



Laboratório de
PROTOZOOLOGIA
UFSC

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

**Caracterização de uma proteína tirosina fosfatase de
Trypanosoma rangeli (TrPTP2)**

ELISA BEATRIZ PRESTES

Florianópolis – SC

Julho de 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

Caracterização de uma proteína tirosina fosfatase de
***Trypanosoma rangeli* (TrPTP2)**

Trabalho apresentado para o cumprimento da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II (BIO 7016), como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Catarina.

Acadêmica: Elisa Beatriz Prestes

Orientadores:

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Dra. Thaís Cristine Marques Sincero

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COORDENADORIA DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BIO-5156 / ESTÁGIO II

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

1. ESTAGIÁRIO(A)

Nome: **Elisa Beatriz Prestes**

Número de Matrícula: **06128035**

2. ESTÁGIO

Título do Trabalho: **CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE DE *Trypanosoma rangeli* (TrPTP2)**

Orientador(a): **Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard**

Co-Orientador(a): **Dra. Thaís Cristine Marques Sincero**

Período do Estágio: **01/03/2010 a 09/07/2010**

Local da apresentação do Trabalho: **Sala MIP 008**

3. AVALIAÇÃO

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: **Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard**

Nota: 10,0

Membro Titular: **Prof. Dr. Luiz Claudio Milette**

Nota: 9,5

Membro Titular: **Dra. Patricia Hermes Stoco**

Nota: 10

Membro Suplente: **Lucas de Lima Nogueira, MSc.**

Nota: 10

MÉDIA FINAL: 10,0 (DEZ)

Florianópolis, 07 de julho de 2010.



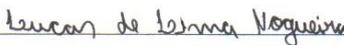
PRESIDENTE DA BANCA



MEMBRO TITULAR



MEMBRO TITULAR



MEMBRO SUPLENTE

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Edmundo Carlos Grisard, pela oportunidade de estagiar no laboratório e, principalmente, pelos ensinamentos. Obrigada pelas boas conversas, por sempre ressaltar a importância do critério científico e do senso crítico, assim como da boa convivência em laboratório. Certamente todos esses aspectos foram essenciais para minha formação profissional e pessoal.

À Thaís, minha orientadora, pela amizade e participação em minha formação nesses quase quatro anos de laboratório, especialmente no início, ensinando-me critério, paciência e, não poderia esquecer, contos de concentração e volume de soluções.

À minha também orientadora Pati, pela preciosa e imprescindível contribuição neste trabalho, cuja realização se deve, em muito, às suas inteligentes sugestões e estratégias. Obrigada por todos os ensinamentos, dicas, “enjambrações” e, principalmente, pelo exemplo.

Aos meus pais, Newton e Rejane, por todo o incentivo, amor e orientação nos momentos de importantes decisões em toda a minha vida. Faltam-me palavras para agradecer o apoio e a admirável dedicação de vocês para que algum dia eu pudesse alcançar e concluir mais essa etapa.

À minha querida irmã Isabel, por toda a alegria e carinho. Pelas sempre divertidas conversas e risadas, mesmo após cansativos dias de estudo e trabalho.

Ao meu namorado Guilherme, por todo o amor, compreensão e pelas valiosas reflexões, presentes em cada conversa e, especialmente, em cada maravilhoso encontro. Obrigada por estar sempre próximo, mesmo a tantos quilômetros de distância.

Ao pessoal do laboratório, Pati, Débora, Aline, Glauber, Mayara, Laís, Carol, Ninna, Thaynara e Darlene, por toda a amizade e ajuda, em tantos momentos. Pelas divertidas conversas, períodos de descontração e, sobretudo, pela ótima convivência todos os dias. Obrigada por sempre tornarem o ambiente laboratorial um local de trabalho alegre e motivador.

Aos meus amigos da Biologia, Ninna, Gabi, Ciça, Luiz, Márcio e Fred, pelos incontáveis cafés e boas conversas. Obrigada por compartilharem os momentos de correria, com provas, trabalhos e experimentos, e os momentos de alegria quando isso tudo passava.

Aos professores e a todo o pessoal do Laboratório de Protozoologia, tanto os integrantes atuais como os que passaram por lá nesses últimos quatro anos, e dos demais

laboratórios, LIDI, LIA e LVA. Agradeço pelo apoio, pela ajuda e pelo companheirismo.

À banca avaliadora deste trabalho, pela disposição e aceite do convite.

Ao CNPq e à FINEP, pelo incentivo financeiro.

Meus agradecimentos a todos vocês que, de alguma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho e para minha formação neste período.

RESUMO

Proteínas tirosina fosfatases (PTP) são enzimas responsáveis pela desfosforilação de resíduos de fosfotirosina cujo papel é essencial no controle de processos como a divisão e a diferenciação celular. Uma vez que estão associadas às distintas etapas do ciclo biológico de tripanosomatídeos e possuem baixa similaridade com PTP humanas, essas proteínas são promissores alvos para o desenvolvimento de medicamentos. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os níveis e os sítios de expressão da PTP de *Trypanosoma rangeli* (*TrPTP2*). Para tanto, o gene da *TrPTP2*, cujo quadro aberto de leitura possui 987pb e prediz uma proteína de 328 aminoácidos (36kDa), foi amplificado via PCR, clonado e expresso em *Escherichia coli* utilizando-se o vetor pET-14b. A *TrPTP2* recombinante foi purificada e usada para produção de antissoros, os quais foram utilizados em ensaios de *Western blot* e imunofluorescência indireta. Os ensaios de *Western blot* revelaram uma banda de aproximadamente 60kDa no extrato protéico total de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*, sendo a massa molecular observada superior à massa esperada possivelmente devido aos sítios para glicosilação observados na sequência aminoacídica deduzida. Ensaios de imunofluorescência apontaram um padrão de localização celular para a *TrPTP2* distinto entre as formas epimastigotas e tripomastigotas, estando difusa pela membrana do corpo celular nas primeiras e concentrada na membrana flagelar das formas infectantes.

Palavras-chave: Proteína tirosina fosfatase, *Trypanosoma rangeli*, diferenciação celular.

ABSTRACT

Protein tyrosine phosphatases (PTP) are responsible for dephosphorylation of phosphotyrosine residues and play an essential role in the control of processes such as cellular division and differentiation. Due to their association with different stages in the trypanosomatids life cycle and their low homology to human PTP, these proteins are potential pharmacological targets. In this context, the objective of this work was to evaluate the level and sites of expression of a *Trypanosoma rangeli* PTP (*Tr*PTP2). The *Tr*PTP2 gene, which open reading frame of 987bp predicts a 328 amino acid protein (36kDa), was amplified through PCR, cloned, and expressed in *Escherichia coli* using a pET-14b vector system. The recombinant *Tr*PTP2 was purified and used for antiserum production aiming to Western blot and immunofluorescence analyses. Western blot assays revealed an approximately 60kDa protein in the total protein extract of *T. rangeli* epimastigote and trypomastigote forms. This molecular mass is higher than the expected for *Tr*PTP2, possibly due to glycosylation sites observed in its deduced aminoacidic sequence. Immunofluorescence assays indicated a different cellular localization pattern for *Tr*PTP2 between *T. rangeli* epimastigotes and trypomastigotes, being spread throughout the cellular membrane in epimastigote forms and concentrated at the flagellar membrane in the infective forms.

Key words: Protein tyrosine phosphatase, *Trypanosoma rangeli*, cell differentiation.

LISTA DE ABREVIATURAS

μg – micrograma
 μl – microlitro
 μm – micrômetro
AMP – adenosina monofosfato
BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*
BSA – soro albumina bovina (do inglês *Bovine Serum Albumin*)
 $^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius
cm – centímetro
Da – Dalton
DAPI – 4'-6'-diamidino-2-fenilindol
DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA – ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)
dNTP – desoxinucleotídeo trifosfatado (do inglês *Deoxynucleotide Triphosphate*)
EDTA – ácido etilendiaminotetracético
 g – força da gravidade
 g – grama
GPI – glicosilfosfatidilinositol
IgG – imunoglobulina G
IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa – kilodalton
KV – kilovolt
LB – meio Luria-Bertani
LIT – do inglês *Liver Infusion Tryptose*
M – molar
mA – miliampere
mg – miligrama
ml – mililitro
mM – milimolar
mRNA – RNA mensageiro
NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*
ng – nanograma
nm – nanômetro
NP-40 – Nonidet 40, nonil fenoxi polietoxietanol
ORF – quadro aberto de leitura (do inglês *Open Reading Frame*)
pb – pares de bases
PBS – tampão salina fosfato, pH 7,4 (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)
PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)
pH – potencial hidrogeniônico
pmol – picomol
PVDF – fluoreto de polivinilideno (do inglês *Polyvinylidene Fluoride*)
RNA – ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic Acid*)
RNAi – RNA de interferência
SBF – soro bovino fetal
SDS-PAGE – do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
U – unidade
V – Volt
X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
W – Watt

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	<i>Trypanosoma rangeli</i>	1
1.2	Proteínas tirosina fosfatases.....	5
1.2.1	Características gerais.....	5
1.2.2	PTP em tripanosomatídeos.....	7
2	OBJETIVOS.....	11
2.1	Objetivo Geral.....	11
2.2	Objetivos Específicos.....	11
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1	Parasitas.....	12
3.1.1	Cultivo.....	12
3.1.2	Diferenciação <i>in vitro</i> para obtenção das formas tripomastigotas.....	13
3.2	Obtenção do gene da <i>TrPTP2</i> e ligação no vetor de expressão.....	13
3.2.1	Extração de DNA genômico.....	13
3.2.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	13
3.2.3	Clonagem.....	14
3.2.4	Extração dos plasmídeos e digestão com enzimas de restrição.....	15
3.2.5	Subclonagem em vetor de expressão.....	15
3.3	Análise da <i>TrPTP2</i> no vetor de expressão.....	15
3.3.1	Sequenciamento do inserto.....	15
3.3.2	Análise da sequência.....	16
3.4	Expressão heteróloga e purificação da <i>TrPTP2</i>	16
3.4.1	Indução e detecção da expressão.....	16
3.4.2	Purificação da proteína recombinante.....	17
3.5	Obtenção de soro policlonal dirigido à <i>TrPTP2</i>	18
3.5.1	Animais e aspectos éticos.....	18
3.5.2	Imunização dos camundongos e obtenção do antissoro.....	18
3.6	Avaliação da expressão de proteínas tirosina fosfatase por <i>Western blot</i>	19
3.7	Citocalização por ensaios de imunofluorescência.....	20
4	RESULTADOS.....	22
4.1	Amplificação do gene e análise da sequência da <i>TrPTP2</i>	22
4.2	Expressão heteróloga e purificação da <i>TrPTP2</i> recombinante.....	25
4.3	Avaliação da expressão da <i>TrPTP2</i> por <i>Western blot</i>	28
4.4	Localização celular da <i>TrPTP2</i> por imunofluorescência.....	29
5	DISCUSSÃO.....	32
6	CONCLUSÕES.....	41
7	PERSPECTIVAS.....	42
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
9	APÊNDICES.....	48
9.1	Apêndice 1.....	49
9.2	Apêndice 2.....	50
9.3	Apêndice 3.....	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma rangeli*

O *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* (Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae) é um protozoário hemoflagelado de ciclo heteroxênico, capaz de infectar insetos triatomíneos, mamíferos silvestres e domésticos, assim como seres humanos (GRISARD *et al.*, 1999). O *T. rangeli* apresenta duas formas biológicas bem definidas no seu ciclo de vida: a forma epimastigota proliferativa com 45 a 56 μm de comprimento, incluindo o flagelo livre, e a forma tripomastigota infectante (**Figura 1**), a qual é delgada e possui comprimento de 26 a 35 μm (CUBA CUBA, 1998).



Figura 1. Microfotografia de formas tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli*, coradas por Giemsa, em sangue de camundongo experimentalmente infectado. Aumento de 1.000 vezes. Fonte: STOCO, 2010.

Aspectos epidemiológicos, filogenéticos e morfológicos desse parasito o tornam estreitamente relacionado ao *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Além da distribuição geográfica pelas Américas Central e do Sul (**Figura 2**), o *T. rangeli* compartilha com o *T. cruzi* aproximadamente 60% de sua constituição antigênica solúvel, o que gera uma reatividade imunológica cruzada (AFCHAIN *et al.*, 1979).

Entretanto, ao contrário do *T. cruzi*, o *T. rangeli* não é considerado patogênico para o hospedeiro mamífero. Permanece controversa sua multiplicação intracelular nesse hospedeiro, ainda que extensivas análises histopatológicas em camundongos infectados com *T. rangeli* não tenham revelado evidências desse tipo de comportamento (HERBIG-SANDREUTER, 1955). O *T. rangeli* apresenta uma parasitemia normalmente baixa e de curta duração, porém, estudos como o de Urdaneta-Morales e Tejero (1985) mostram que em camundongos há níveis de parasitemia até sete vezes maiores que o inóculo original de parasitos, sugerindo que o *T. rangeli* também se multiplica nesse hospedeiro.



Figura 2. Distribuição geográfica nas Américas Central e do Sul da doença de Chagas (região sombreada) e pontos de ocorrência comprovada do *Trypanosoma rangeli* (●). Fonte: GRISARD; STEINDEL, 2005.

O ciclo de vida do *T. rangeli*, ainda que pouco conhecido no hospedeiro vertebrado, é bem descrito no hospedeiro invertebrado e envolve distintas fases com significativas diferenças morfológicas e funcionais. O inseto triatomíneo é infectado durante o repasto sanguíneo pelas formas tripomastigotas do *T. rangeli* presentes no sangue do hospedeiro vertebrado. No trato digestivo do triatomíneo, os parasitos diferenciam-se em formas epimastigotas e, aderindo ao epitélio do intestino médio, o atravessam e alcançam a hemocele. Na hemolinfa, os epimastigotas multiplicam-se livremente e, então, migram para a glândula salivar do inseto, invadindo-a e diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicos. Essas formas do parasito são infectantes e, através da via inoculativa, são transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (**Figura 3**). Alguns estudos em laboratório ainda demonstram que é possível infectar camundongos com as fezes do triatomíneo (GRISARD; STEINDEL, 2005).

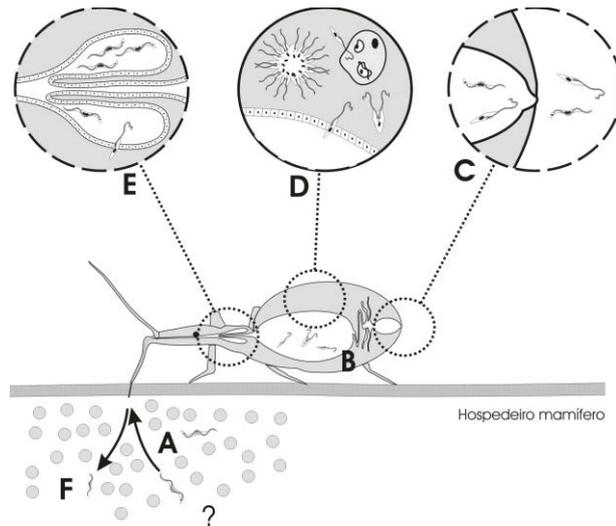


Figura 3. Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. (A) Ingestão das formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo do triatomíneo; (B) Formas epimastigotas no trato intestinal do triatomíneo; (C) Parasitos alcançando a ampola retal, onde alguns se diferenciam em tripomastigotas e podem ser excretados junto a fezes e urina; (D) Adesão de epimastigotas ao epitélio intestinal e passagem para a hemocele, onde ocorre sua multiplicação; (E) Invasão pelos parasitos das glândulas salivares e diferenciação para formas infectantes (tripomastigotas metacíclicas), as quais são inoculadas com a saliva durante o repasto sanguíneo (F). Fonte: GRISARD; STEINDEL, 2005.

As espécies de triatomíneo normalmente infectadas pelo *T. rangeli* pertencem ao gênero *Rhodnius*. Entretanto, a susceptibilidade e o nível de infecção varia conforme a espécie do triatomíneo e a cepa do parasito, já tendo sido descrita uma grande relação de cada espécie do inseto com as cepas do parasito que ocorrem na mesma região geográfica (GUHL; VALLEJO, 2003).

Sendo assim, provavelmente por terem co-evoluído com distintas linhagens de vetores do gênero *Rhodnius* na América Latina, as cepas de *T. rangeli* podem ser divididas em duas linhagens que apresentam alta divergência genética entre si (CUERVO; LOPEZ; PUERTA, 2006). Essas duas linhagens são denominadas KP1(+) e KP1(-), de acordo com a presença ou ausência de uma região conservada nos minicírculos, que consistem em arranjos circulares concatenados de DNA presentes no cinetoplasto, região terminal da única mitocôndria encontrada nos parasitos da Ordem Kinetoplastida (GUHL; VALLEJO, 2003).

A linhagem KP1(+) possui três tipos de minicírculos, denominados KP1, KP2 e KP3, e infecta as glândulas salivares de triatomíneos do Grupo Prolixus, que inclui *R.*

prolixus e *R. neglectus*. Em contrapartida, a linhagem KP1(-) possui apenas os minicírculos do tipo KP2 e KP3, alcançando as glândulas salivares de triatomíneos do Grupo Pallescens, que inclui *R. pallescens*, *R. colombiensis* e *R. ecuadoriensis* (VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009).

O processo de diferenciação celular que ocorre nas glândulas salivares do triatomíneo é denominado metaciclologênese e constitui uma etapa essencial do ciclo de vida do *T. rangeli*. A metaciclologênese envolve mudanças coordenadas no metabolismo e na morfologia do parasito para que formas epimastigotas, proliferativas e não infectantes, tornem-se formas infectantes incapazes de se multiplicar, os tripomastigotas metacíclicos (STOCO, 2010). Essa mudança de forma, acompanhada pela ativação ou repressão de vias metabólicas e por alterações ultraestruturais correlatas (VICKERMAN, 1985), está associada a características biológicas intrínsecas do parasito bem como a modificações físico-químicas de seu ambiente.

Entre os diversos fatores capazes de estimular a diferenciação celular em tripanosomatídeos está a adesão das formas epimastigotas a um substrato. Em *T. cruzi* foi demonstrado que, tanto *in vivo* como *in vitro*, as formas epimastigotas aderem-se ao substrato e, uma vez que o processo de metaciclologênese esteja completo, as formas tripomastigotas são liberadas para o meio (BONALDO *et al.*, 1988).

De forma similar, a adesão a um substrato é imprescindível para a diferenciação celular em *T. rangeli*. Quando os parasitos provenientes da hemocele do triatomíneo alcançam o lúmen das glândulas salivares, eles ficam aderidos às microvilosidades celulares da glândula como epimastigotas. Uma vez que na saliva do inseto são encontradas apenas formas tripomastigotas, tudo indica que a metaciclologênese tem início em formas epimastigotas e intermediárias aderidas (MEIRELLES *et al.*, 2005).

A adesão de tripanosomatídeos a um substrato é mediada pelo flagelo, tendo os mecanismos dessa adesão já sido descritos para *T. brucei* (ERSFELD; GULL, 2001) e para *T. cruzi* (FERREIRA *et al.*, 2008). Em *T. brucei*, o flagelo forma elaboradas protuberâncias de membrana e citoesqueleto que passam através dos espaços entre as microvilosidades do epitélio da glândula salivar do hospedeiro invertebrado (RALSTON *et al.*, 2009). Durante o processo de diferenciação das formas epimastigotas para as formas tripomastigotas metacíclicas, a membrana flagelar permanece conectada à superfície epitelial através de estruturas semelhantes a desmossomos (ERSFELD; GULL, 2001). Assim, a membrana flagelar representa uma interface entre o parasito e seus hospedeiros considerada essencial para o cumprimento de seu ciclo biológico. Estudos

realizados por Ferreira e colaboradores (2008) mostraram que a metaciclo gênese em *T. cruzi* envolve movimentos ativos do cinetoplasto, estrutura também associada ao flagelo.

Para que a adesão flagelar ao epitélio do hospedeiro seja possível, bem como para que as demais alterações fisiológicas e morfológicas possam acontecer, durante a diferenciação celular ocorrem modificações no perfil de expressão gênica dos tripanosomatídeos. Ao contrário do que ocorre durante a divisão celular, durante a diferenciação em *T. cruzi* a atividade transcricional permanece inalterada, desaparecendo apenas quando são formadas as formas tripomastigotas metacíclicas (FERREIRA *et al.*, 2008). A manutenção da taxa de transcrição provavelmente é necessária para alterar o repertório protéico do parasito e possibilitar a intensa remodelação celular que ocorre durante a metaciclo gênese.

1.2 Proteínas tirosina fosfatases

1.2.1 Características gerais

As fosfatases constituem uma extensa família de proteínas responsáveis pela regulação de inúmeros processos celulares como sinalizações metabólicas, comunicação, crescimento e proliferação celular (BRENCHLEY *et al.*, 2007). De acordo com sua função, estrutura, sequência e especificidade, essas enzimas podem ser subdivididas em dois grandes grupos: proteínas serina/treonina fosfatases (STP), que desfosforilam resíduos de fosfoserina e fosfotreonina; e proteínas tirosina fosfatases (PTP), que catalisam a desfosforilação de resíduos de fosfotirosina. Existem ainda fosfatases cuja especificidade é dual (DSP), sendo enzimas capazes de hidrolisar tanto fosfoserina/treonina como fosfotirosina (ALONSO *et al.*, 2004). Por possuírem sítio ativo e mecanismo de ação muito semelhante ao das PTP, as DSP normalmente são classificadas como uma subfamília dessas.

Juntamente às tirosina quinases (PTK), as PTP integram um dos principais mecanismos biológicos para a regulação de respostas adaptativas a sinais intra e extracelulares, que consiste no equilíbrio entre a fosforilação e a desfosforilação de proteínas. Estima-se que cerca de 30% das proteínas possa ter sua atividade regulada através de fosforilação, embora poucas dessas sejam fosforiladas em resíduos de tirosina quando em comparação a resíduos de serina/treonina (HUNTER, 1995). Nessa pequena parcela encontram-se proteínas responsáveis pela regulação da divisão e diferenciação

celular, além do controle do metabolismo e da expressão gênica (AOYAMA *et al.*, 2003). Em humanos, o mau funcionamento das cadeias de fosforilação de tirosina está associado a desordens imunes (MATSUDA *et al.*, 1996), doenças neurodegenerativas (DING *et al.*, 2000), diabetes (AHMAD; GOLDSTEIN, 1995) e até mesmo a cânceres (LIEBOW *et al.*, 1989; GAITS *et al.*, 1994; FREISS; VIGNON, 1994).

Dessa forma, é preciso que as atividades de PTK e PTP estejam coordenadas na regulação de respostas a estímulos, tanto externos como internos. Sua função nesse processo é distinta, mas complementar; as quinases têm sido associadas ao controle da amplitude de uma resposta a um sinal, enquanto as fosfatases provavelmente têm um importante papel na regulação da intensidade e da duração dessa resposta (TONKS, 2006).

Inicialmente vistas como enzimas de atividade constitutiva, cada vez mais estudos têm demonstrado que as PTP são rigorosamente reguladas e que sua função é demandada de forma específica pelos diferentes compartimentos celulares (DEN HERTOOG *et al.*, 2008). De acordo com sua localização intracelular, as PTP são subdivididas em proteínas tirosina fosfatases receptoras (RPTP), com domínio transmembrana, e não-receptoras, dentre as quais se encontram as PTP citosólicas (ANDREEVA; KUTUZOV, 2008).

As RPTP e as PTP citosólicas diferem quanto a alguns domínios; entretanto, ambas conservam o motivo CX₅R característico da família das PTP. Esse motivo forma a alça de ligação ao fosfato – conhecida como *P-loop* – no sítio ativo das PTP, no qual a cisteína atua como um nucleófilo essencial para a catálise enquanto a arginina se liga ao fosfato (TABERNERO *et al.*, 2008). Assim, as PTP apresentam o mesmo mecanismo de ação, embora este seja aplicado por cada uma visando à realização de uma diferente tarefa.

A variedade de papéis atribuídos às PTP e sua ampla distribuição dentro da célula indicam uma necessidade de mecanismos regulatórios em equivalente diversidade. Muitas PTP são reguladas por modificações pós-traducionais covalentes como a fosforilação, a qual é capaz de modular a atividade catalítica de enzimas diretamente por mecanismos alostéricos ou por fornecer sítios de ligação para outras proteínas. Algumas PTP podem mesmo ser fosforiladas em resíduos de tirosina, sugerindo a existência de processos autorregulatórios ou mesmo de retroalimentação (DEN HERTOOG *et al.*, 2008).

A regulação negativa de PTP através de oxidação reversível da cisteína catalítica é um mecanismo já bem estabelecido. A produção de elevadas quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), decorrente de certos estímulos, leva à oxidação e à inativação de PTP que normalmente atenuariam a resposta a esses estímulos. Contudo, a oxidação é transiente e as PTP retornam ao seu estado ativo após a ação de agentes redutores como tioredoxina ou glutathiona (TONKS, 2006).

Para proteínas transmembrana como as RPTP, um importante mecanismo regulatório é a dimerização. Dependendo da localização exata da cisteína catalítica, os dímeros de RPTP podem ser ativos ou inativos (DEN HERTOOG *et al.*, 2008). Alterações na conformação quaternária dos dímeros de RPTP podem ser desencadeadas por sinais extracelulares bem como intracelulares, sugerindo que as RPTP não só são capazes de promover mudanças catalíticas internas em resposta à ligação de moléculas extracelulares, como também podem modificar seus receptores externos em resposta a sinais intracelulares (DEN HERTOOG *et al.*, 2008).

1.2.2 PTP em tripanosomatídeos

O papel biológico das PTP em tripanosomatídeos começou a ser investigado no início da década de 1990, quando foi detectada uma regulação diferencial de proteínas contendo fosfotirosina durante o ciclo vital de *T. brucei* (PARSONS *et al.*, 1991). Esse resultado sugeriu que tanto PTP como PTK deveriam ter um importante papel na biologia desses eucariotos, abrindo espaço para as pesquisas subsequentes que detectaram atividade tirosina fosfatásica em *Leishmania donovani* (COOL; BLUM, 1993), em *L. major* (DELL; ENGEL, 1994), e em distintas fases do ciclo celular de *T. brucei* e *T. cruzi* (BAKALARA *et al.*, 1995). Em *T. rangeli*, os primeiros estudos só foram realizados na década seguinte, demonstrando que existem diferenças nos níveis de atividade tirosina fosfatásica entre as formas epimastigotas longas e curtas (GOMES *et al.*, 2006). Atualmente já há evidências suficientes para confirmar que a fosforilação reversível de proteínas é um evento relacionado a circunstâncias estágio-específicas e à modulação do ciclo celular em organismos da Ordem Kinetoplastida (BRENCHLEY *et al.*, 2007).

Os estudos que resultaram na pesquisa com a proteína tirosina fosfatase de *T. rangeli* (*TrPTP2*) tiveram início em 2005 com uma busca por fragmentos de cDNA semelhantes a PTP nesse parasito. A busca resultou na identificação de um fragmento

cuja sequência parcial apontou para certa variabilidade intraespecífica, o que forneceu justificativas para uma caracterização mais detalhada do gene da *TrPTP2* (BAYER-SANTOS, 2007).

Assim, a sequência completa do gene da *TrPTP2* foi obtida para 14 cepas de *T. rangeli*, isoladas de diferentes regiões da América Latina (BAYER-SANTOS, 2007). Esse estudo revelou que o gene da *TrPTP2*, aparentemente em cópia única no genoma do *T. rangeli*, possui uma janela aberta de leitura de 987pb e codifica uma proteína de 328 aminoácidos com aproximadamente 36kDa. Uma análise comparativa minuciosa revelou que existe variabilidade desse gene entre as cepas KP1(+) e KP1(-) de *T. rangeli* analisadas, o que o apontou como um eficiente marcador para diferenciação intraespecífica. A partir desses e outros resultados, a *TrPTP2* passou a figurar como uma proteína promissora para estudos.

O interesse em dar continuidade à pesquisa com a *TrPTP2* foi fortalecido quando Szöör e colaboradores (2006) descobriram que a PTP de *T. brucei* (*TbPTP1*) é uma das moléculas responsáveis por manter esse parasito estacionário na fase G1/G0 do ciclo celular. Esses autores, utilizando RNAi para o silenciamento do gene da *TbPTP1*, observaram que formas infectantes do parasito presentes na corrente sanguínea (tripomastigotas metacíclicas) se diferenciaram em formas presentes no inseto vetor (tripomastigotas procíclicas), mesmo quando as condições de cultivo propiciavam a existência de formas sanguíneas. Quanto à localização subcelular, a *TbPTP1* é encontrada predominantemente na fração do citoesqueleto de *T. brucei*, embora não se tenha detectado nenhuma associação com alguma estrutura específica, como o flagelo.

De acordo com Andreeva e Kutuzov (2008), o único tipo de PTP presente em protozoários é o tipo não-receptor, uma vez que as PTP de protozoários não têm domínios transmembrana. Entretanto, em *L. major* foi detectada uma PTP que se localiza na membrana de formas promastigotas metacíclicas, embora seja citoplasmática nas formas procíclicas (AGUIRRE-GARCÍA *et al.*, 2006). Além disso, alguns estudos já registraram a presença de fosfatases na superfície de protozoários parasitos como *Entamoeba histolytica* (AGUIRRE-GARCÍA *et al.*, 2003). Acredita-se que essas proteínas de superfície, denominadas ecto-fosfatases, sejam responsáveis pela desfosforilação de proteínas do hospedeiro e interfiram em suas vias de sinalização (ANDREEVA; KUTUZOV, 2008).

Estudos recentes têm investigado a atividade ecto-fosfatásica em *T. rangeli* e demonstrado sua importância para o ciclo desse parasito. Foi observado que a atividade

de ecto-fosfatases presentes na superfície externa de *T. rangeli* diminui durante a fase de crescimento do parasito, ao passo que a inibição dessas ecto-fosfatases impede sua proliferação (FONSECA-DE-SOUZA *et al.*, 2009). Além disso, as atividades ecto-fosfatásicas de *T. rangeli* são reversivelmente inibidas por peróxido de hidrogênio, que aparentemente é produzido pelo próprio parasito (COSENTINO-GOMES *et al.*, 2009). Outro fator importante na regulação das ecto-fosfatases é a concentração de fosfato inorgânico no meio de cultura, uma vez que diferenças nos seus níveis de atividade foram detectadas conforme essa concentração variou (DICK *et al.*, 2010). Embora esses estudos tenham analisado a atividade ecto-fosfatásica total, a especificidade dos inibidores utilizados sugere a existência tanto de STP como de PTP dentre as fosfatases de superfície.

A conclusão da análise do “Fosfatoma” das sequências do projeto *TriTryp*, realizada por Brenchley e colaboradores (2007), revelou que organismos da Ordem Kinetoplastida possuem em média 85 enzimas fosfatases, das quais a maioria encontra-se na subfamília das STP e das DSP. Dentre as descobertas mais surpreendentes desse estudo está o fato de apenas uma pequena percentagem das fosfatases desses organismos ser representada por enzimas PTP – 2,3% em *T. cruzi*, 2,6% em *T. brucei* e 3,4% em *Leishmania major* –, enquanto que em seres humanos e *Saccharomyces cerevisiae* a percentagem atinge 31% e 16%, respectivamente. Além disso, o baixo grau de homologia existente entre essas enzimas e as PTP humanas as aponta como potenciais alvos para a elaboração de fármacos seletivos que sejam capazes de inibir a transmissão e a infecção parasitária.

As avaliações interespecíficas realizadas através do alinhamento da sequência nucleotídica completa da PTP de *T. rangeli* com as respectivas sequências homólogas dos Kinetoplastida, disponíveis em bancos de dados do projeto *TriTryp*, revelaram uma identidade de 72% com *T. cruzi*, 58% com *T. brucei* e 36% com *L. major*. Além disso, segundo Andreeva e Kutuzov (2008), a proteína de *T. cruzi* mais semelhante à *TrPTP2*, denominada *TcPTP2*, encontra-se estreitamente relacionada à *TbPTP1* de *T. brucei* estudada por Szöör e colaboradores (2006), o que sugere a possibilidade de a *TrPTP2* possuir um papel equivalente a essa proteína em *T. rangeli* (**Figura 4**).

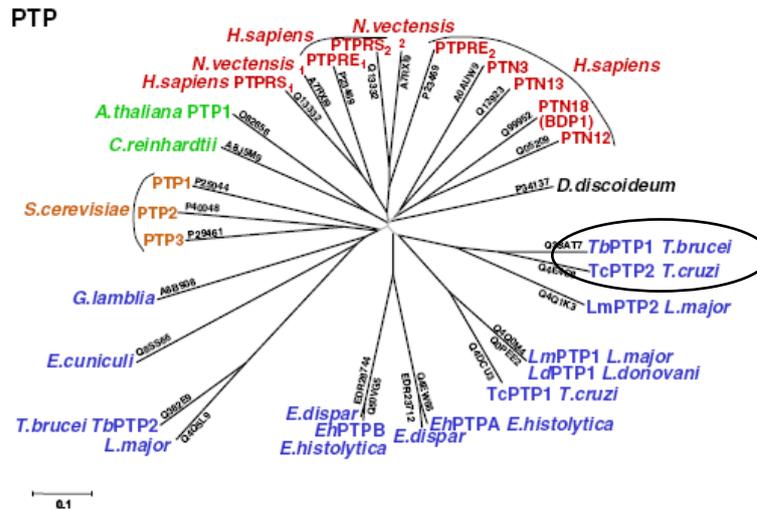


Figura 4. Árvore filogenética das proteínas tirosina fosfatases (PTP) que mostra, em azul, as sequências de protozoários. Os números de acesso UniProt (ou NCBI) são mostrados para cada sequência. Sequências representativas de animais (*Homo sapiens* e a anêmona do mar *Nematostella vectensis*), plantas (*Arabidopsis thaliana* e *Chlamydomonas reinhardtii*) e fungos (isoformas de *Saccharomyces cerevisiae*) foram também incluídas. Em destaque está o agrupamento que mostra a relação de proximidade entre a *TcPTP2* e a *TbPTP1*. Fonte: ANDREEVA; KUTUZOV, 2008.

Face à comprovada importância das PTP em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* e à existência de um gene homólogo em *T. rangeli*, o objetivo do presente estudo é expandir os conhecimentos acerca da *TrPTP2* visando compreender sua importância no contexto metabólico do parasito.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste estudo foi avaliar o nível de expressão da proteína tirosina fosfatase de *Trypanosoma rangeli* (*TrPTP2*) e sua localização celular nas diferentes formas biológicas deste parasito.

2.2 Objetivos Específicos

- Amplificar, clonar e sequenciar a janela aberta de leitura (ORF) do gene da *TrPTP2* da cepa Choachí de *T. rangeli*;
- Analisar a sequência aminoacídica predita quanto a parâmetros bioquímicos e modificações pós-traducionais;
- Expressar de forma heteróloga o gene da *TrPTP2* e purificar a proteína recombinante visando à produção de antissoro policlonal murino;
- Avaliar os níveis de expressão da *TrPTP2* em diferentes cepas e nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e em *T. cruzi*;
- Estudar a citolocalização da *TrPTP2* em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*, bem como em *T. cruzi*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Em síntese, a amplificação do gene da *TrPTP2* da cepa Choachí de *T. rangeli* foi realizada a partir de DNA genômico. Para tanto, o DNA dos parasitos foi extraído e submetido a uma reação de PCR para amplificação do gene da *TrPTP2*. O produto dessa reação foi clonado, sequenciado e, posteriormente, utilizado para inserção em vetor de expressão seguida de transformação em bactérias *Escherichia coli* competentes.

A proteína *TrPTP2* recombinante produzida heterologicamente em bactérias foi purificada através de eletroeluição e utilizada para imunização de camundongos, dos quais foi retirado o soro policlonal anti-*TrPTP2*. A expressão da *TrPTP2* e a reatividade do soro policlonal a essa proteína foram confirmadas através de ensaios de *Western blot*.

Simultaneamente, diferentes cepas e formas de *T. rangeli* e uma cepa de *T. cruzi* foram mantidas em cultura para obtenção de seu extrato protéico total, o qual foi utilizado para avaliação da expressão da *TrPTP2* através de ensaios de *Western blot*. A localização celular da *TrPTP2* foi inferida a partir de ensaios de imunofluorescência utilizando esses parasitos.

3.1 Parasitos

3.1.1 Cultivo

Foram utilizadas formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli*, isolada de glândulas salivares do hemíptero *R. prolixus* naturalmente infectado, capturado na Colômbia (SCHOTTELIUS, 1987). Os epimastigotas de *T. rangeli* foram cultivados a 27°C em meio LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (Cultilab, Campinas) e submetidos a repiques semanais.

Além da cepa Choachí, a cepa Y de *T. cruzi* (PEREIRA DA SILVA; NUSSENZWEIG, 1953) e outras cepas de *T. rangeli* foram mantidas nas mesmas condições para posterior obtenção do extrato protéico: a cepa B450, isolada de *Rhodnius* sp. no Brasil (ACOSTA SALGADO, 1988); a cepa H14, isolada de humanos em Honduras (ACOSTA SALGADO, 1988) e a cepa C23, isolada de *Aotus* sp. na Colômbia (ZUÑIGA *et al.*, 1997). Todas as cepas utilizadas encontram-se depositadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC).

3.1.2 Diferenciação *in vitro* para obtenção das formas tripomastigotas

Para obtenção de formas tripomastigotas de cultura de *T. rangeli*, os epimastigotas foram cultivados em meio LIT até atingir a fase exponencial de crescimento. Para a diferenciação, 12×10^7 epimastigotas foram lavados duas vezes com PBS (tampão salina fosfato) pH 7,4 e transferidos para garrafas de cultura celular de 25cm³ sem aeração, contendo 15 ml de meio DMEM pH 8,0 (Sigma-Aldrich, Saint Louis) suplementado com 5% de SBF, 1 g/l de glicose e 6 mM de L-glutamina. As culturas foram mantidas a 27°C por cerca de sete dias e a percentagem de tripomastigotas foi avaliada através de contagem e análise morfológica de 100 parasitos em lâmina corada com Giemsa (Merck, Darmstadt). A coleta dos parasitos por centrifugação ocorreu quando foram obtidas taxas iguais ou maiores que 85% de tripomastigotas.

3.2 Obtenção do gene da *Tr*PTP2 e ligação no vetor de expressão

3.2.1 Extração de DNA genômico

Para a extração do DNA genômico, uma cultura da cepa Choachí de *T. rangeli* em fase exponencial de crescimento foi tratada com tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0, 1% SDS), acrescido de proteinase K (100 µg/ml) por 12 horas a 42°C. As etapas subsequentes foram realizadas através do método de fenol-clorofórmio, de acordo com protocolo padrão (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

O DNA obtido foi dosado e avaliado quanto a sua pureza através de espectrofotometria em equipamento *BioPhotometer*[®] (Eppendorf, Hamburg), observando-se a absorbância a 260 e a 280 nm, além das relações 260/280 nm e 260/230 nm. As amostras extraídas foram também visualizadas em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (1 µg/ml) para comparação com padrões de DNA de concentração conhecida, sendo os resultados digitalmente registrados.

3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA genômico extraído foi utilizado como molde para amplificar a ORF do gene da proteína tirosina fosfatase de *T. rangeli* (*Tr*PTP2) através de PCR. Os iniciadores utilizados para a amplificação foram desenhados através do programa *Primer Select* do pacote DNASTAR[®] (Lasergene, Madison), a partir da sequência de mRNA da *Tr*PTP2. Essa sequência foi obtida por nosso grupo de pesquisa (GRISARD *et al.*, 2010) e encontra-se disponível sob o número de acesso EU325653 no GenBank

(www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). O par de iniciadores utilizado foi elaborado especialmente para a posterior inserção na fase correta de leitura do gene no vetor de expressão: ExTrPTP2-F (5' – CAT ATG GAC ACG CCC AGC ATG GTG AAG – 3') e ExTrPTP2-R (5' – CTC GAG TTA TCT CTG TGG CCT CCT TCC – 3'). Os códons sublinhados em cada um dos iniciadores representam os sítios de clivagem das enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, respectivamente.

A reação ocorreu na presença de 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase em seu tampão apropriado (Invitrogen, Carlsbad), 1,5 mM de MgCl₂, 2 mM de dNTP (Invitrogen, Carlsbad), 10 pmol de cada iniciador e 50 ng de DNA genômico da cepa Choachí de *T. rangeli*. Em cada conjunto de reação foi adicionado um controle negativo, composto de todos os reagentes necessários à amplificação, à exceção do DNA molde. A amplificação foi realizada em um termociclador *Mastercycler*[®] *Gradient* (Eppendorf, Hamburg), iniciando com uma etapa de desnaturação a 94°C por cinco minutos, seguida por 35 ciclos contendo uma etapa de desnaturação (94°C por 45 segundos), uma etapa de ligação dos iniciadores (63°C por 30 segundos) e uma etapa de alongação do DNA pela polimerase (72°C por um minuto). Ao término destes ciclos, as amostras foram submetidas a uma extensão final da cadeia de DNA a 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação da PCR foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, conforme o descrito no item 3.2.1.

3.2.3 Clonagem

O produto de PCR obtido foi inicialmente clonado utilizando-se o kit *pGEM-T easy*[®] *Vector* (Promega, Madison), segundo as especificações do fabricante. Os produtos de ligação foram então utilizados na transformação por eletroporação a 2,5 KV de células eletrocompetentes *Escherichia coli* DH5-*a* em aparelho *MicroPulser*[®] (BioRad, Richmond). A seleção dos clones recombinantes foi baseada na coloração azul/branco das colônias crescidas em meio LB (Luria Bertani) ágar suplementado com ampicilina (100 µg/ml), X-Gal (20 µg/ml) e isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 40 µg/ml. Dentre estes clones, a presença e o tamanho de inserto desejado foram verificados pela técnica de *toothpick* (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A confirmação de que o inserto se tratava do gene da *TrPTP2* foi realizada através de uma PCR diretamente das colônias selecionadas, utilizando os iniciadores ExTrPTP2-F e ExTrPTP2-R nas condições descritas anteriormente.

3.2.4 Extração dos plasmídeos e digestão com enzimas de restrição

Os clones contendo o gene da *TrPTP2* foram crescidos a 37°C sob agitação por 15 horas em 5 ml de meio LB contendo ampicilina (100 µg/ml). Decorrido o tempo de crescimento, os plasmídeos recombinantes foram extraídos através do procedimento padrão de lise alcalina, denominado *mini-prep*, conforme descrito por Sambrook e Russell (2001). O plasmídeo de expressão pET-14b (Merck, Darmstadt), contido em bactérias *E. coli* da cepa BL21(DE3), foi extraído através da mesma técnica.

O vetor pET-14b íntegro e o plasmídeo *pGEM-T easy*[®] contendo o inserto da *TrPTP2* foram submetidos à digestão simultânea com 100 U das enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (BioLabs, Ipswich), em tampão recomendado pelo fabricante, a 37°C por aproximadamente 12 horas. Concluída a digestão, os produtos foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%, sendo as bandas de interesse excisadas do gel e purificadas utilizando-se o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Buckinghamshire), de acordo com as especificações do fabricante.

3.2.5 Subclonagem em vetor de expressão

O gene da *TrPTP2* pôde ser inserido no vetor pET-14b devido às extremidades coesivas de ambas as sequências, decorrentes da digestão com as mesmas enzimas de restrição. A ligação ocorreu na presença de 3 U da enzima T4 ligase (BioLabs, Ipswich), no tampão do fabricante. Os produtos de ligação foram então utilizados na transformação de células eletrocompetentes *E. coli* BL21 (DE3), nas mesmas condições descritas no item 3.2.3. Novamente, a seleção dos clones recombinantes foi realizada através da técnica de *toothpick* e PCR diretamente das colônias, sendo posteriormente submetidos à extração do DNA plasmidial através de *mini-prep* (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

3.3 Análise da *TrPTP2* no vetor de expressão

3.3.1 Sequenciamento do inserto

Com o objetivo de confirmar a presença e a correta orientação do inserto *TrPTP2* no vetor de clonagem *pGEM-T easy*[®] e, posteriormente, no vetor de expressão pET-14b, cada inserto teve as duas fitas do DNA sequenciadas utilizando-se o kit *DYEnamic® ET Dye Terminator* (GE Healthcare, Buckinghamshire), conforme as instruções do fabricante, e a leitura das bases foi realizada em um equipamento *MegaBACE 1000® DNA Analysis System* (GE Healthcare, Buckinghamshire).

As reações de sequenciamento foram realizadas na presença de 5 pmol dos iniciadores T7-F (5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3') e T7-R (5' – GCT AGT TAT TGC TCA GCG G – 3'), dirigidos ao vetor, ou dos iniciadores ExTrPTP2-F e ExTrPTP2-R, dirigidos ao inserto, utilizando aproximadamente 800 ng do DNA plasmidial. As reações de sequenciamento contaram com as seguintes etapas: desnaturação inicial (95°C por 25 segundos), seguida de 35 ciclos com etapas de desnaturação (95°C por 15 segundos), ligação dos iniciadores (50°C por 20 segundos) e extensão da cadeia de DNA (60°C por 90 segundos). Os produtos dessas reações foram precipitados com isopropanol 70% para a retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados, sendo subsequentemente eletroinjetados a 2 KV por 120 segundos e eletroeluídos por 150 minutos a 9 KV.

3.3.2 Análise da sequência

A análise das sequências obtidas foi realizada com o apoio do Laboratório de Bioinformática (MIP/CCB/UFSC).

O agrupamento das sequências contíguas e a determinação de sua qualidade foram realizados utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* (<http://www.phrap.org>). A confirmação da identidade do fragmento obtido foi realizada através da ferramenta *blastx* (ALTSCHUL *et al.*, 1990) do programa BLAST disponível no GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A sequência de aminoácidos para as seis possíveis fases de leitura foi predita através do programa *Translate* do pacote ExPasy (www.expasy.org) e analisada quanto à presença da cauda de poli-histidina e à existência de códons de parada. Alinhamentos com as sequências de PTP de organismos filogeneticamente relacionados foram realizados através do programa *ClustalW*. Outros programas do pacote ExPasy, além do programa *BioEdit*[®], foram utilizados para a análise da sequência aminoacídica predita: *ProtParam*, para análise de parâmetros físico-químicos da proteína; *MotifScan*, para busca por motivos presentes na proteína; *TMpred*, *TMHMM* e *Split4*, para predição de domínio transmembrana; e *GPI-SOM* para predição de sítio para âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI).

3.4 Expressão heteróloga e purificação da TrPTP2

3.4.1 Indução e detecção da expressão

As células BL21 (DE3) contendo o inserto da TrPTP2 em plasmídeo pET-14b foram mantidas em meio LB ágar (100 µg/ml ampicilina). O primeiro passo para a

expressão da proteína recombinante foi crescer as bactérias BL21 (DE3) por 15 horas a 37°C sob agitação em 10 ml de meio LB (100 µg/ml ampicilina). Deste pré-inóculo, 2 ml foram adicionados a 30 ml do mesmo meio e o crescimento se deu a 37°C sob agitação, até que fosse atingida densidade óptica (D.O.)_{600nm} de 0,5 através de leitura espectrofotométrica em equipamento *BioPhotometer*[®] (Eppendorf, Hamburg). Encerrado o tempo de crescimento, 2 ml da cultura foram separados previamente à indução para servirem como controle não induzido e, aos 30 ml restantes, acrescentou-se IPTG em uma concentração final de 1 mM. Para determinar as melhores condições de expressão da *TrPTP2*, a indução da cultura de BL21(DE3) foi realizada em diferentes temperaturas (15°C, 27°C e 37°C) e diferentes tempos (três horas, 6 horas e 16 horas).

Após o término de cada crescimento, a cultura foi coletada por centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento eluído em 300 µl de Tris-HCl pH 7,4 na concentração de 20 mM.

O extrato protéico total bacteriano foi avaliado em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 12%. Para tanto, alíquotas contendo 5 µl do extrato preparado anteriormente foram misturadas a 5 µl de tampão de amostra SDS-PAGE (20% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 4,4% SDS e 2% β-mercaptoetanol). A amostra foi então submetida à desnaturação a 95°C por cinco minutos e, em seguida, à separação eletroforética em sistema *Mini-PROTEAN*[®] *Tetra Cell* (BioRad, Richmond) por cerca de uma hora à corrente fixa de 20 mA. Em cada gel foi também aplicado um padrão de tamanho molecular *Benchmark*[™] *Protein Ladder* (Invitrogen, Carlsbad) ou *Precision Plus Protein*[™] *Dual Color Standards* (BioRad, Richmond), como parâmetro de comparação. O gel foi corado com azul de Coomassie R250 0,25% e sua imagem digitalizada em equipamento *Perfection 4990 Scanner*[®] (Epson, Suwa).

3.4.2 Purificação da proteína recombinante

Para a purificação da proteína recombinante, o sedimento bacteriano eluído em 1,5 ml de Tris-HCl pH 7,4 (20 mM) foi submetido à sonicação a 12 W por cinco ciclos de 30 segundos no equipamento *60 Sonic Dismembrator* (Fisher Scientific, Pittsburgh), em banho de gelo. Após a sonicação, a amostra foi centrifugada a 4°C por 20 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante, contendo a fração solúvel do lisado bacteriano, foi separado; ao precipitado, contendo a fração insolúvel, foram adicionados 750 µl de SDS 10%. À amostra da fração insolúvel foram acrescentados 750 µl de tampão de amostra

SDS-PAGE sem β -mercaptoetanol, e a mistura foi submetida a desnaturação a 95°C por cinco minutos. A amostra foi então separada através de eletroforese em gel SDS-PAGE 12% no sistema *SE 600 Ruby* (GE Healthcare, Buckinghamshire) por 14 horas à corrente constante de 12 mA.

Após a corrida eletroforética, o gel foi mergulhado em solução 1 M de KCl gelado para coloração temporária das bandas, sendo a banda correspondente à *TrPTP2* excisada do gel e transferida para uma membrana de diálise D9777 (Sigma-Aldrich, Saint Louis), com *cut-off* de 12,4kDa, contendo tampão de corrida SDS-PAGE (25 mM Tris, 250 mM glicina, SDS 0,1%). A proteína recombinante *TrPTP2* foi eletroeluída através de eletroforese horizontal em sistema *Sub-cell[®] GT* (BioRad, Richmond) em tampão de corrida SDS-PAGE por 7 horas, em banho de gelo, à corrente constante de 50 mA. A solução eletroeluída contida dentro da membrana de diálise foi subsequentemente coletada e refrigerada.

Uma alíquota da proteína purificada foi resolvida em gel SDS-PAGE a 12% junto a padrões de tamanho molecular para observação da pureza e quantificação subjetiva da amostra, além da verificação de compatibilidade entre o tamanho da banda purificada e o esperado para a *TrPTP2*.

3.5 Obtenção de soro policlonal dirigido à *TrPTP2*

3.5.1 Animais e aspectos éticos

Foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c com idade aproximada de 45 dias, provenientes do Biotério Central da UFSC e mantidos no biotério do departamento (MIP) em caixas contendo serragem, com disponibilidade de água e ração *ad libitum*. Os procedimentos de produção de antissoros foram realizados observando-se os Princípios Éticos para o Uso de Animais de Laboratório, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, tendo sido sendo aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFSC (Processo CEUA: 23080.025618/2009-81).

3.5.2 Imunização dos camundongos e obtenção do antissoro

Para a produção do soro policlonal anti-*TrPTP2*, três camundongos fêmeas BALB/c foram imunizados com aproximadamente 50 μ g da proteína *TrPTP2* recombinante purificada. Foram realizadas quatro inoculações, com intervalo de 10 dias, sendo as duas primeiras pela via subcutânea e as duas últimas pela via

intraperitoneal. A proteína foi emulsificada em adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, Saint Louis) na primeira imunização; em adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, Saint Louis), na segunda; e em Alu-Gel S (hidróxido de alumínio 1,3%) (Serva, Heidelberg) na terceira e quarta imunizações.

Decorridos 10 dias da última imunização, os antissoros foram obtidos através da coleta de sangue dos camundongos por punção retro-orbital. O sangue coletado foi refrigerado por 30 minutos para formação de coágulo e, em seguida, centrifugado a 800 x g por 10 minutos, sendo o soro transferido para novos tubos e congelado a -20°C.

3.6 Avaliação da expressão de proteínas tirosina fosfatase por *Western blot*

Para os ensaios de *Western blot* foram utilizados os extratos protéicos de *T. rangeli* e *T. cruzi*, além do extrato de bactérias sem inserto, de bactérias induzidas e não induzidas para a expressão de *TrPTP2*, e da proteína *TrPTP2* recombinante purificada.

Extratos protéicos totais de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*, bem como de formas epimastigotas de *T. cruzi*, foram obtidos através da adição de tampão de lise (50 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% Triton X-100) aquecido a 80°C. Após homogeneização em vórtex e centrifugação a 12.500 x g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e a concentração dos extratos protéicos foi estimada através de microdosagem pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Cerca de 30 µg de cada extrato e 10 µg da *TrPTP2* purificada foram misturados com tampão de amostra SDS-PAGE, aquecidos a 95°C por cinco minutos e submetidos à separação eletroforética em gel SDS-PAGE 12%. As amostras foram subsequentemente transferidas para membranas de PVDF (BioRad, Richmond) por 30 minutos a 25 V em módulo de transferência TE 77 PWR *Semi-Dry Transfer Unit*[®] (GE Healthcare, Buckinghamshire), utilizando um sanduíche de transferência composto por folhas de papel filtro banhadas em tampão de transferência (192 mM glicina, 25 mM Tris, 20% metanol).

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas em solução contendo 5% de leite desnatado dissolvido em tampão de *blotting* (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 1% Tween 20). A incubação das membranas com a solução de leite desnatado a 2% em tampão de *blotting*, contendo o anticorpo primário, foi realizada à temperatura ambiente por 90 minutos sob agitação branda e obedeceu a diferentes condições conforme o anticorpo utilizado. O soro policlonal anti-*TrPTP2* foi diluído na proporção

de 1:250, enquanto que o anticorpo monoclonal anti-His•Tag[®] (Sigma-Aldrich, Saint Louis) produzido em camundongo, específico para a cauda de poli-histidina presente em proteínas recombinantes expressas no vetor pET-14b, foi diluído 1:12.000. O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis) foi utilizado em todos os ensaios na diluição de 1:7.000 com incubação de uma hora. Entre cada etapa as membranas foram lavadas cinco vezes de cinco minutos com tampão de *blotting* sob agitação branda.

A observação dos resultados foi realizada através da exposição das membranas, adicionadas do reagente *Pierce[®] ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific, Rockford), a filmes radiográficos IBF Medix (Indústria Brasileira de Filmes, Rio de Janeiro). Após a exposição, os filmes foram revelados utilizando o processador automatizado de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic, INC – China).

3.7 Citolocalização por ensaios de imunofluorescência

Para os ensaios de imunofluorescência foram utilizadas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*, assim como formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os parasitos foram coletados após centrifugação a 3.000 x g (10 minutos) e duas lavagens em PBS pH 7,4, tendo sua concentração ajustada para 5×10^6 células/ml na mesma solução. Dessa suspensão, 50 µl foram depositados sobre uma lamínula circular (diâmetro de 12 mm) em placa de poliestireno (TPP) de 24 cavidades. Após 15 minutos de adesão dos parasitos na lamínula, realizou-se a fixação durante cinco minutos com paraformaldeído a 4% diluído em PBS pH 7,4. A lamínula foi, então, submetida a cinco lavagens de cinco minutos cada em PBS pH 7,4, sob leve agitação. Todas as etapas subsequentes foram também intercaladas com lavagens, nas mesmas condições. A permeabilização dos parasitos foi realizada com o detergente NP-40, na concentração de 5% em PBS pH 7,4, durante cinco minutos. O bloqueio de sítios inespecíficos na lamínula foi realizado durante uma hora à temperatura ambiente com solução de leite desnatado a 5%, diluído em PBS pH 7,4. Os soros policlonais anti-TrPTP2, na diluição de 1:50 em 2% leite desnatado em PBS pH 7,4, foram adicionados sobre a lamínula e permaneceram em contato com os parasitos por 90 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao corante fluorescente Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad) foi diluído 1:1.000 em 2% leite desnatado em PBS pH 7,4, sendo mantido sobre a lamínula por 15 minutos. A lamínula foi, então,

corada por cinco minutos com 1 µg/ml de DAPI, sendo posteriormente montada com o meio Hydromount (National Diagnostics, Atlanta) em lâminas de microscopia. As análises foram realizadas sob os filtros *Wide Blue* (WB), para Alexa Fluor 488, e *Wide Ultraviolet* (WU), para o corante DAPI, em microscópio óptico de fluorescência Olympus – Bx40–FL (Olympus, Tóquio), sendo os resultados registrados digitalmente.

4 RESULTADOS

4.1 Amplificação do gene e análise da sequência da *TrPTP2*

Com o intuito de determinar a temperatura ótima para ligação específica dos iniciadores ao gene da *TrPTP2*, foram testadas temperaturas variando de 57°C (temperatura média estimada pelo programa *Primer Select*) até 63°C (**Figura 5**). Uma banda isolada, de tamanho aproximado aos 987pb teoricamente esperados para o gene da *TrPTP2*, foi obtida apenas quando se utilizou a temperatura de 63°C para ligação dos iniciadores.

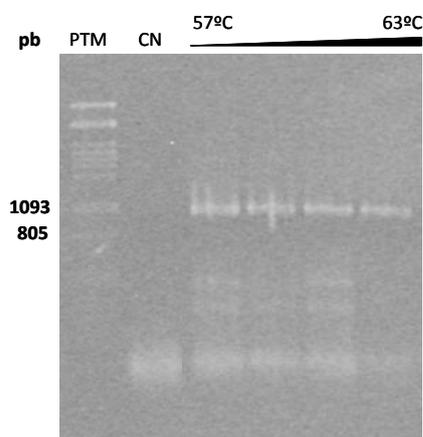


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado por brometo de etídio revelando o produto de amplificação de 987pb do gene da *TrPTP2* em um gradiente de 57°C até 63°C para ligação dos iniciadores. PTM – Padrão de Tamanho Molecular (Fago lambda digerido com *HindIII*); CN – Controle Negativo da reação.

O fragmento de 987pb do gene da *TrPTP2* foi clonado no vetor *pGEM-T easy*[®] e transformado em células *E. coli*, as quais posteriormente tiveram o DNA plasmidial purificado para sequenciamento, confirmando, através de *blastx*, a identidade do inserto como sendo o gene da *TrPTP2*. O passo subsequente consistiu na subclonagem do inserto no vetor pET-14b seguido de nova transformação em *E. coli* BL21(DE3), das quais o DNA plasmidial também foi purificado e sequenciado, confirmando, através do programa *Translate* do pacote Expasy, que a inserção do gene da *TrPTP2* no vetor pET-14b foi realizada na correta fase de leitura. De acordo com o programa *ProtParam*, a *TrPTP2* é uma proteína de 328 aminoácidos, com tamanho aproximado de 36kDa e ponto isoelétrico teórico de 8,95. Em termos de composição aminoacídica, o programa apontou a existência de 67 aminoácidos carregados (31 negativamente e 36 positivamente).

As sequências nucleotídicas obtidas a partir de ambos os sequenciamentos foram analisadas quanto à qualidade e, por possuírem um valor de *Phred* acima de 20 (máximo de um erro em 100pb, ou seja, 99% de precisão), os resultados inferidos a partir das mesmas foram considerados confiáveis. Dessa forma, realizou-se uma análise por *blastx* para comparação da sequência da *Tr*PTP2 com as sequências de PTP descritas para organismos filogeneticamente relacionados, sendo os alinhamentos realizados através do programa *ClustalW* (Figura 6).



Figura 6. Alinhamento da estrutura primária da *Tr*PTP2 com as sequências de proteínas tirosina fosfatases de *Trypanosoma cruzi* (Tc00.1047053510187.234) e *T. brucei* (Tb10.70.0070). Em destaque azul na sequência encontra-se o domínio “VHCSAGIGRT”, motivo de assinatura de PTP, responsável pela formação do P-loop catalítico. Em vermelho estão destacados os domínios característicos das PTP de tripanosomatídeos: “LANEXTIYP”, “EVD”, “LIGAYA” e “RLGV(D/S)(I/V)” (SZÖOR *et al.*, 2006). As regiões sublinhadas representam os sítios para modificações pós-traducionais detectadas pelo programa *MotifScan*: em verde, os dois sítios para N-glicosilações; em roxo, os 6 sítios para N-miristoilações; e em laranja, os cinco sítios para fosforilações.

Entre *T. rangeli* e *T. cruzi* (proteína Tc00.1047053510187.234) foi encontrada uma identidade de 72%, e uma similaridade de 81%, ao passo que entre *T. rangeli* e *T. brucei* (proteína Tb10.70.0070) a identidade foi de 58% e a similaridade de 75%. Os valores de identidade informam a percentagem de aminoácidos idênticos entre as

sequências peptídicas analisadas, enquanto os valores de similaridade englobam também a percentagem de aminoácidos com propriedades semelhantes. O motivo assinatura de PTP, “(V/I)HCSAGXGR(T/S)”, bem como os domínios característicos das PTP de tripanosomatídeos (SZÖOR *et al.*, 2006), encontram-se bastante conservados nos três organismos.

As análises realizadas a partir da sequência aminoacídica predita para a *Tr*PTP2 utilizaram, além do programa *ProtParam*, o programa *BioEdit*[®] e outros programas do pacote ExPASy. De acordo com o *BioEdit*[®], 81,75% dos aminoácidos que compõem proteína *Tr*PTP2 são hidrofóbicos e, dentro desses, 36,3% são aminoácidos bastante hidrofóbicos (W, C, V, L, I, M e F). Diante desse resultado, a sequência da *Tr*PTP2 foi submetida à análise pelos programas *TMpred*, *TMHMM* e *Split4* do pacote ExPASy. Embora os três programas tenham apontado para a existência de um domínio transmembrana na porção C-terminal da proteína, por motivos didáticos apenas o gráfico gerado pelo programa *Split4* está exposto neste trabalho (**Figura 7**).

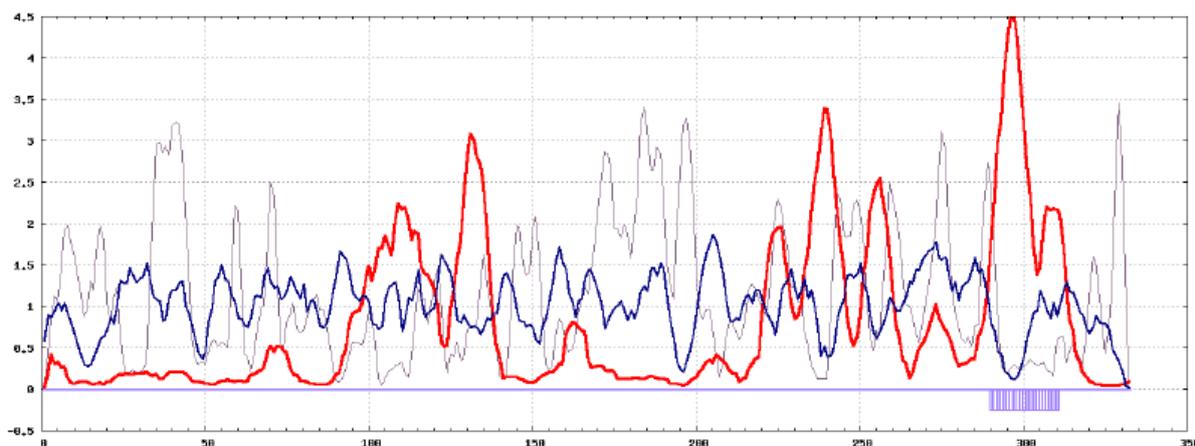


Figura 7. Resultado da predição de domínio transmembrana na *Tr*PTP2 realizada pelo programa *Split4*. A linha vermelha representa a preferência de hélice transmembrana (índice THM), a linha azul aponta a preferência beta (índice BET) e a linha cinza indica o índice de momento hidrofóbico modificado (índice INDA). A caixa violeta (abaixo das abscissas) representa a posição da hélice transmembrana predita (índice DIG).

Face à alta probabilidade da *Tr*PTP2 estar localizada na membrana plasmática do parasito, decidiu-se investigar possíveis modificações que a mesma poderia sofrer desde sua tradução até seu ancoramento na membrana. A sequência aminoacídica predita foi então primeiramente submetida ao programa *MotifScan*, que detectou, além de motivos característicos de PTP, sítios para modificações pós-traducionais como

glicosilações (dois sítios), fosforilações (cinco sítios) e miristoilações (6 sítios) (**Figura 6**). Em seguida, a sequência foi submetida ao programa *GPI-SOM* no intuito de averiguar a possibilidade da *TrPTP2* possuir uma âncora de GPI, mas esta não foi detectada.

4.2 Expressão heteróloga e purificação da *TrPTP2* recombinante

A análise em gel SDS-PAGE revelou uma banda de 36kDa no extrato protéico insolúvel das bactérias induzidas à produção da *TrPTP2* recombinante. Essa banda de 36kDa, tamanho teoricamente esperado para a *TrPTP2*, não foi observada no extrato bacteriano não induzido (**Figura 8**).

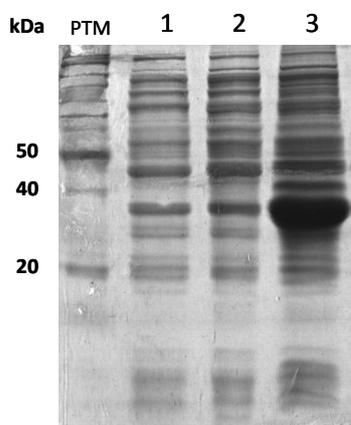


Figura 8. Análise da expressão heteróloga da proteína recombinante *TrPTP2* através de gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 12%. PTM – Padrão de Tamanho Molecular (*BenchMark™ Protein Ladder*, Invitrogen); 1 – Extrato protéico bacteriano sem adição de IPTG (controle não induzido); 2 – Fração solúvel após 3 horas da indução a 37°C; 3 – Fração insolúvel após 3 horas da indução a 37°C.

A presença praticamente integral da *TrPTP2* recombinante na fração insolúvel do extrato sugere fortemente que essa proteína esteja contida em corpos de inclusão bacterianos. Sendo assim, na tentativa de obter maiores quantidades da *TrPTP2* na fração solúvel do extrato para facilitar os procedimentos de purificação, foram testadas temperaturas mais baixas (15°C e 27°C), bem como diferentes tempos de indução da expressão (**Figura 9**).

Embora se tenha detectado a banda da *TrPTP2* na fração solúvel, quando a indução da expressão foi realizada a 27°C durante 6 horas, a quantidade não foi suficiente para que pudesse ser purificada com eficácia a partir dessa fração. O critério seguinte para determinar a melhor temperatura seria a maior expressão da *TrPTP2*, mas, uma vez que sua quantidade na fração insolúvel foi semelhante nas três temperaturas, optou-se por realizar sua expressão à temperatura de 37°C pela conveniência de ser a temperatura padrão da estufa de incubação.

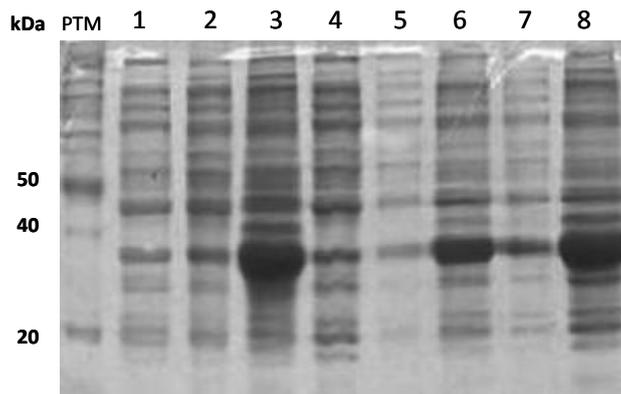


Figura 9. Análise da expressão heteróloga sob diferentes tempos e temperaturas de indução da proteína recombinante *TrPTP2* através de gel SDS-PAGE a 12%. PTM – Padrão de Tamanho Molecular (*BenchMark™ Protein Ladder*, Invitrogen); 1 e 4 – Controles não induzidos; 2 – Fração solúvel após 15 horas de indução a 15°C; 3 – Fração insolúvel após 15 horas de indução a 15°C; 5 – Fração solúvel após 3 horas de indução a 27°C; 6 – Fração insolúvel após 3 horas de indução a 27°C; 7 – Fração solúvel após 6 horas de indução a 27°C; 8 – Fração insolúvel após 6 horas de indução a 27°C.

As primeiras tentativas de purificação da *TrPTP2* recombinante foram baseadas em cromatografia por afinidade a metal utilizando resinas de níquel, pois a cauda de poli-histidina, presente nas proteínas recombinantes inseridas no vetor pET-14b, possui afinidade por esse elemento. No entanto, devido ao baixo nível de expressão da *TrPTP2*, a purificação por esse método rendeu quantidades insuficientes da proteína para a imunização de camundongos, de forma que a purificação foi realizada por eletroeluição.

Uma vez que esse método de purificação não apresenta o mesmo grau de confiabilidade que uma cromatografia por afinidade a metal, para assegurar que se havia purificado a proteína de interesse, seu tamanho foi comparado ao da *TrPTP2* em extratos induzidos através de um gel SDS-PAGE. Esse gel revelou que a proteína purificada possui cerca de 36kDa, esperado teórico para a *TrPTP2*, apresentando-se na mesma altura da banda de expressão na fração insolúvel do extrato bacteriano induzido (**Figura 10**).

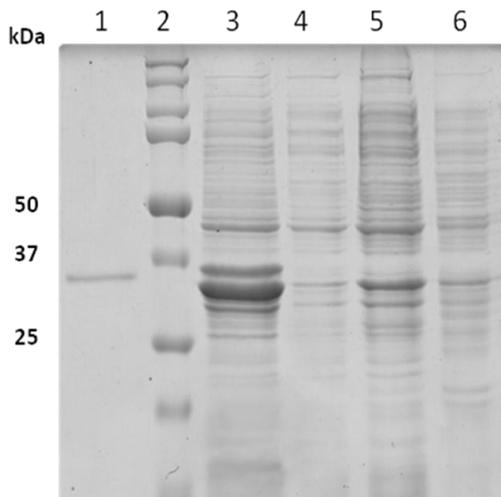


Figura 10. Resultado da purificação da *TrPTP2* recombinante por eletroeluição e comparação com a expressão heteróloga da proteína em gel SDS-PAGE a 12%. 1 – *TrPTP2* purificada por eletroeluição; 2 – Padrão de Tamanho Molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*, BioRad); 3 – Fração insolúvel após 3 horas de indução a 37°C; 4 – Fração solúvel após 3 horas de indução a 37°C; 5 – Controle não induzido; 6 – Controle sem inserto.

A proteína purificada, bem como extratos induzidos e não induzidos para a expressão da *TrPTP2*, foi também submetida a um ensaio de *Western blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti-His•Tag[®], dirigido à cauda de poli-histidina (**Figura 11**). Uma vez que o anticorpo detectou a proteína purificada de cerca de 36kDa e a banda de expressão de mesmo tamanho no extrato induzido, mas nenhuma banda no extrato não induzido, pôde-se concluir que a proteína recombinante, provavelmente a *TrPTP2*, foi purificada com sucesso.

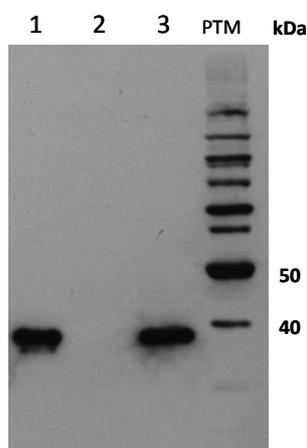


Figura 11. Avaliação da purificação da *TrPTP2* recombinante por eletroeluição através de *Western blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti-His•Tag[®]. 1 – Proteína *TrPTP2* recombinante purificada por eletroeluição; 2 – Controle não induzido; 3 – Extrato bacteriano induzido; PTM – Padrão de Tamanho Molecular (*BenchMark™ Protein Ladder*, Invitrogen).

Por se encontrar dissolvida em tampão contendo SDS, a proteína purificada não pôde ser quantificada através do método de Bradford devido à interferência que esse detergente causa na leitura do ensaio. Dessa forma, a partir de uma avaliação subjetiva baseada na intensidade de coloração da banda viu-se que a *TrPTP2* se encontrava em quantidade satisfatória para permitir a produção de anticorpos. Três camundongos BALB/c foram imunizados com cerca de 50 µg/dose da proteína purificada.

O soro de cada camundongo imunizado foi testado quanto ao seu reconhecimento da *Tr*PTP2 em ensaios de *Western blot* contra a proteína recombinante. O soro policlonal murino que apresentou a maior reatividade contra a *Tr*PTP2 foi utilizado nos ensaios de avaliação dos níveis de expressão e de citolocalização, tanto em *T. rangeli* como em *T. cruzi*.

4.3 Avaliação da expressão da *Tr*PTP2 por *Western blot*

O resultado da primeira análise mostrou que o antissoro produzido foi capaz de reconhecer especificamente uma banda no extrato protéico das formas epimastigotas de diferentes cepas de *T. rangeli* e apresentou alta reatividade contra a *Tr*PTP2 purificada (**Figura 12**). Não houve detecção de nenhum polipeptídeo no extrato de *T. cruzi*, e a proteína reconhecida nas diferentes cepas de *T. rangeli* apresentou uma massa molecular cerca de 60kDa, sendo aproximadamente 20kDa maior do que o teórico esperado para a *Tr*PTP2 (36kDa). A intensidade da banda de cerca de 60kDa detectada no extrato da cepa Choachí de *T. rangeli*, que é a cepa de cuja sequência foi amplificado o gene da *Tr*PTP2, foi equivalente nos extratos das cepas B450 e C23, mas fraca no extrato da cepa H14.

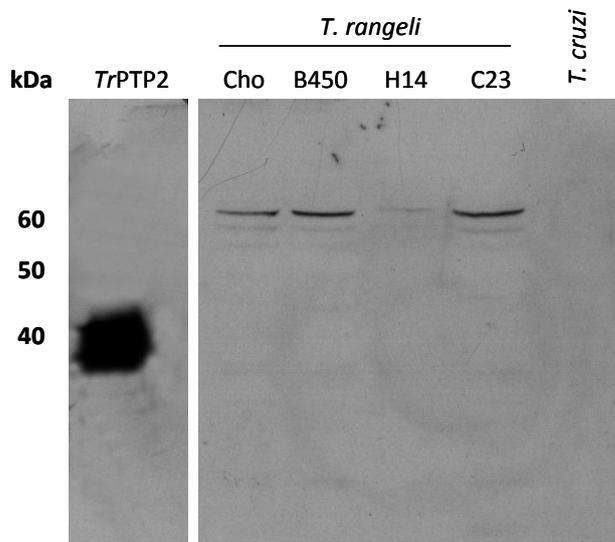


Figura 12. Avaliação do reconhecimento da proteína recombinante purificada (*Tr*PTP2) e da expressão de *Tr*PTP2 em extratos protéicos das formas epimastigotas de diferentes cepas de *Trypanosoma rangeli* (Choachí, B450, H14 e C23) e de *T. cruzi* através de *Western blot* utilizando o soro policlonal anti-*Tr*PTP2.

Com o objetivo de verificar a expressão diferencial da *Tr*PTP2 ao longo do ciclo biológico de *T. rangeli*, os extratos protéicos de formas epimastigotas e tripomastigotas foram submetidos a um *Western blot*. Embora haja evidência de maior expressão da *Tr*PTP2 nas formas epimastigotas de *T. rangeli*, uma proteína de mesmo tamanho (cerca

de 60kDa) foi também detectada no extrato das formas tripomastigotas infectantes (**Figura 13**).

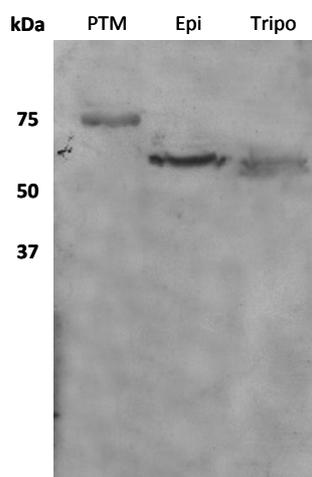


Figura 13. Avaliação da expressão de *TrPTP2* em extratos protéicos de formas epimastigotas (Epi) e de formas tripomastigotas (Tripo) de *Trypanosoma rangeli* através de *Western blot* utilizando o soro policlonal anti-*TrPTP2*. PTM – Padrão de Tamanho Molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*, BioRad).

4.4 Localização celular da *TrPTP2* por imunofluorescência

Com o objetivo de investigar a localização celular e a expressão diferencial da proteína tirosina fosfatase nas diferentes formas biológicas de *T. rangeli*, os soros policlonais anti-*TrPTP2* foram também utilizados em ensaios de imunofluorescência indireta (**Figura 14**). Nas formas epimastigotas de *T. rangeli* o soro anti-*TrPTP2* revelou uma marcação de mesma intensidade no corpo celular do parasito e no início do flagelo, apontando para uma distribuição difusa pelo citoplasma ou pela membrana do tripanosoma. Por outro lado, nas formas tripomastigotas infectantes houve evidente reconhecimento do soro anti-*TrPTP2* pelo flagelo do *T. rangeli*, sendo a marcação no corpo celular bastante sutil.

O soro policlonal anti-*TrPTP2* foi também utilizado para detectar a expressão de uma PTP em *T. cruzi*, mesmo após o resultado do ensaio de *Western blot* ter se mostrado negativo. Para a imunofluorescência foram utilizadas formas epimastigotas de *T. cruzi*, nas quais houve marcação do flagelo bem como do corpo basal deste (**Figura 15**). Na parte inferior da imagem há um parasito diferenciado na forma tripomastigota infectante, no qual o reconhecimento do flagelo é mais tênue.

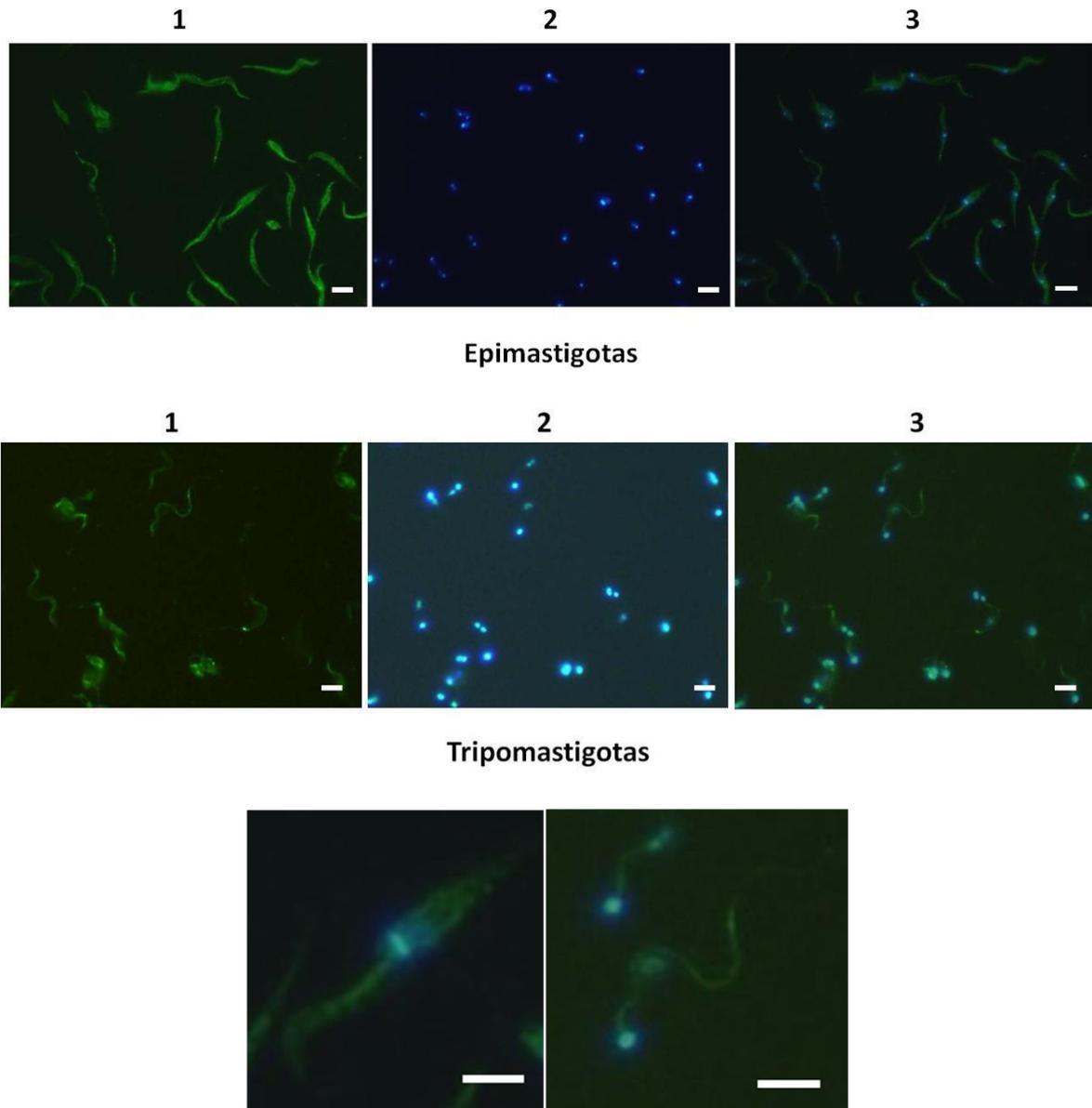


Figura 14. Citolocalização da *TrPTP2* em formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* através de ensaio de imunofluorescência utilizando o soro policlonal anti-*TrPTP2*. As imagens representam microfotografias da expressão da *TrPTP2* (1), núcleo e cinetoplasto corados com o reagente DAPI (2) e a sobreposição das imagens (3). Embaixo, ampliação de uma forma epimastigota característica (A) e de uma forma tripomastigota (B). As barras em branco representam 10 μm .

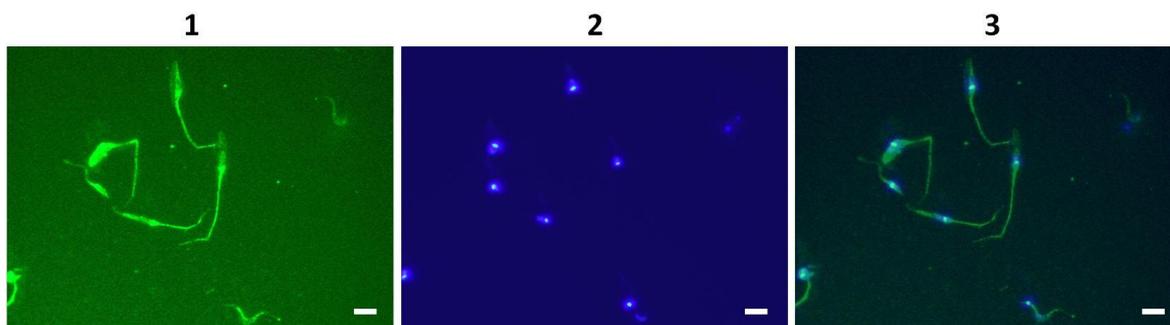


Figura 15. Citocalização de uma proteína tirosina fosfatase em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* através de ensaio de imunofluorescência utilizando o soro policlonal anti-TrPTP2. As imagens representam microfotografias da expressão da TrPTP2 (1), núcleo e cinetoplasto corados com o reagente DAPI (2) e a sobreposição das imagens (3). As barras em branco representam 10 μ m.

5 DISCUSSÃO

As PTP desempenham um papel essencial no controle de processos do ciclo celular como a divisão, a diferenciação e a expressão gênica. As PTP se destacam entre os mecanismos de coordenação do complexo ciclo celular dos protozoários da Ordem Kinetoplastida, uma vez que estes parasitos apresentam um ciclo biológico que alterna entre formas proliferativas e formas incapazes de se multiplicar (PARSONS; RUBEN, 2000).

Atualmente a mais bem descrita PTP em tripanosomatídeos é a *TbPTP1* de *T. brucei*, cuja função está intrinsecamente relacionada à diferenciação celular nesse parasito (SZÖÖR *et al.*, 2006). Embora haja estudos envolvendo PTP de outros tripanosomatídeos, ainda pouco se sabe acerca das características dessas enzimas em organismos desse táxon. Nesse contexto, os resultados obtidos neste trabalho para a PTP de *T. rangeli* (*TrPTP2*) são primariamente comparados com estudos estruturais e funcionais realizados em *T. brucei*, embora alguns aspectos sejam passíveis de análise em relação a outros tripanosomatídeos.

A sequência nucleotídica obtida para o gene da *TrPTP2* revelou que sua janela aberta de leitura possui 987pb, conforme já havia sido descrito por Bayer-Santos (2007). O gene da *TrPTP2* codifica para uma proteína de 328 aminoácidos com massa molecular de aproximadamente 36kDa, cujo grau de identidade aminoacídica com a *TcPTP2*, de *T. cruzi*, e com a *TbPTP1*, de *T. brucei*, é de 72% e 58%, respectivamente.

Uma comparação realizada com as sequências de PTP humanas revelou que a similaridade entre estas e a *TrPTP2* se restringe a poucos domínios, dentre os quais encontra-se o motivo assinatura de PTP CX₅R, na forma “VHCSAGIGRT”. Esse resultado fortalece a colocação de Brenchley e colaboradores (2007) de que existe uma divergência significativa entre as fosfatases humanas e as fosfatases dos Kinetoplastida. Além disso, a presença de motivos característicos nas PTP de tripanosomatídeos como “LANEXTIYP”, “EVD”, “LIGAYA” e “RLGV(D/S)(I/V)” sugerem que as PTP desses organismos podem ser um alvo em potencial para o desenvolvimento de inibidores específicos visando aplicações terapêuticas.

Uma investigação superficial dos parâmetros bioquímicos da *TrPTP2* através de sua sequência aminoacídica deduzida mostrou que, de forma condizente com suas

homólogas em *T. cruzi* e *T. brucei*, essa enzima possui alta composição de aminoácidos hidrofóbicos. Uma vez que a alta hidrofobicidade diminui as chances da proteína se encontrar solúvel no citoplasma, a sequência polipeptídica da *TrPTP2* foi também analisada quanto à presença de hélices transmembranares, revelando através de três distintos programas a existência de um domínio transmembrana na posição C-terminal.

Esse resultado é contrário à colocação de Andreeva e Kutuzov (2008) de que as PTP de protozoários são estritamente citosólicas. Entretanto, essa colocação encontra-se isolada na literatura, sendo também contrariada pelos estudos de Aguirre-García e colaboradores (2003; 2006), que descrevem PTP de membrana em *L. major* e *E. histolytica*, e pelos inúmeros estudos que detectaram atividades tirosina fosfatásicas na superfície de organismos da Ordem Kinetoplastida (COOL; BLUM, 1993; DELL; ENGEL, 1994; BAKALARA *et al.*, 1995; FERNANDES *et al.*, 2003; DUTRA *et al.*, 2006). Além disso, a atividade de ecto-fosfatases específicas para resíduos de tirosina já foi detectada e estudada no próprio *T. rangeli* (GOMES *et al.*, 2006; COSENTINO-GOMES *et al.*, 2009; FONSECA-DE-SOUZA *et al.*, 2009; DICK *et al.*, 2010), sugerindo a existência de PTP de membrana também neste parasito.

Todavia, a enzima *TbPTP1* é encontrada principalmente na fração de citoesqueleto de *T. brucei*, caracterizando-se como uma proteína do tipo não-receptora (SZÖOR *et al.*, 2006). Uma vez que o grau de similaridade entre essa proteína e a *TrPTP2* é alto, a incompatibilidade entre os resultados obtidos para sua localização celular é instigante e reforça a importância de se dar continuidade aos estudos envolvendo essas enzimas.

Corroborando a possibilidade de uma localização na membrana do parasito, as análises quanto a modificações pós-traducionais apontaram para a existência de dois sítios para N-glicosilações, comuns em proteínas de membrana. Em tripanosomatídeos, a via responsável pela glicosilação de proteínas difere daquela encontrada em células de mamíferos por contar com distintas enzimas e mecanismos. Esses protozoários são os únicos seres vivos capazes de transferir oligossacarídeos não-glicosilados durante a N-glicosilação de proteínas *in vivo*, e a composição dos mesmos varia de espécie para espécie, sendo comumente $\text{Man}_{6-9}\text{GlcNAc}_2$ (PARODI, 1993).

A N-glicosilação de proteínas serve a propósitos variados, dentre os quais se encontram a sinalização através de interação com lectinas, a estabilização protéica e também a resistência a proteases (JONES *et al.*, 2005). Uma vez que compostos glicosilados também frequentemente auxiliam no envelhecimento de glicoproteínas

(PARODI, 1998), é possível supor que as glicosilações preditas para *TrPTP2* tenham um papel associado ao seu correto dobramento, bem como à realização de sua função. Isso porque, em tripanosomatídeos, muitas proteínas de membrana cuja função é imprescindível para o cumprimento do ciclo biológico encontram-se altamente glicosiladas; exemplos importantes são as proteínas variantes de superfície (VSG) de *T. brucei* e as trans-sialidases de *T. cruzi* (JONES *et al.*, 2005).

Foram também detectados seis sítios para N-miristoilações, as quais consistem na adição do ácido graxo miristato a um resíduo de glicina N-terminal. Muitas proteínas miristoiladas são componentes fundamentais de cascatas de sinalização eucarióticas, sendo a miristoilação essencial para a localização adequada dessas proteínas (WRIGHT *et al.*, 2010). Assim, as miristoilações previstas para a *TrPTP2* certamente são indispensáveis para o cumprimento de sua função biológica e para a determinação de seu endereçamento celular, uma vez que em algumas proteínas de tripanosomatídeos a miristoilação por si só é suficiente para dirigi-las à membrana plasmática, embora não para uma região específica da mesma (RALSTON *et al.*, 2009).

O fato de que na *TrPTP2* também estão previstos cinco sítios para fosforilações não é surpreendente, uma vez que as PTP podem ser reguladas por esse tipo de modificação pós-traducional. Tirosina fosfatases já bastante estudadas, como as proteínas CD45, PTP1B e PTP-PEST em seres humanos, têm sua função modulada pela fosforilação em resíduos de serina (DEN HERTOOG *et al.*, 2008).

A *TrPTP2* foi também analisada quanto à presença de âncora de GPI, importante para a ancoragem, temporária ou não, de muitas proteínas à membrana, especialmente nas regiões de balsas lipídicas. Entretanto, o resultado dessa análise mostrou que a *TrPTP2* não possui nenhum sítio previsto para âncora de GPI, o que sugere que essa enzima não se encontra integralmente na superfície externa do *T. rangeli*.

Com o objetivo de analisar a expressão da tirosina fosfatase de *T. rangeli*, uma proteína *TrPTP2* foi produzida de forma recombinante em *E. coli* e, após purificação, utilizada na produção de antissoro. A opção pelo sistema bacteriano de expressão foi devido às suas conveniências, como a fácil manipulação e as altas taxas de crescimento e produção de proteínas. Entretanto, esse sistema apresenta aspectos desvantajosos para a expressão de proteínas eucarióticas, uma vez que procariotos possuem certas limitações na realização de modificações pós-traducionais, na formação de pontes dissulfeto e mesmo no dobramento correto da proteína. Sendo assim, as proteínas

eucarióticas expressas em *E. coli* normalmente são destinadas a corpos de inclusão bacterianos (BANEYX, 1999).

Tal foi o caso da *TrPTP2*, cujas próprias características devem ter contribuído para seu enovelamento incorreto ou incompleto na bactéria, com provável deposição em corpos de inclusão. Dentre essas características encontram-se a composição aminoacídica majoritariamente hidrofóbica, a provável hélice transmembrana e a presença de glicosilações, não incorporadas pelo sistema procarioto. Embora não interfiram na estrutura tridimensional da proteína, os oligossacarídeos são importantes para o seu correto dobramento (PARODI, 1998).

Uma vez que não foram obtidas quantidades significativas da *TrPTP2* na fração solúvel, procedeu-se à purificação da mesma a partir da fração insolúvel, através de cromatografia por afinidade a metal. No entanto, provavelmente devido à concentração excessivamente alta da *TrPTP2* em corpos de inclusão, mesmo em condições desnaturantes a cromatografia por afinidade a metal rendeu apenas uma pequena quantidade da proteína purificada, insuficiente para proceder às imunizações.

Sendo assim, a metodologia de purificação da *TrPTP2* foi baseada na sua excisão e eletroeluição a partir de um gel de poliacrilamida desnaturante. A principal vantagem dessa estratégia de purificação é a possibilidade de se obter grandes quantidades da proteína de interesse, uma vez que é aplicada no gel a fração do extrato bacteriano em que a proteína está naturalmente mais concentrada; no caso da *TrPTP2*, a fração insolúvel. No entanto, a purificação por eletroeluição apresenta desvantagens no que concerne à identidade e mesmo à pureza da proteína purificada, pois, uma vez que o procedimento não conta com a especificidade de uma cromatografia por afinidade a metal, aumentam as chances de uma proteína bacteriana constitutiva ser purificada junto com a *TrPTP2* ou mesmo em seu lugar.

Assim, antes que se procedesse à imunização dos camundongos, reforçou-se que a proteína purificada se tratava da proteína recombinante através da confirmação de que possui 36kDa e apresenta a cauda de poli-histidina. Além disso, em uma alíquota da purificação resolvida em gel SDS-PAGE apenas uma banda foi visível, reduzindo as chances de ter havido contaminação com proteínas bacterianas constitutivas de tamanho próximo. Portanto, tendo a *TrPTP2* recombinante sido purificada de forma quantitativa e qualitativamente satisfatória, foi possível utilizá-la para imunizar camundongos.

O soro policlonal anti-*TrPTP2* detectou uma banda de aproximadamente 60kDa no extrato total de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*. Esse resultado

não era esperado, considerando a massa molecular predita a partir da sequência nucleotídica da própria *TrPTP2* e, também, que a sua homóloga *TbPTP1* em *T. brucei*, cuja identidade aminoacídica é de 58%, apresenta apenas 34kDa (SZÖOR *et al.*, 2006). Dentre as PTP já descritas em tripanosomatídeos, apenas uma PTP de *L. major* apresenta massa molecular semelhante à encontrada para a *TrPTP2*, isto é, de 55-60kDa (AGUIRRE-GARCÍA *et al.*, 2006).

Entretanto, considerando a predição de modificações pós-traducionais na *TrPTP2*, dentre as quais duas glicosilações, a divergência de cerca de 20kDa entre a massa molecular esperada e a obtida pode derivar da perturbação que oligossacarídeos potencialmente causam na migração eletroforética de proteínas. Uma proteína ecto-fosfatase detectada em *T. brucei*, quando analisada por eletroforese, mostrou ter um aumento de 70kDa em sua massa molecular devido a oito glicosilações e um ponto isoelétrico ácido (BAKALARA *et al.*, 2000). De forma semelhante, por possuir seis glicosilações e uma âncora de GPI, uma proteína de membrana estudada no tripanosomatídeo africano *T. congolense* apresentou uma discrepância de 27kDa entre as massas moleculares deduzida e encontrada (SAKURAI; SUGIMOTO; INOUE, 2008).

Ambos os estudos mostram que, embora as glicosilações evidentemente dificultem a migração de proteínas a que se encontram associadas, parece não haver uma relação linear entre o número de glicosilações e o número de kDa a mais na massa molecular. Dessa forma, a princípio não é possível predizer em quantos kDa uma proteína glicosilada diferiria de uma proteína idêntica não-glicosilada apenas sabendo-se o número de potenciais sítios para glicosilações. Embora análises da sequência aminoacídica deduzida para a *TrPTP2* indiquem que esta não é ancorada por GPI e nem possui tantos sítios para glicosilação, é possível inferir que, se as modificações pós-traducionais preditas de fato se apresentarem nesta proteína, sua massa molecular deve estar superestimada. Além disso, a sequência aminoacídica predita para a *TrPTP2* propõe a existência de 67 aminoácidos carregados (20,5% do total da proteína), dos quais 31 negativamente e 36 positivamente, o que poderia também contribuir para alterações na sua migração em um gel SDS-PAGE (SAKURAI; SUGIMOTO; INOUE, 2008).

A comparação da expressão da *TrPTP2* entre formas epimastigotas de diferentes cepas de *T. rangeli* revelou que as cepas Choachí, B450 e C23 expressam a proteína de aproximadamente 60kDa. A detecção de uma expressão equitativa dessa enzima nas cepas KP1(+) Choachí e B450 e na cepa KP1(-) C23 mostra que, embora o gene da

*Tr*PTP2 seja um bom marcador para diferenciar cepas KP1(+) de cepas KP1(-) (BAYER-SANTOS, 2007), a proteína *Tr*PTP2 não apresenta a mesma aplicação.

Na cepa KP1(+) H14, em contrapartida, a banda correspondente à proteína de 60kDa é apenas fracamente visível. Curiosamente, a sequência nucleotídica da *Tr*PTP2 obtida para a cepa H14 é idêntica à sequência obtida para a cepa Choachí (BAYER-SANTOS, 2007), a qual serviu de molde para a realização deste estudo, sugerindo a existência de algum controle na expressão dessa proteína.

Reforçando essa possibilidade está o fato de que o soro policlonal anti-*Tr*PTP2 é incapaz de reconhecer qualquer proteína no extrato protéico total de *T. cruzi*, ainda que este protozoário apresente uma proteína homóloga com 72% de identidade. Uma vez que em protozoários da Ordem Kinetoplastida a regulação da expressão gênica é baseada principalmente na edição do RNA e no controle pós-traducional (STUART *et al.*, 2008), é possível que a *Tr*PTP2 em *T. rangeli* esteja susceptível a um ou a ambos os tipos de regulação.

Avaliando a expressão dessa enzima nas diferentes formas de *T. rangeli* observou-se que o reconhecimento da proteína de cerca de 60kDa é mais evidente no extrato protéico de formas epimastigotas, embora também seja visível no extrato de formas tripomastigotas. Além de uma possível expressão diferencial da *Tr*PTP2 entre as duas formas, esse resultado sugere uma diferença de especificidade no reconhecimento da proteína pelo soro anti-*Tr*PTP2, uma vez que no extrato de tripomastigotas parece haver uma detecção inespecífica de mais uma proteína logo abaixo daquela de aproximadamente 60kDa.

Os resultados obtidos pelos ensaios de imunofluorescência contribuíram para o esclarecimento de certas questões levantadas pelos resultados de *Western blot*, principalmente acerca da expressão da *Tr*PTP2 nas diferentes formas do *T. rangeli*. Assim como nos ensaios de *Western blot*, na imunofluorescência o sinal de reconhecimento do soro policlonal anti-*Tr*PTP2 é comparativamente mais intenso em formas epimastigotas do que em tripomastigotas, pois, enquanto nas primeiras a expressão da *Tr*PTP2 parece estar distribuída por todo o corpo celular, nas segundas esta se restringe à porção flagelar do protozoário. Entretanto, este resultado não permite inferir diretamente que haja diferentes níveis de expressão entre as duas formas do parasito, apenas um diferente padrão de localização celular.

Ainda que nas formas infectantes o antissoro tenha reconhecido fracamente também a região do corpo celular, é nítida a diferença de localização celular da *Tr*PTP2

de uma forma biológica para outra, um comportamento já observado em PTP de outros tripanosomatídeos. Aguirre-García e colaboradores (2006) observaram que uma PTP em *L. major* encontra-se difusa no citoplasma em formas promastigotas procíclicas desse protozoário, mas apresenta-se associada à membrana plasmática em formas promastigotas metacíclicas infectantes. O padrão de distribuição dessa PTP de *L. major* é muito semelhante ao da *TrPTP2*, uma vez que, da mesma forma, encontra-se associada à membrana nas formas infectantes do parasito. Já em *T. brucei* foi estudada uma fosfatase que sequer é expressa pelas formas procíclicas, sendo apenas detectadas nas formas metacíclicas infectantes (BAKALARA *et al.*, 2000). Em ambos os casos, atribui-se o deslocamento das PTP para a membrana de formas infectantes a um possível papel desempenhado por essas enzimas na inibição da multiplicação celular e/ou na interação com o hospedeiro.

Todavia, a predição de um domínio transmembrana para a *TrPTP2* sugere fortemente que, tanto nas formas epimastigotas como nas formas tripomastigotas de *T. rangeli*, essa proteína encontra-se associada à membrana plasmática do parasito. Assim, o que se observa em *T. rangeli* é uma concentração da *TrPTP2* na membrana flagelar de tripomastigotas, ao passo que em epimastigotas essa enzima está distribuída por toda a membrana do parasito, inclusive pela membrana flagelar.

A localização específica de proteínas nos diferentes compartimentos da membrana de tripanosomatídeos já foi caracterizada para isotipos de transportadores de glicose, em que um isotipo encontra-se na membrana do corpo celular ao passo que o outro é direcionado para a membrana flagelar. Uma das possíveis explicações para a associação específica de algumas proteínas com uma determinada região da membrana plasmática é que estas interagem de forma diferente com componentes do citoesqueleto (SNAPP; LANDFEAR, 1997). Dessa forma, embora um sinal seja necessário para endereçar a proteína ao compartimento de membrana destino, é preciso também que haja um mecanismo de retenção para mantê-la nesse local. Para a *TrPTP2* é possível que existam mecanismos desse tipo, inclusive dependentes de uma associação com os microtúbulos flagelares, capazes de concentrá-la na membrana do flagelo quando os parasitos se encontram na forma tripomastigota e de permitir que fique difusa pela membrana plasmática quando na forma epimastigota.

Uma vez que o flagelo de células eucarióticas é constantemente controlado por fosforilações, é muito provável que desfosforilações e, portanto, enzimas fosfatases, possuam um papel de equivalente importância nessa estrutura. Nakajima e

colaboradores (2005) observaram que a fosforilação de proteínas no axonema do flagelo eucariótico é crucial para a regulação de sua motilidade independentemente de AMP cíclico, sendo um aumento no pH o principal fator responsável por induzir a fosforilação e a consequente ativação da motilidade flagelar. Interessantemente, a diferenciação *in vitro* do *T. rangeli*, processo que depende da adesão flagelar a um substrato, ocorre com sucesso quando o meio utilizado possui pH 8,0, mas é drasticamente prejudicada quando esse mesmo meio possui pH 6,0 ou 7,0 (KOERICH *et al.*, 2002).

Ainda que em *T. brucei* a *TbPTP1* seja encontrada na fração do citoesqueleto desse protozoário, uma associação específica com o flagelo não foi detectada (SZÖOR *et al.*, 2006). Entretanto, um estudo conduzido por Nett e colaboradores (2009) com o objetivo de identificar e localizar em *T. brucei* proteínas fosforiladas especificamente em resíduos de tirosina, através da utilização de um anticorpo monoclonal dirigido a fosfotirosina, revelou que existe uma concentração dessas proteínas no corpo basal do flagelo, no próprio flagelo e na região do nucléolo do protozoário. O sinal de reconhecimento pelo anticorpo detectado ao longo do flagelo de *T. brucei* desaparece em sua extremidade distal, sugerindo que as proteínas fosforiladas em tirosina estão diretamente associadas ao axonema, encontram-se adjacentes a este ou ainda podem estar associadas a estruturas membranosas próximas ao flagelo (NETT *et al.*, 2009). Conforme observado em formas tripomastigotas e, menos evidentemente, em epimastigotas de *T. rangeli*, o sinal de reconhecimento da *TrPTP2* pelo soro policlonal segue um padrão semelhante, alongando-se pelo flagelo, embora fraco em sua extremidade distal.

Havendo na região do flagelo de *T. brucei* proteínas moduladas pela fosforilação específica em resíduos de tirosina, é possível que em organismos filogeneticamente relacionados, como *T. cruzi*, *T. rangeli* e espécies de *Leishmania*, algo semelhante possa ser encontrado. Assim, a detecção da *TrPTP2* na região do flagelo é bastante instigante, uma vez que a concentração de proteínas moduladas por fosforilação específica em resíduos de tirosina provavelmente requer a atividade de tirosina quinases bem como de tirosina fosfatases.

Corroborando os resultados das imunofluorescências em *T. rangeli*, o ensaio realizado em *T. cruzi* revelou uma concentração da proteína também na região do flagelo. Curiosamente, nas formas epimastigotas de *T. cruzi* o sinal de reconhecimento pelo soro policlonal é mais forte no corpo basal e flagelo do protozoário do que no

corpo celular, enquanto que em uma forma tripomastigota observada o sinal parece estar distribuído igualmente entre corpo celular e flagelo. Entretanto, poucas inferências podem ser feitas a respeito desses resultados, pois os ensaios de *Western blot* utilizando o soro anti-TrPTP2 mostraram não haver reconhecimento de qualquer proteína no extrato protéico total de *T. cruzi*. Uma das possíveis razões para o *Western blot* ter sido negativo e a imunofluorescência positiva para *T. cruzi* é a utilização de maiores quantidades do soro policlonal na segunda, o que pode induzir a um reconhecimento cruzado com outras proteínas do parasito. Além disso, é ainda possível que o soro anti-TrPTP2 reconheça epítomos estruturais, presentes no parasito íntegro utilizado na imunofluorescência, mas não no extrato protéico desnaturado utilizado para os ensaios de *Western blot*.

6 CONCLUSÕES

- A análise da sequência aminoacídica deduzida da *TrPTP2* revelou a presença de um domínio transmembrana na porção C-terminal, além de dois sítios para N-glicosilações, seis para N-miristoilações e cinco para fosforilações, não tendo sido observados sinais de adição a âncoras de GPI.
- A expressão heteróloga do gene da *TrPTP2* em *E. coli* foi obtida com sucesso, sendo a proteína recombinante detectada na fração insolúvel do extrato bacteriano e purificada através de eletroeluição.
- Soros policlonais dirigidos à *TrPTP2* recombinante, produzidos em camundongos BALB/c, revelaram-se específicos na diferenciação *T. rangeli* / *T. cruzi* em ensaios de *Western blot*.
- Ensaios de *Western blot* revelaram que a *TrPTP2* apresenta cerca de 60kDa em *T. rangeli* e está presente tanto em formas epimastigotas como em formas tripomastigotas diferenciadas *in vitro*.
- A imunofluorescência indireta apontou para uma localização da *TrPTP2* distribuída pela membrana de todo o corpo celular nas formas epimastigotas de *T. rangeli* e concentrada na membrana flagelar nas formas tripomastigotas infectantes.

7 PERSPECTIVAS

A realização deste estudo com uma PTP de *T. rangeli* mostrou o quanto ainda se tem para pesquisar e compreender a respeito dessas enzimas em tripanosomatídeos. Embora atividades tirosina fosfatásicas já tenham sido amplamente medidas utilizando tripanosomatídeos vivos, não se sabe quantas e quais proteínas são responsáveis por essas atividades. Nesse contexto, um importante passo subsequente a este estudo será avaliar a *TrPTP2* recombinante quanto à sua atividade, isoladamente e em comparação com os resultados já obtidos para a atividade tirosina fosfatásica total na superfície de *T. rangeli*.

A caracterização funcional e estrutural da *TrPTP2* em *T. rangeli* abre caminho e pode ser utilizada como modelo para a realização de mais estudos acerca dessas enzimas, cujos papéis são diversificados e fundamentais para o ciclo biológico de tripanosomatídeos. Assim, simultaneamente à realização deste estudo e através da mesma metodologia, a PTP de *T. cruzi* (*TcPTP2*) foi também expressa heterologicamente em *E. coli* e purificada por eletroeluição. A realização de ensaios de *Western blot* e imunofluorescência, após produção de antissoro contra a *TcPTP2* recombinante, possibilitará uma comparação direta com os resultados obtidos para a *TrPTP2*.

A recente publicação do transcriptoma do *T. rangeli* (GRISARD *et al.*, 2010) não excluiu a possibilidade de existência de genes associados à produção de RNAi, ausentes em *T. cruzi* e presentes em *T. brucei*. Uma vez que a importância do papel da *TbPTP1* pôde ser esclarecida para *T. brucei* quando a mesma foi removida por RNAi (SZÖÖR *et al.*, 2006), caso o *T. rangeli* de fato possua mecanismos para produção de RNAi, estudos semelhantes poderão ser realizados com a *TrPTP2*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA SALGADO, L.S. Comparação de diferentes metodologias na identificação do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* em amostras de tripanosomatídeos de Honduras. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 108 p., 1988.
- AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J.; CAPRON, A. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **J Parasitol**, v. 65, p. 507-514, 1979.
- AGUIRRE-GARCÍA, M.M.; ANAYA-RUIZ, M.; TALAMAS-ROHANA, P. Membrane-bound acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica* has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells. **Parasitology**, v. 126, p. 195-202, 2003.
- AGUIRRE-GARCÍA, M.M.; ESCALONA-MONTANO, A.R.; BAKALARA, N.; PEREZ-TORRES, A.; GUTIERREZ-KOBEH, L.; BECKER, I. *Leishmania major* : detection of membrane-bound protein tyrosine phosphatase. **Parasitology**, v. 132, p. 641-649, 2006.
- AHMAD, F.; GOLDSTEIN, B.J. Alterations in specific protein-tyrosine phosphatases accompany insulin resistance of streptozotocin diabetes. **Am J Physiol**, v. 268, p. E932-940, 1995.
- ALONSO, A.; ROJAS, A.; GODZIK, A.; MUSTELIN, T. The dual-specific protein tyrosine phosphatase family. **Top Curr Gen**, v. 5, p. 333-358, 2004.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANDREEVA, A.V.; KUTUZOV, M.A. Protozoan protein tyrosine phosphatases. **Int J Parasitol**, v. 38, p. 1279-1295, 2008.
- AOYAMA, H.; SILVA, T.M.A.; MIRANDA, M.A.; FERREIRA, C.V. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, v. 26, p. 896-900, 2003.
- BAKALARA, N.; SANTARELLI, X.; DAVIS, C.; BALTZ, T. Purification, cloning, and characterization of an acidic ectoprotein phosphatase differentially expressed in the infectious bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. **J Biol Chem**, v. 275, p. 8863-8871, 2000.
- BAKALARA, N.; SEYFANG, A.; BALTZ, T.; DAVIS, C. *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*: life cycle-regulated protein tyrosine phosphatase activity. **Exp Parasitol**, v. 81, p. 302-312, 1995.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr Opin Biotechnol**, v. 10, p. 411-421, 1999.
- BAYER-SANTOS, E. Caracterização molecular preliminar e estudo da variabilidade do gene da proteína tirosina fosfatase (*TrPTP1*) de *Trypanosoma rangeli*. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 50 p., 2007.
- BONALDO, M.C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J Cell Biol**, v. 106, p. 1349-1358, 1988.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRENCHLEY, R.; TARIQ, H.; MCELHINNEY, H.; SZOOR, B.; HUXLEY-JONES, J.; STEVENS, R.; MATTHEWS, K.; TABERNERO, L. The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. **BMC Genomics**, v. 8, p. 434, 2007.
- COOL, D.E.; BLUM, J.J. Protein tyrosine phosphatase activity in *Leishmania donovani*. **Mol Cell Biochem**, v. 127-128, p. 143-149, 1993.
- COSENTINO-GOMES, D.; RUSSO-ABRAHAO, T.; FONSECA-DE-SOUZA, A.L.; FERREIRA, C.R.; GALINA, A.; MEYER-FERNANDES, J.R. Modulation of *Trypanosoma rangeli* ecto-phosphatase activity by hydrogen peroxide. **Free Radic Biol Med**, v. 47, p. 152-158, 2009.
- CUBA CUBA, A. Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 31, p. 207-220, 1998.
- CUERVO, C.; LOPEZ, M.C.; PUERTA, C. The *Trypanosoma rangeli* histone H2A gene sequence serves as a differential marker for KP1 strains. **Infect Genet Evol**, v. 6, p. 401-409, 2006.
- DELL, K.R.; ENGEL, J.N. Stage-specific regulation of protein phosphorylation in *Leishmania major*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 64, p. 283-292, 1994.
- DEN HERTOOG, J.; OSTMAN, A.; BOHMER, F.D. Protein tyrosine phosphatases: regulatory mechanisms. **FEBS J**, v. 275, p. 831-847, 2008.
- DICK, C.F.; DOS-SANTOS, A.L.; FONSECA-DE-SOUZA, A.L.; ROCHA-FERREIRA, J.; MEYER-FERNANDES, J.R. *Trypanosoma rangeli*: differential expression of ecto-phosphatase activities in response to inorganic phosphate starvation. **Exp Parasitol**, v. 124, p. 386-393, 2010.
- DING, X.L.; HUSSEMAN, J.; TOMASHEVSKI, A.; NOCHLIN, D.; JIN, L.W.; VINCENT, I. The cell cycle Cdc25A tyrosine phosphatase is activated in degenerating postmitotic neurons in Alzheimer's disease. **Am J Pathol**, v. 157, p. 1983-1990, 2000.
- DUTRA, P.M.; COUTO, L.C.; LOPES, A.H.; MEYER-FERNANDES, J.R. Characterization of ecto-phosphatase activities of *Trypanosoma cruzi*: a comparative study between Colombiana and Y strains. **Acta Trop**, v. 100, p. 88-95, 2006.
- ERSFELD, K.; GULL, K. Targeting of cytoskeletal proteins to the flagellum of *Trypanosoma brucei*. **J Cell Sci**, v. 114, p. 141-148, 2001.
- FERREIRA, L.R.; DOSSIN FDE, M.; RAMOS, T.C.; FREYMULLER, E.; SCHENKMAN, S. Active transcription and ultrastructural changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **An Acad Bras Cienc**, v. 80, p. 157-166, 2008.
- FONSECA-DE-SOUZA, A.L.; DICK, C.F.; DOS SANTOS, A.L.; FONSECA, F.V.; MEYER-FERNANDES, J.R. *Trypanosoma rangeli*: a possible role for ecto-phosphatase activity on cell proliferation. **Exp Parasitol**, v. 122, p. 242-246, 2009.
- FREISS, G.; VIGNON, F. Antiestrogens increase protein tyrosine phosphatase activity in human breast cancer cells. **Mol Endocrinol**, v. 8, p. 1389-1396, 1994.

- GAITS, F.; LI, R.Y.; RAGAB, A.; SELVES, J.; RAGAB-THOMAS, J.M.; CHAP, H. Implication of a protein-tyrosine-phosphatase in human lung cancer. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 40, p. 677-685, 1994.
- GOMES, S.A.; FONSECA DE SOUZA, A.L.; SILVA, B.A.; KIFFER-MOREIRA, T.; SANTOS-MALLET, J.R.; SANTOS, A.L.; MEYER-FERNANDES, J.R. *Trypanosoma rangeli*: Differential expression of cell surface polypeptides and ecto-phosphatase activity in short and long epimastigote forms. **Exp Parasitol**, v. 112, p. 253-262, 2006.
- GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. In: NEVES, D.P., Ed. **Parasitologia Humana**. Atheneu. 2005.
- GRISARD, E.C.; STEINDEL, M.; GUARNERI, A.A.; EGER-MANGRICH, I.; CAMPBELL, D.A.; ROMANHA, A.J. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 203-209, 1999.
- GRISARD, E.C.; STOCO, P.H.; WAGNER, G.; SINCERO, T.C.M.; ROTAVA, G.; RODRIGUES, J.B.; SNOEIJER, C.Q.; KOERICH, L.B.; SPERANDIO, M.M.; BAYER-SANTOS, E.; FRAGOSO, S.P.; GOLDENBERG, S.; TRIANA, O.; VALLEJO, G.A.; TYLER, K.M.; DÁVILA, A.M.R.; STEINDEL, M. Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. **Mol Biochem Parasitol**, in press, 2010. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2010.06.008
- GUHL, F.; VALLEJO, G.A. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 435-442, 2003.
- HERBIG-SANDREUTER, A. Experimental study of the life cycle of *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920 in warm-blooded animals and in *Rhodnius prolixus*. **Acta Trop**, v. 12, p. 261-264, 1955.
- HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell**, v. 80, p. 225-236, 1995.
- JONES, D.C.; MEHLERT, A.; GUTHER, M.L.; FERGUSON, M.A. Deletion of the glucosidase II gene in *Trypanosoma brucei* reveals novel N-glycosylation mechanisms in the biosynthesis of variant surface glycoprotein. **J Biol Chem**, v. 280, p. 35929-35942, 2005.
- KOERICH, L.B.; EMMANUELLE-MACHADO, P.; SANTOS, K.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective Trypomastigote forms *in vitro*. **Parasitol Res**, v. 88, p. 21-25, 2002.
- LIEBOW, C.; REILLY, C.; SERRANO, M.; SCHALLY, A.V. Somatostatin analogues inhibit growth of pancreatic cancer by stimulating tyrosine phosphatase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, p. 2003-2007, 1989.
- MATSUDA, A.; MATSUZAWA, S.; NAKAMURA, K.; MIZUNO, Y.; KIKUCHI, K. Alterations in activity of protein tyrosine phosphatase SH-PTP1 in autoimmune MRL/mpj-lpr/lpr mice. **J Biochem**, v. 119, p. 329-333, 1996.
- MEIRELLES, R.M.; HENRIQUES-PONS, A.; SOARES, M.J.; STEINDEL, M. Penetration of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitol Res**, v. 97, p. 259-269, 2005.

- NAKAJIMA, A.; MORITA, M.; TAKEMURA, A.; KAMIMURA, S.; OKUNO, M. Increase in intracellular pH induces phosphorylation of axonemal proteins for activation of flagellar motility in starfish sperm. **J Exp Biol**, v. 208, p. 4411-4418, 2005.
- NETT, I.R.; DAVIDSON, L.; LAMONT, D.; FERGUSON, M.A. Identification and specific localization of tyrosine-phosphorylated proteins in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryot Cell**, v. 8, p. 617-626, 2009.
- PARODI, A.J. N-glycosylation in trypanosomatid protozoa. **Glycobiology**, v. 3, p. 193-199, 1993.
- PARODI, A.J. The quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum, a trip from trypanosomes to mammals. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, p. 601-614, 1998.
- PARSONS, M.; RUBEN, L. Pathways involved in environmental sensing in trypanosomatids. **Parasitol Today**, v. 16, p. 56-62, 2000.
- PARSONS, M.; VALENTINE, M.; DEANS, J.; SCHIEVEN, G.L.; LEDBETTER, J.A. Distinct patterns of tyrosine phosphorylation during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 45, p. 241-248, 1991.
- PEREIRA DA SILVA, L.H.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa do *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clin Bio**, v. 20, p. 191-207, 1953.
- RALSTON, K.S.; KABUTUTU, Z.P.; MELEHANI, J.H.; OBERHOLZER, M.; HILL, K.L. The *Trypanosoma brucei* flagellum: moving parasites in new directions. **Annu Rev Microbiol**, v. 63, p. 335-362, 2009.
- SAKURAI, T.; SUGIMOTO, C.; INOUE, N. Identification and molecular characterization of a novel stage-specific surface protein of *Trypanosoma congolense* epimastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 161, p. 1-11, 2008.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, New York. 2001.
- SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Trop Med Parasitol**, v. 38, p. 323-327, 1987.
- SNAPP, E.L.; LANDFEAR, S.M. Cytoskeletal association is important for differential targeting of glucose transporter isoforms in *Leishmania*. **J Cell Biol**, v. 139, p. 1775-1783, 1997.
- STOCO, P.H. Caracterização das DNA topoisomerasas II de *Trypanosoma rangeli*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 162 p., 2010.
- STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GURTLER, R.E.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J Clin Invest**, v. 118, p. 1301-1310, 2008.
- SZÖÖR, B.; WILSON, J.; MCELHINNEY, H.; TABERNERO, L.; MATTHEWS, K.R. Protein tyrosine phosphatase *TbPTP1*: A molecular switch controlling life cycle differentiation in trypanosomes. **J Cell Biol**, v. 175, p. 293-303, 2006.
- TABERNERO, L.; ARICESCU, A.R.; JONES, E.Y.; SZEDLACSEK, S.E. Protein tyrosine phosphatases: structure-function relationships. **FEBS J**, v. 275, p. 867-882, 2008.

TONKS, N.K. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, p. 833-846, 2006.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: mouse model for high, sustained parasitemia. **J Parasitol**, v. 71, p. 409-414, 1985.

VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; SCHAUB, G.A. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. **Acta Trop**, v. 110, p. 137-147, 2009.

VICKERMAN, K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. **Br Med Bull**, v. 41, p. 105-114, 1985.

WRIGHT, M.H.; HEAL, W.P.; MANN, D.J.; TATE, E.W. Protein myristoylation in health and disease. **J Chem Bio**, v. 3, p. 19-35, 2010.

ZUÑIGA, C.; PALAU, T.; PENIN, P.; GAMALLO, C.; DE DIEGO, J.A. Characterization of a *Trypanosoma rangeli* strain of Colombian origin. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 523-530, 1997.

9 APÊNDICES

Trabalhos apresentados em reuniões e congressos no período de fevereiro de 2007 a julho de 2010, durante o estágio no Laboratório de Protozoologia.

Apêndice 1

Trabalho apresentado na XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia e XXXIV Reunião Anual sobre pesquisa básica em Doença de Chagas, realizada no período de 5 a 7 de novembro de 2007, em Caxambu, MG.

Apêndice 2

Trabalho apresentado na XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia e XXXV Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, realizada no período de 27 a 29 de outubro de 2008, em Águas de Lindóia, SP.

Apêndice 3

Trabalho apresentado em:

- XIX Seminário de Iniciação Científica da UFSC, realizado nos dias 21 e 22 de outubro de 2009, em Florianópolis, SC.
- XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia e II Encontro de Parasitologia do Mercosul, realizado no período de 26 a 30 de outubro de 2009, em Foz do Iguaçu, PR.
- VII Curso de Verão em Biologia Celular e Molecular da USP, realizado no período de 17 a 30 de janeiro de 2010, em Ribeirão Preto, SP. Trabalho selecionado para apresentação oral e contemplado com o Prêmio Lucien Lison (1º lugar).

PCR Isolation of Microsatellite Arrays (PIMA) and Analysis of Frequency and Density of Microsatellite repeats in *Trypanosoma rangeli* Coding Sequences

Thaís Cristine Marques Sincero, Elisa Beatriz Prestes, Ethel Bayer Santos,
Edmundo Carlos Grisard

Microsatellites, or simple sequence repeats (SSRs), consist of tandem repeats of a short nucleotide sequence (1-6bp) which evolve through mutational processes such as replication slippage, point mutation, and recombination. Also, SSRs show high levels of polymorphisms and Mendelian co-dominant inheritance which along their good stability under laboratory conditions and high detection sensitivity make SSRs a promising genetic marker for studies involving genetic variability and population genetics, genotype identification and discrimination. Regarding pathogenic trypanosomatids, SSRs have been identified in *T. brucei* and used in recognition and profiling of *T. cruzi* major phylogenetic lineages, but not in *T. rangeli*. In the present study we have used available *T. rangeli* CDS or EST/ORESTES sequences to study the frequency and density of various types of microsatellites. Also, PIMA methodology was used to identify novel microsatellite arrays from *T. rangeli* genomic DNA. All data were analyzed by TRF and TRAP softwares, limiting repeat units to 1-6bp. Around 1.6Mb of both coding and non-coding sequences from epimastigotes and trypomastigote forms of SC-58 and Choachi strains were analyzed, among which was possible to identify 207 distinct SSRs varying from 1 to 445 the total number of repeat loci. The SSRs frequency was of 1/1.44Kb and 1/1.19Kb for SC-58 and Choachi strains, respectively. Hexanucleotide repeats (~30% for both strains) are the most abundant class of SSRs, following monomeric (21%), trimeric (19%) and dimeric/pentameric (9-11%) repeats with no significant variation between the strains. Furthermore, A-rich repeats are predominant in each of SSR type, whereas G-rich repeats are rare in the coding regions (except for trimeric repeats). After stability analysis, the ongoing genotyping of the herein identified microsatellites could be useful in addressing *T. rangeli* population genetics for better understanding of the parasite spreading pattern and co-evolution with *T. cruzi*. Supported by CNPq, CAPES and UFSC.

Assessing the Genetic Population Structure of *Trypanosoma rangeli* by Microsatellite Genotyping

Thaís Cristine Marques Sincero, Elisa Beatriz Prestes, Edmundo Carlos Grisard

Microsatellite repeats (MS) occurs in a variety of genomes and are due mutational processes such as replication slippage, point mutations and/or recombination events. Presenting a co-dominant Mendelian inheritance, their size and structure are highly informative for genetic analyzes. Despite the importance of *T. rangeli* on *T. cruzi* diagnosis and epidemiology, MS-based studies have been exclusively carried out on *T. cruzi*. Using a *T. cruzi* MS locus (MCLE-01), we have performed genotyping and analysis of the population structure of 21 *T. rangeli* strains (9 KP1+ and 11 KP1-) from distinct geographical regions. After checking the identity of the locus on the *T. rangeli* genome by sequencing, contigs ranging from 450 to 475bp containing “A” repeats were observed. PCR products of all strains generated with 5’ – labeled primers were analyzed using a MegaBace™ 1000 Genotyping System. A total of seven alleles were observed for the MCLE-01 locus in all *T. rangeli* strains. The presence of one or two peaks for MCLE-01 in distinct *T. rangeli* SC-58 strain clones suggests a diploid genome, as observed for *T. cruzi*. A disequilibrium on the Hardy-Weinberg proportion indicated that KP1- strains showed higher heterozygosity than KP1+ strains, despite their geographical origin. Such observation can be due genetic drift, mutation, gene flow and/or natural selection, but further analyses using other loci are underway to address such hypothesis. Phylogenetic analysis based on the results obtained for the MCLE-01 locus are in agreement with kDNA-based classification of *T. rangeli* lineages. Supported by CNPq, CAPES and UFSC.

Produção de anti-soros murinos contra a Proteína Tirosina Fosfatase de *Trypanosoma rangeli* (TrPTP2)

Elisa Beatriz Prestes, Thaís Cristine Marques Sincero, Patrícia Hermes Stoco,
Edmundo Carlos Grisard

Proteínas tirosina fosfatases (PTP) são responsáveis pela desfosforilação de resíduos de fosfotirosina e têm papel essencial no controle da divisão e da diferenciação celular, encontrando-se associadas às diferentes etapas do ciclo de vida de tripanosomatídeos. Possuindo baixa similaridade com PTP humanas, essas proteínas são promissores alvos para o desenvolvimento de medicamentos. O objetivo deste estudo foi obter a PTP de *Trypanosoma rangeli* (TrPTP2) recombinante a fim de gerar anticorpos poli e monoclonais anti-PTP visando à caracterização dessa proteína do parasito. A partir de DNA genômico da cepa Choachí, o gene da TrPTP2 foi amplificado via PCR e clonado no vetor de expressão pET-14b, tendo sua presença e correta orientação confirmadas por sequenciamento. A expressão heteróloga da proteína foi realizada em células BL21(DE3) e, quase que na totalidade, revelou estar na fração insolúvel do extrato protéico total, o que está de acordo com a predição de uma elevada constituição aminoacídica hidrofóbica (81,75%). Após purificação por eletroeluição, a TrPTP2 recombinante foi utilizada em um esquema de imunização de camundongos albinos, consistindo de três imunizações com 10 dias de intervalo entre si, com adição de adjuvante. A reatividade dos soros policlonais anti-TrPTP2 foi avaliada através de ELISA, revelando que todos os animais apresentavam elevados títulos de anticorpos (>1:25.000). O soro com maior título (1:100.000) foi ainda testado através de *Western Blot* contra a TrPTP2 recombinante, revelando o reconhecimento de um fragmento de aproximadamente 37KDa. O fragmento foi também reconhecido no extrato total de *T. cruzi* (cepa Y), não tendo sido reconhecida nenhuma proteína no extrato de células BL21(DE3). Ensaios de *Western Blot* utilizando-se o extrato protéico de diferentes cepas e formas de *T. rangeli*, assim como de organismos filogeneticamente relacionados como *T. cruzi* e *Leishmania* sp., estão em andamento e anticorpos monoclonais serão produzidos a partir dos baços dos camundongos. Financiado por UFSC, FINEP, CNPq e CAPES.