partir de produtos de PCR, e que, portanto, podem estar sujeitas a erros de leitura da *Taq* polimerase (Wagner *et al.*, 1990). Os dados das 83 sequências são resumidos na Tabela 14. A primeira conclusão que surge é que em *T. cruzi* existe elevada conservação do motivo da repetição (12 aminoácidos). As sequências do epitopo imunodominante de B13: FGQAAAGDK e dos epitopos mínimos de B13 (determinados por Iwai, 1999): QAAAGDK e AAAGDKP são encontradas, respectivamente em 73%; 79,5 e 79% das 83 repetições analisadas. A sequência - PSP, encontrada em 55% das sequências analisadas e que não está incluída no epitopo imunodominante FGQAAAGDK, pode apresentar como variantes: PSL (14%); PPP (17%); PPL (3,6%); PTP (2,4%), PAP (1,2%), PST (1,2%) e LSL (1,2%). Na Tabela 15 mostram-se as frequências de cada resíduo no epitopo imunodominante FGQAAAGDK e em PSP nas 83 sequências das repetições especificadas na Tabela 14. No epitopo imunodominante observa-se que o resíduo F é mantido em 100% das repetições e que o segundo e terceiro resíduo A da trinca AAA variam em apenas 6% das repetições. Os resíduos G e K terminais também apresentam elevada conservação (98,5%).

Tabela 15 - Variação da frequência de resíduos de aminoácidos no motivo FGQAAAGDKPSP (dados computados a partir da Tabela 14)

Resíduo	F	G	Q	A	A	A	G	D	K	P	S	P
Frequência (%) (em 83 sequências)	100	96	97,5	98,5	94	94	98,5	95	98,5	98,7	69,9	98,3

Nas sequências variantes do epitopo imunodominante observamos as substituições resumidas na Tabela 16, salientando-se que o resíduo F é 100% conservado.

Tabela 16 - Substituição de resíduos de aminoácidos no motivo GQAAAGDK (dados computados a partir da Tabela 14)

Resíduo	G	Q	A	A	A	G	D	K
Substituição por	E ^{a, b}	K ^a	G ^a	V ^a	E ^a	ausente ^a ou A ^c	E ^a ou G ^c	R ^d

Cepas onde ocorre a substituição: ^a Dm 28c; ^b Esmeraldo; ^c Y; ^d CA-1

Admitindo-se que as seqüências estejam corretas, observa-se que em alguns casos as substituições ocorrem entre aminoácidos de mesmas características físico-químicas. Por exemplo, entre aminoácidos com grupos não polares (A / V / G) ou entre aminoácidos carregados negativamente (D / E). É possível que este tipo de substituição tenha ocorrido visando a manutenção da conformação em hélice do epitopo imunodominante como definido anteriormente (Duranti *et al.*, 1999). Uma exceção seria a substituição de A por E e de G por E. Dentre as seqüências obtidas, nota-se que o clone Dm 28c é aquele que apresenta maior variabilidade em suas unidades de repetição. Por outro lado, neste clone houve mais unidades seqüenciadas.

Desta forma, o estudo realizado confirma haver conservação das seqüências dos epitopos imunodominantes e dos epitopos mínimos nas unidades de repetição do gene B13 em cepas de *T. cruzi*. Mais ainda, a observação de que muitas das substituições de aminoácidos são conservadoras e ocorrem entre aminoácidos que compartilham as mesmas características físico-químicas sugere que este epitopo deva desempenhar um papel importante na biologia do parasita. Esta conservação estrutural das seqüências que compõem o epitopo imunodominante de B13 aparentemente gera um epitopo reconhecido de forma altamente conservada, como pode ser corroborado por duas observações: 1) a observação de que anticorpos gerados pela imunização com B13 de uma cepa reconhecem o antígeno nativo B13 de todas as outras cepas testadas (ensaios de Western blot, Figura 23), e 2) a demonstração de que soros de pacientes de vários países que se infectaram com uma vasta gama de isolados de *T. cruzi* distintos reconhecem B13 de um só isolado (cepa Y) e apresentam valores semelhantes de inibição promovida pelos peptídeos pB13, S4 e S5 derivados da seqüência deste epitopo.

A análise da estrutura do gene B13 mostra que a característica que apresenta maior variabilidade entre as cepas é o número das repetições do epitopo imunodominante em cada molécula B13 que, segundo nossas estimativas, pode variar desde 58 até 97. É provável que esta variação de quase 100% tenha implicações na indução da resposta humoral e que seja, em parte, responsável pelas diferenças de reatividade dos soros chagásicos da América Central e do Sul a B13. Por outro lado, outros fatores como por exemplo diferenças genéticas entre os indivíduos podem contribuir para o fenômeno observado.

Além disto, não pode ser descartada a hipótese de que a presença de aminoácidos variantes no epitopo imunodominante de algumas repetições (Tabela 16) possa induzir modificações na resposta imune. Dos muitos elementos de repetição analisados nesta Tese, apenas duas variações de aminoácidos ocorrem nos dois sítios de ligação ao principal alelo HLA de apresentação, HLA-DQA1*0501/DQB1*0301 (posições p4 e p6, GqA) (Cunha-Neto *et al.* 1997; Abel, 1999), o que, em teoria, levaria à perda de ligação. Os demais elementos repetitivos mantêm, portanto, a capacidade de se ligar ao HLA-DQA1*0501/DQB1*0301. Estudos anteriores (Abel, 1999) indicam, no entanto, que peptídeos sintéticos representando as 10 seqüências variantes presentes na proteína recombinante B13 (cepa Y) são reconhecidos de forma diferencial por linfócitos T. A porcentagem de indivíduos apresentando resposta de células T aos diferentes peptídeos variou entre 0 a 70%, ilustrando a importância das variações para o reconhecimento por linfócitos T.

Que seja de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que analisa a estrutura geral de um gene que codifica um antígeno com epitopos imunodominantes seriados em um número considerável de cepas de *T. cruzi* e a diversidade de seu reconhecimento.

A conservação do epitopo funcional nos diferentes isolados de *T. cruzi* e a imunodominância de uma mesma seqüência em 145 soros de pacientes chagásicos de oito países da América Central e do Sul tão distantes como Honduras e Argentina sugere que seqüências repetitivas com preferências conformacionais desempenham um papel importante na biologia deste parasita como, por exemplo, no escape à resposta imune do hospedeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel, L.J. (1999) Resposta imune celular periférica à proteína recombinante B13 de *T. cruzi* em humanos: reconhecimento antigênico e perfil de citocinas. Tese de Doutorado, ICB, USP.
- Acosta, A.; Schenkman, R.P. and Schenkman, S. (1994) Sialic acid acceptors of different stages of *Trypanosoma cruzi* are mucin-like glycoproteins linked to the parasite membrane by GPI anchors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 439-442.
- Affranchino J.L., Ibanez C.F., Luquetti A.O., Rassi A., Reyes M.B., Macina R.A., Aslund L., Pettersson U., Frasch A.C. (1989) Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 221-228.
- Almeida, I.C.; Ferguson, M.A.J.; Schenckman, S. and 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.* 340, 793-802.
- Anders, R.F. (1986) Multiple cross-reactivities amongst antigens of *Plasmodium falciparum* impair the development of protective immunity against malaria. *Parasite Immunol.* 8, 529-539.
- Arnot, D.E.; Barnwell, J.W. and Stewart, M.J. (1988) Does biased gene conversion influence polymorphism in the circumsporozoite protein-encoding gene of *Plasmodium vivax*? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8102-8106.
- Avila, H.A.; Pereira, J.B.; Thiemann, O.; de Paiva, E.; Degraeve, W.; Morel, C.M. and Simpson, L. (1993) Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimen of chronic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2421-2426.
- Avila, H.A.; Sigman, D.S.; Cohen, L.M.; Millikan, R.C.; & Simpson, L. (1991) Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48, 211-221.
- Barrett D.J. and Ayoub E.M. (1986) IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin. Exp. Immunol.* 63, 127-134.
- Bodmer, J.G.; Marsh, S.G.; Albert, E.D.; Bodmer, W.F.; Bontrop, R.E.; Dupont, B.; Erlich, H.A.; Hansen, J.A.; Mach, B.; Mayr, W.R.; Parham, P.; Petersdorf, E.W.; Sasazuki, T.; Schreuder, G.M.; Strominger, J.L.; Svejgaard, A. and Terasaki, P.I. (1999) Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. *Tissue Antigens* 53, 407-446.

- Bogliolo, A.R.; Lauria-Pires, L. and Gibson, W.C. (1996) Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Tropica* 61, 31-40.
- Borges-Pereira, J.; Junqueira, A.C.; Santos, L.C.; de Castro, J.A.; de Araujo, I.B. and Coura, J.R. (1996) Xenodiagnosis in chronic Chagas' disease. I. The sensitivity of *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 29, 341-347.
- Brener, Z. (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 27, 347-382.
- Brener, Z. (1977) Intraespecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *PAHO Sci. Publ.* 347, 11-21.
- Brodskyn, C.I. and Barral-Neto, M. (2000) Resposta imune humana na Doença de Chagas. In: Brener, Z.; Andrade, Z.A. and Barral-Neto, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 170-176.
- Buschiazzo, A.; Campetella, O.E.; Macina, R.A.; Salceda, S.; Frasch, A.C. and Sanchez, D.O. (1992) Sequence of the gene for a *Trypanosoma cruzi* protein antigenic during the chronic phase of human Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54, 125-128.
- Butch, A.W.; Macke, K.A.; Scott, M.G.; Inkster, M. and Nahm, M.H. (1989) Mitogen-induced human IgG subclass expression. II. IgG1 and IgG3 subclasses are preferentially stimulated by a combination of *Staphylococcus aureus* Cowan I and pokeweed mitogen. *Hum. Immunol.* 24, 207-218.
- Camargo, M.E. (1966) Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 8, 227-235.
- Camargo, M.E. and Amato Neto, V. (1974) Anti-*Trypanosoma cruzi* IgM antibodies as serological evidence of recent infection. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 16, 200-202.
- Camargo, M.E. and Rebonato, C. (1969) Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18, 500-505.
- Camargo, M.E. and Takeda, G.K.F. (1979) Diagnóstico de Laboratório. In *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, Brener, Z.; Andrade, Z. (eds), Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 175-198.
- Camargo, M.E.; Hoshino-Shimizu, S.; Macedo, V.; Peres, B.A. and Castro, C. (1977) Serologic diagnosis of human *Trypanosoma cruzi* infection. Comparative study of complement fixation, immunofluorescence, hemagglutination and flocculation tests in 3,625 serum samples. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 19, 254-260.
- Cano, M.I.; Gruber, A.; Vasquez, M.; Cortés, A.; Levin, M.J.; González, A.; Degraeve, W.; Rondinelli, E.; Zingales, B.; Ramirez, J.L.; Alonso, C.; Requena, J.M. and Franco da

- Silveira, J. (1995) Molecular karyotype of clone CL Brener. *Mol. Biochem. Parasitol.* 71, 273-278.
- Carrasco, H.J.; Frame, I.A.; Valente, S.A. and Miles, M.A. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 418-424.
- Carvalho, M.R.; Krieger, M.A.; Almeida, E.; Oelemann, W.; Shikanai-Yassuda, M.A.; Ferreira, A.W.; Pereira, J.B.; Saez-Alquezar, A.; Dorlhiac-Llacer, P.E.; Chamone, D.F. et al. (1993) Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion* 33, 830-834.
- Castellani, O.; Ribeiro, L.V. and Fernandes, J.F. (1967) Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Protozool.* 14, 447-451.
- Cazzulo, J.J. and Frasch A.C. (1992) SAPA/trans-sialidase and cruzipain: two antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. *The FASEB J.* 6, 3259-3264.
- Cerban, F.M.; Gea, S.; Menso, E. and Vottero-Cima, E. (1993) Chagas' disease: IgG isotypes against *Trypanosoma cruzi* cytosol acidic antigens in patients with different degrees of heart damage. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 67, 25-30.
- Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Methods Enzymol.* 47, 45-148.
- Colomer-Gould, V. and Enea, V. (1990) *Plasmodium yoelii nigeriensis* circumsporozoite gene structure and its implications for the evolution of the repeat regions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43, 51-58.
- Craig, L.; Sanschagrin, P.C.; Rozek, A.; Lackie, S.; Kuhn L.A. and Scott, J.K. (1998). The role of structure in antibody cross-reactivity between peptides and folded proteins. *J. Mol. Biol.* 281, 183-201.
- Cunha-Neto, E.; Abel, L.C.J.; Rizzo, L.V.; Goldberg, A.C.; Faé, K.; Mady, C.; Ianni, B.; Hammer, J.; Sinigaglia and Kalil, J. (1997) Autoimmunity in human Chagas' disease cardiomyopathy: cytokine production and antigen recognition by T cell. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92 (Suppl. I), 40-41.
- Cunha-Neto, E.; Duranti, M.; Gruber, A.; Zingales, B.; De Messias, I.; Stolf, N.; Bellotti, G.; Patarroyo, M.E.; Pilleggi, F. and Kalil, J. (1995) Autoimmunity in Chagas' disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3541-3545.

- Dale, J.B. and Beachey, E.H. (1986) Sequence of myosin-crossreactive epitopes of streptococcal M protein. *J. Exp. Med.* 164, 1785-1790.
- de Andrade A.L.; Zicker, F.; de Oliveira R.M.; Almeida Silva, S.; Luquetti, A.; Travassos, L.R.; Almeida I.C.; de Andrade, S.S.; de Andrade, J.G. and Martelli, C.M. (1996) Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 348, 1407-1413.
- de Oliveira, G.A.; Clavijo, P.; Nussenzweig, R.S. & Nardin, E.R. (1994) Immunogenicity of an alum-adsorbed synthetic multiple-antigen peptide based on B- and T-cell epitopes of the *Plasmodium falciparum* CS protein: possible vaccine application. *Vaccine*. 12(11): 1012-1017.
- Despommier, D.D. and Karapellou, J.W. (1987) Parasite life cycles. Ed. Springer - Verlag New York Inc., 1987, pp 6-7.
- Di Giovanni, L.; Cochrane, A.H. and Enea V. (1990) On the evolutionary history of the circumsporozoite protein in plasmodia. *Exp. Parasitol.* 70, 373-381.
- Di Noia, J.M.; Pollevick, G.D.; Xavier, M.T.; Previato, J.O.; Mendonça-Previato, L.; Sánchez, D.O. and Frasch, A.C. (1996) High diversity in mucin genes and mucin molecules in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 271, 32078-32083.
- Dias, J.C.P. (1979) Mecanismos de transmissão. In *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, Brener, Z.; Andrade, Z. (eds), Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Diaz, C.; Nussenzweig, V. and Gonzales, A. (1992) An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 616-623.
- Duranti, M.A.; Franzoni, L.; Sartor, G.; Benedetti, A.; Iwai, L.K.; Gruber, A.; Zingales, B.; Guzman, F.; Kalil, J.; Spisni, A. and Cunha-Neto, E. (1999) *Trypanosoma cruzi*: conformational preferences of antigenic peptides bearing the immunodominant epitope of the B13 antigen. *Exp Parasitol.* 93, 38-44.
- Dvorak, J.A. and Hyde, T.P. (1973) *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Exp. Parasitol.* 34, 268-283.
- Dvorak, J.A.; Hall, T.E.; Crane, M.S.; Engel, J.C.; McDaniel, J.P. and Uriegas, R. (1982) *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. *J. Protozool.* 29, 430-437.
- Dyson, H.J. and Wright, P.E. (1995) Antigenic peptides. *The FASEB J.* 9, 37-42.
- Dyson, H.J., Cross K.J., Houghten, R.A., Wilson, I.A., Wright, P.E. and Lerner, R.A. (1985) The immunodominant site of a synthetic immunogen has a conformational preference in water for a type-II reverse turn. *Nature* 318, 480-483.

- Dyson, H.J.; Merutka G.; Waltho, J.P.; Lerner R.A. and Wright P.E. (1992a) Folding of peptide fragments comprising the complete sequence of proteins. Models for initiation of protein folding. I Myohemerythrin. J. Mol. Biol. 226, 795-817.
- Dyson, H.J.; Satterthwait, A.C.; Lerner, R.A. and Wright, P.E. (1990) Conformational preferences of synthetic peptides derived from the immunodominant site of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* by ^1H NMR. Biochemistry 29, 7828-7837.
- Dyson, H.J.; Sayre, J.R.; Merutka, G.; Shin, H.C.; Lerner, R.A. and Wright P.E. (1992b) Folding of peptide fragments comprising the complete sequence of proteins. Models for initiation of protein folding. II Plastocyanin. J. Mol. Biol. 226, 819-835.
- Enea, V.; Galinski, M.; Schmidt, E.; Gwadz, R. and Nussensweig, R.S. (1986) Evolutionary profile of the circumsporozoite gene of the *Plasmodium cynomolgi* complex. J. Mol. Biol. 188, 721-726.
- Erlich, H.A.; Higuchi, R.; Lichtenwalter, K.; Reynolds, R. and Sensabaugh, G. (1990) Reliability of the HLA-DQ alpha PCR-based oligonucleotide typing system. J. Forensic Sci. 35, 1017-1019.
- Faé, K.C.; Drigo, S.A.; Cunha-Neto, E.; Ianni, B.; Mady, C.; Kalil, J. and Goldberg, A.C. (2000) HLA and beta-myosin heavy chain do not influence susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy. Microbes Infect. 2, 745-51.
- Ferreira, A.W.; Belem, Z.R.; Moura, M.E. and Camargo, M.E. (1991) Standardization of serological tests for Chagas' disease: an immunoenzymatic test for blood donors triage. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 33, 123-128.
- Fieser, T.M.; Tainer, J.A.; Geysen, H.M.; Houghten, R.A. and Lerner, R.A. (1987) Influence of protein flexibility and peptide conformation on reactivity of monoclonal anti-peptide antibodies with a protein α -helix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8568-8572.
- Franco da Silveira, J. (1992) - *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens for serodignosis. In: Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M. E. & Rassi, A. (Eds), Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil' 92, SP, pp. 207-218.
- Franco da Silveira, J. (1999) - Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. Em: Brener, Z., Andrade, Z.A. & Barral-Netto, M. (Eds), *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, Guanabara Koogan, 2ª ed, pp127-152.
- Frasch, A.C.C.; Cazzulo J.J.; Aslund L. and Petterson U. (1991) Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. Parasitol. Today 7, 148-151.

- Galinski, M.R.; Arnot, D.E.; Cochrane, A.H.; Barnwell, J.W.; Nussenzweig, R.S. and Enea, V. (1987) The circumsporozoite gene of the *Plasmodium cynomolgi* complex. *Cell* 48, 311-319.
- Gonzalez, A.; Prediger, E.; Huecas, M.E.; Nogueira, N. and Lizardi, P.M. (1984) Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3356-3360.
- Granoff, D.M.; Holmes, S.J.; Osterholm, M.T.; McHugh, J.E.; Lucas, A.H.; Anderson, E.L.; Belshe, R.B.; Jacobs, J.L.; Medley, F. and Murphy, T.V. (1993) Induction of immunologic memory in infants primed with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *J. Infect. Dis.* 168, 663-671.
- Graves, P. and Gelband H. (2000) Vaccines for preventing malaria. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2, CD000129.
- Gruber, A (1994) Caracterização de dois genes contíguos de *Trypanosoma cruzi* que codificam antígenos com repetições seriadas de epitopos imunodominantes. Tese de doutoramento, IQ - USP.
- Gruber, A. and Zingales, B. (1993) *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Exp. Parasitol.* 76, 1-12.
- Guerreiro, C. and Machado, A. (1913) Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil Med.* 27, 225-226.
- Gustincich, S.; Manfioletti, G.; Del Sal, G.; Schneider, C. and Carninc, P. (1991) A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*, 11, 298-300, 302.
- Hanaham, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Henriksson, J.; Åslund, L. and Pettersson, U. (1996) Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today* 12, 108-114.
- Henriksson, J.; Åslund, L.; Macina, R.A.; Franke de Cazzulo, B.M.; Cazzulo, J.J.; Frasch, A.C.C. and Pettersson, U. (1990) Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42, 213-223.
- Henriksson, J.; Pettersson, U and Solari, A. *Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. (1993) *Exp. Parasitol.* 77, 334-348.

- Hoft, D.F., Kim, K.S., Otsu, K.; Moser, D.R.; Yost, W.J.; Blumin, J.H.; Donelson, J.E. and Kirchhoff, L.V. (1989) *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. *Infection and Immunity* 57, 1959-1967.
- Hoft, D.F.; Donelson, J.E. and Kirchhoff, L.V. (1995) Repetitive protein antigens of *Trypanosoma cruzi* have diverse intracellular locations. *J. Parasitol.* 81, 549-554.
- Hoshino-Shimizu, S.; Camargo, M.E. and Nagasse, T.K. (1978) A stable polysaccharide-hemagglutination reagent for the diagnosis of acute or recent *Trypanosoma cruzi* infections. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 20, 208-212.
- Houghton, R.L.; Benson, D.R.; Reynolds, L.; McNeill, P.; Sleath, P.; Lodes, M.; Skeiky, Y.A.; Badaro, R.; Krettli, A.U. and Reed, S.G. (2000) Multiepitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated or untreated Chagas' disease. *J. Infect. Dis.* 181, 352-330.
- Ibañez, C.F.; Affranchino, J.L.; Macina, R.A.; Reyes, M.B.; Leguizamon, S., Camargo, M.E.; Aslund, L.; Pettersson, U. and Frasch, A.C. (1988) Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30, 27-33.
- Inoue, R.; Kondo, N.; Kobayashi, Y.; Fukutomi, O. and Orii, T. (1995) IgG2 deficiency associated with defects in production of interferon-gamma; comparison with common variable immunodeficiency
- Iwai, L.K. (1999) *Mimetismo molecular e reconhecimento de peptídeos na cardiopatia chagásica e reumática. Tese de Mestrado, EPM/UNIFESP.*
- Jasanoff, A. and Fersht, A.R. (1994) Quantitative determination of helical propensities from trifluoroethanol titration curves. *Biochemistry* 33, 2129-2135.
- Kawano, Y.; Noma, T. and Yata, J. (1994) Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *J. Immunol.* 153, 4948-4958.
- Kemp, D. J., Coppel, R. L. and Anders, R. F. (1987) Repetitive proteins and genes of malaria. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 181-208.
- King, C.L. and Nutman, T.B. (1993) IgE and IgG subclass regulation by IL-4 and IFN-gamma in human helminth infections. Assessment by B cell precursor frequencies *J. Immunol.* 151, 458-465.
- Kirchhoff, L.V.; Gam, A.A.; Gusmão, R.A.; Goldsmith, R.S.; Rezende, J.M. and Rassi, A. (1987) Increased specificity of serodiagnosis of Chagas' disease by detection of antibody to the 72- and 90-kilodalton glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 155, 561-564.

- Kitani, A. and Strober W. (1993) Regulation of C gamma subclass germ-line transcripts in human peripheral blood B cells. *J. Immunol.* 151, 3478-3488.
- Knierim, F. and Rubinstein, P. (1970) The detection of Chagas' disease. A rapid haemagglutination test for special use in blood banks and epidemiological studies. *Vox Sang* 18, 280-286.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leder L.; Berger C.; Bornhauser S.; Wendt H.; Ackermann F.; Telesarov I. and Bosshard H.R. (1995) Spectroscopic, calorimetric and kinetic demonstration of conformational adaptation in peptide-antibody recognition. *Biochemistry* 34, 16509-16518.
- Lehrman, S.R.; Tuls, J.L. and Lund, M. (1990) Peptide α -helicity in aqueous trifluoroethanol: correlations with predicted α -helicity and the secondary structure of the corresponding regions of bovine growth hormone. *Biochemistry* 29, 5590-5596.
- Levin, M.J.; Levitus, G.; Kerner, N.; Lafon, S.; Schijman, A.; Levy-Yeyati, P.; Finkielstein, C.; Chiale, P.; Schejtman, D. and Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1990) Autoantibodies in Chagas' heart disease: possible markers of severe Chagas' heart complaint. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 85, 539-543.
- Levitus, G.; Hontebeyrie-Joskowicz, M.; Van Regenmortel, M.H. and Levin, M.J. (1991) Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clin. Exp. Immunol.* 85, 413-417.
- Luquetti, A. and Rassi, A. (2000) Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Brener, Z.; Andrade, Z.A. and Barral-Neto, M. (eds) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 345-378.
- MacDaniel, J.P. and Dvorak, J.A. (1993) Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57, 213-222.
- Macedo, A.M.; Vallejo, G.A.; Chiari, E.; Galvão, L.M.C. & Pena, S.D.J. (1995) Hipervariable DNA markers in profiling genetic relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90 (Suppl. I), 47-48.
- Macina, R.A.; Affranchino, J.L.; Pollevick, G.D.; Jazin, E.E. and Frasch, A.C. (1989) Variable number of repeat units genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. *FEBS Lett.* 257, 365-368.
- Marchuck, D.; Drumm, M.; Saulino, A. and Collins, F.S. (1991) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 19, 1154.

- Mattern, T.; Thanhauser, A.; Reiling, N.; Toellner, K.M.; Duchrow, M.; Kusumoto, S.; Rietschel, E.T.; Ernst, M.; Brade, H.; Flad H.D. *et al.* (1994) Endotoxin and lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes. *J. Immunol.* 153, 2996-3004.
- Morgan, J.; Dias, J.C.; Gontijo, E.D.; Bahia-Oliveira, L.; Correa-Oliveira, R.; Colley, D.G. and Powell, M.R. (1996) Anti- *Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 355-359.
- Morrison, D.C. and Jacobs, D.M. (1976) Binding of polymixin B to the lipid portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry.* 13, 813-818.
- Moser, D.R.; Kirchhoff, L.V. and Donelson, J. E. (1989) Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1477-1482.
- Mosier, D. and Subbarao, B. (1982) *Immunology Today* 3, 217-219.
- Muniz, J. and Freitas, G. (1944) Contribuição para o diagnóstico da Doença de Chagas pelas reações de imunidade. I. Estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação de complemento. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 41, 303-333.
- Nahm M.H.; Scott M.G. and Shackelford P.G. (1987) Expression of human IgG subclasses. *Ann .Clin. Lab. Sci.* 17, 183-196.
- Neal, R.A. and Miles, R.A. (1970) Indirect haemagglutination test for Chagas' disease, with a simple method for survey work. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 12, 325-332.
- Neu, N.; Beisel, K.W.; Traystman, M.D.; Rose, N.R. and Craig, S.W. (1987) Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to Cocksackievirus B3-induced myocarditis. *J. Immunol.* 138, 2488-2492.
- Nussenzweig, V. and Nussenzweig, R.S. (1986) Development of a sporozoite malaria vaccine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 678-688.
- Nussenzweig, V. and Nussenzweig, R.S. (1985) Circumsporozoite proteins of malaria parasites. *Cell* 42, 401-403.
- O' Hern, P.A. 1991. Immunogenicity of peptides having pre-determined alpha-helical and alpha-alpha fold topologies. *Mol. Immunol.* 28, 1047-1053.
- Olerup, O. and Zetterquist, H. (1992) HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39, 225-235.

- Pan, A.A.; Rosenberg, G.B.; Hurley, M.K.; Schock, G.J.; Chu, V.P. and Ayappa, A. (1992) Clinical evaluation of an EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease). J. Infect. Dis. 165, 585-588.
- Pastini, A.C.; Iglesias, S.R.; Carricarte, V.C.; Guerin, M.E.; Sanchez, D.O. and Frasch, A.C. (1994) Immunoassay with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens potentially useful for screening donated blood and diagnosing Chagas' disease. Clin. Chem. 40, 1893-1897.
- Peralta, J. M., Teixeira, M. G. M., Shreffler, W. G., Pereira, J. B., Burns, J. M., Sleath, P. R. and Reed, S. G. (1994) Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. J. Clin. Microbiol. 32, 971-974.
- Perlmutter, R.M.; Hansburg, D.; Briles, D.E.; Nicolotti, R.A. and Davie, J.M. (1978) Subclass restriction of murine anti-carbohydrate antibodies. J. Immunol. 121, 566-572.
- Powell, M.R. and Wassom, D.L. (1993) Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. I. Antibody isotype profiles. Parasite Immunol. 15, 215-221.
- Rabello, A.; Luquetti, A.O.; Moreira, E.F.; Gadelha, M.F.; Santos, J.A.; Melo, L. and Schwind, P. (1999) Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection using the new particle gel immunoassay - ID-PaGIA Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94, 77-82.
- Reed, S. (1996) Compounds and methods for the detection of *T. cruzi* infection. Patent application WO 96/29605.
- Reis, G.A. and Lopes, M.F. (2000) A resposta imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais. In: Brener, Z.; Andrade, Z.A. and Barral-Neto, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 153-169.
- Rezende, J.M. (1997) O aparelho digestivo na doença de Chagas: aspectos clínicos. Em: Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Dias, J.C.P., Coura (eds). Rio de Janeiro: FIOCRUZ Editora, pp.293-296.
- Ruiz, R.C.; Rigone, V.L.; Gonzales, J. And Yoshida, N. (1993) Parasite Immunol. (Oxf) 15, 121-125.
- Russomando, G.; Figueredo, A.; Almiron, M.; Sakamoto, M. and Morita, K. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. (1992) J. Clin. Microbiol. 30, 2864-2868.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-491.

- Sambrook, J.; Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual - 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press NY, USA.
- Sanger, F.; Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74; 5463-5467.
- Sarvas, H.O.; Aaltonen, L.M.; Péterfy, F.; Seppälä, I.J.T. and Mäkelä, O. (1983) IgG subclass distributions in anti-hapten and anti-polysaccharide antibodies induced by haptenated polysaccharides. Eur. J. Immunol. 13; 409-414.
- Scharfstein, J.; Luquetti, A.; Murta, A.C.; Senna, M.; Rezende, J.M.; Rassi, A. and Mendonça-Previato, L. (1985) Chagas' disease: serodiagnosis with purified Gp25 antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34, 1153-1160.
- Scherf, A.; Mattei, D. and Schreiber, M. (1990) Parasite antigens expressed in *Escherichia coli*. A refined approach for epidemiological analysis. J. Immunol. Methods 128, 81-87.
- Schmunis, G.A. (1991) *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. Transfusion 31, 547-557.
- Schofield, L. (1991) On the function of repetitive domains in protein antigens of *Plasmodium* and other eukariotic parasites. Parasitol. Today 7, 99-105.
- Schofield, L. and Uadia P. (1990) Lack of Ir gene control in the immune response to malaria. I. A thymus-independent antibody response to the repetitive surface protein of sporozoites. J. Immunol. 144, 2781-2788.
- Scott, M.T. and Goss-Sampson, M. (1984) Restricted IgG isotype profiles in *T. cruzi* infected mice and Chagas' disease patients. Clin. exp. Immunol. 58, 372-379.
- Short, J.M.; Fernandez, J.M.; Sorge, J.A. and Huse, W.D. (1988) Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. Nucleic Acids Res. 16, 7583-7600.
- Simpson, L. (1987) The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. Annu. Rev. Microbiol. 41, 363-382.
- Sönnichsen, F.D.; Van Eyk, J.E.; Hodges, R.S. and Sykes, B.D. (1992) Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide. Biochemistry 31, 8790-8798.
- Souto, R.P. (1996) Amplificação de um domínio divergente do rRNA para detecção específica e análise filogenética do *Trypanosoma cruzi*. Tese de doutoramento IQ-USP.
- Souto, R.P. and Zingales, B. (1993) Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. Mol. Biochem. Parasitol. 62, 45-52.

- Souto, R.P.; Fernandes, O.; Macedo, A.M.; Campbell, D.A. and Zingales, B. (1996) DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 20, 141-152.
- Steers, E.Jr.; Cuatrecasas, P. and Pollard, H.B. (1971) The purification of beta-galactosidase from *Escherichia coli* by affinity chromatography. J. Biol. Chem. 246, 196-200.
- Stolf, A.M.S. (1992) Serological diagnosis - *Trypanosoma cruzi* antigens in serodiagnosis. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E. and Rassi, A. Chagas' disease (American Trypanosomiasis), its impact on Transfusion and Clinical medicine. São Paulo: ISTB, pp. 195-205.
- Sturm, N.R.; Degraeve, W.; Morel, C. and Simpson, L. (1989) Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. Mol. Biochem. Parasitol. 15, 205-214.
- Tanowitz, H.B., Kirchhoff, L.V., Simon, D., Morris, S.A., Weiss, L.M. and Wittner, M. (1992) "Chagas' Disease". Clin. Microbiol. Rev. 5, 400-419.
- Tibayrenc, M. (1995) Population genetics of parasitic protozoa and others microorganisms. Adv. in Parasitol. 36, 47-115.
- Tibayrenc, M. and Ayala F.J. (1991) Towards a populations genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. Parasitol. Today, 7, 228-232.
- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A., Ayala, F.J. (1986) Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 115-119.
- Towbin, H.; Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.
- Trujillo, C.; Ramirez, R.; Velez, I.D. and Berberich, C. (1999) The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with *American leishmaniasis* and Chagas' disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. Immunol. Lett. 70, 203-209.
- Tsai C.M. and Frasch C.E. (1982) A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 119, 115-119.
- Umezawa, E.S.; Bastos, S.F.; Camargo, M.E.; Yamauchi, L.M.; Santos, M.R.; Gonzalez, A.; Zingales, B.; Levin, M.J.; Sousa, O.; Rangel-Aldao, R. and da Silveira, J.F. (1999) Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and

- Central America. J Clin Microbiol. 37, 1554-1560.
- Vallejo, G.A.; Guhl, F.; Chiari, E. and Macedo A.M. (1999) Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta Trop. 15, 203-212.
- Vergara, U.; Lorca, M.; Veloso, C.; Gonzalez, A.; Engstrom, A.; Aslund, L.; Pettersson, U. and Frasch A.C. (1991) Assay for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies in human sera based on reaction with synthetic peptides. J. Clin. Microbiol. 29, 2034-2037.
- Vergara, U.; Veloso, C.; Gonzalez, A. and Lorca, M. (1992) Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas' disease using synthetic peptides. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46, 39-43.
- Wagner, L.A.; Weiss, R.B.; Driscoll, R.; Dunn, D.S. and Gesteland, R.F. (1990) Transcriptional slippage occurs during elongation at runs of adenine or thymine in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 18, 3529-3535.
- WHO - World Health Organization (1997) Chagas' disease. Interruption of transmission. Weekly Epidemiol. Rec. 72, 1-5.
- WHO (1991) Control of Chagas' disease. Report of a WHO Expert Committee. Geneva. WHO Technical Report Series 811, 1-95.
- Widhe, M.; Ekerfelt, C.; Forsberg, P.; Bergstrom, S. and Ernerudh, J. (1998) IgG subclasses in Lyme borreliosis: a study of specific IgG subclass distribution in an interferon-gamma-predominated disease. Scand. J. Immunol. 47, 575-581.
- Wishart, D.S., Sykes, B.D. and Richards, F.M. (1992) The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. Biochemistry 31, 1647-1651.
- Yanisch-Perron, C.; Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119.
- Zingales, B.; Souto, R.P.; Mangia, R.H.; Lisboa, C.V.; Campbell, D.A.; Coura, J.R.; Jansen, A. and Fernandes, O. (1998) Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. Int. J. Parasitol. 28, 105-112.

OBSERVAÇÃO

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