



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

**Caracterização bioquímica e citolocalização de
uma Serina/Treonina Fosfatase – PP2C de
*Trypanosoma cruzi***

Rauciane Gomes

Ceilândia – DF

2014

Rauciane Gomes

**Caracterização bioquímica e citolocalização de
uma Serina/Treonina Fosfatase – PP2C de
*Trypanosoma cruzi***

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado à Universidade de Brasília -
Faculdade de Ceilândia como requisito parcial
à obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Dra. Flávia da Silva Nader Motta

Co-orientador: Dr. Sébastien Olivier Charneau

Ceilândia – DF

2014

Rauciane Gomes

**Caracterização bioquímica e citolocalização de
uma Serina/Treonina Fosfatase –PP2C de
*Trypanosoma cruzi***

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Flávia da Silva Nader Motta

Convidado(a): Dra. Carine Royer

Convidado(a): Dra. Raquel Silva de Negreiros

Ceilândia – DF

2014

Primeiramente a Jesus Cristo, meu único e suficiente Salvador. A meus pais Ademir e Sônia que sempre me apoiaram e estiveram do meu lado. A minha irmã Raielli e a meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Jesus Cristo que me concedeu essa oportunidade quando eu mesmo achei não ser possível, realizando em mim suas promessas, pela sua infinita misericórdia.

Agradecer aos meus pais Ademir e Sônia e irmã Raielli por serem tão maravilhosos, ajudando-me em tudo que precisei. Contribuindo para meu sucesso.

Gostaria de agradecer também aos meus professores, amigos e colegas do Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro (UnB) e do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteína (UnB) que muito me ajudaram. Tirando minhas dúvidas e sempre prestativos para me auxiliar nos experimentos. Em especial a meus orientadores Flávia Nader Motta e Sébastien Charneau, pessoas maravilhosas, que Deus colocou no meu caminho para me ensinar e contribuir para meu crescimento profissional e pessoal.

APOIO FINANCEIRO

Este projeto foi desenvolvido graças ao apoio financeiro da Universidade de Brasília (UnB) e das agências de fomento à pesquisa brasileira, a CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, o CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos e especificamente os programas: Cooperação franco-brasileira CAPES-COFECUB (723/11), Rede Pró-Centro-Oeste (FAPEG / CNPq 563998/2010-4 e 563998/2010-5), e Incentivo a Pesquisa em Parasitologia Básica (CAPES 23038.005298/2011-83).

RESUMO

A doença de Chagas apresenta o *Trypanosoma cruzi* como seu agente etiológico. Ao longo de seu ciclo de vida complexo, o parasita possui quatro formas principais de desenvolvimento: epimastigota, tripomastigota metacíclico, tripomastigota sanguíneo e amastigota. As manifestações clínicas da doença podem ser divididas em três fases: aguda, fase crônica indeterminada e fase crônica digestiva e/ou cardíaca. As formas de transmissão podem ser vetorial, por transfusão sanguínea, doação de órgãos sólidos, por alimentos e bebidas contaminados e outros. Atualmente o tratamento baseia-se nos medicamentos Benzonidazol e Nifurtimox. Existem diversas classes de proteínas implicadas na diferenciação celular e dentre elas podemos destacar as fosfatases. Para este trabalho foram propostas a clonagem, a expressão heteróloga, a purificação em coluna de Agarose/Níquel²⁺, a citolocalização em diferentes formas evolutivas e a caracterização bioquímica da proteína Serina/Treonina fosfatase-PP2C. A proteína TcPP2C foi expressa, na sua forma recombinante, na fração solúvel (3h a 20°C). Purificamos a proteína recombinante, sendo a TcPP2C eluída em uma concentração de 20-30mM de Imidazol. Testes de atividade enzimática para a TcPP2C com o substrato p-nitrofenilfosfato mostraram a proteína ativa somente na presença de íons divalentes, em maior grau na presença de manganês em comparação com magnésio. A enzima apresenta maior atividade na presença de DTT e a pH 7,5. Os ensaios de imunofluorescência indicam uma localização pontual da TcPP2C na forma epimastigota, difusa em amastigota e não identificada em tripomastigota. Esses dados experimentais mostraram que a enzima recombinante possui as características bioquímicas da subfamília PP2C importante para a sinalização celular, e que a nativa está presente nas formas de vida replicativas do *T. cruzi*. TcPP2C poderia estar principalmente envolvida nas vias de sinalização da divisão celular e da amastigogênese.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Amastigogênese, Proteína Serina/Treonina Fosfatase- PP2C, Caracterização de proteínas recombinantes

ABSTRACT

Chagas disease presents *Trypanosoma cruzi* as its etiological agent. During its complex life cycle, the parasite has four main forms of development: epimastigote, metacyclic trypomastigote, blood trypomastigote and amastigote. The clinical manifestations of the disease can be divided into three phases: acute, indeterminate chronic phase and digestive and / or cardiac chronic phase. The forms of parasite transmissions can be by vector feces, blood transfusion, solid organ donation, contaminated food and drinks and others. Currently, the disease's treatment is based on the drugs Benznidazole and Nifurtimox. There are several classes of proteins implicated in cell differentiation and among them we can highlight the phosphatases. For this work, we proposed the initial study of a serine / threonine protein phosphatase-PP2C from *T. cruzi* – TcPP2C. The enzyme was cloned, expressed in a heterologous system and purified on a column of Agarose / + Níquel² for further tests. Its citolocalization was determined at different developmental forms of the parasite and some biochemical features of the enzyme was proposed. The TcPP2C protein was expressed active in the soluble fraction of the bacteria (3h at 20 ° C). TcPP2C enzymatic activity tests with the substrate p-nitrophenyl phosphate was carried out in the presence of divalent ions, to a greater extent in the presence of manganese compared with magnesium. TcPP2C enzymatic activity is dependent of DDT and is optimal at pH 7.5. Immunofluorescence assays indicate a specific location of TcPP2C in the epimastigote form, diffuse location in the amastigote and it was not identified in trypomastigote forms. These experimental data showed that the recombinant enzyme has the biochemical characteristics of the subfamily PP2C. In a general way, this protein is important for cell signaling, and since it is present in native forms of replicative life of *T. cruzi*, TcPP2C could be primarily involved in signaling pathways and amastigogenesis.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, amastigogenesis, Protein Serine/Threonine Phosphatase- PP2C, Characterization of recombinant proteins.

ABREVIATURAS

Células NK - Células *Natural Killer*
DMEM - Meio Eagle modificado por Dulbecco
DTT - Dithiothreitol
ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
GIPs - Glicoinositol Fosfolipídeos
GP 35/50 - Glicoproteína 35/50
GP82 - Glicoproteína 82
GPI - Glicosilfosfatidilinositol
HAI - Hemaglutinação Indireta
IFI - Imunofluorescência Indireta
IFN γ - Interferon Gama
IgG - Imunoglobulina G
IgM - Imunoglobulina M
IL10 Interleucina 10
IL2 - Interleucina 2
IL4 - Interleucina 4
IPTG - Isopropil β -D-Tiogalactopiranosídeo
LcPP2C - PP2C de *Leishmania chagasi*
LIT - *Liver Infusion Tryptose*
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PfEF1 - Fator de transcrição 1 de *P. Falciparum*
pNPP - Fosfato ligado ao p-Nitrofenil
PP2C-hn - PP2C hospedeiro nuclear de *T. gondii*
PTMP - PP2C Mitocondrial
SFB - Soro Fetal Bovino
TcPP2C - PP2C de *Trypanosoma cruzi*
TNF α - Fator de Necrose Tumoral alfa

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Teste de atividade da TcPP2Crec na presença de pNPP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Figura 2 – Análise em gel de agarose 0,8%

Figura 3 – Sequência do gene *Tcpp2C* e da proteína

Figura 4 – Análise da PCR de colônia em gel de agarose 0,8%

Figura 5 – Análise em gel SDS-Page 12% corado com Coomassie Blue

Figura 6 – Análise em gel SDS-Page 12% corado com Coomassie Blue

Figura 7 – Purificação em coluna de Agarose/Níquel²⁺

Figura 8 – *Western Blot*

Figura 9 – *Western Blot* de extratos de Epimastigotas

Figura 10 - Citolocalização

SUMÁRIO

1.Introdução	12
1.1 Ciclo de vida	12
1.2 Insetos vetores e animais reservatórios	13
1.3 Manifestações clínicas da doença de Chagas	14
1.4 Formas de transmissão	16
1.5 Diagnóstico.....	17
1.6 Tratamento	18
1.7 Algumas moléculas para a interação celular	19
1.8 Proteínas Serina/Treonina Fosfatase – PP2C.....	20
2.Justificativa.....	21
3.Objetivos gerais e específicos.....	22
4.Metodologia.....	22
4.1 Cultura e obtenção de parasitos.....	22
4.2 Clonagem do gene de interesse.....	22
4.3 Expressão heteróloga e purificação da enzima de interesse	23
4.4 Teste de atividade com a proteína recombinante	23
4.5 Ensaio de imunofluorescência (IFA) - citolocalização	24
5.Resultados e Discussão	24
6.Conclusão	32
7.Referências Bibliográficas	33

1.Introdução

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. O primeiro caso a ser estudado pelo pesquisador Carlos Chagas quando estava em missão designada por Osvaldo Cruz a Lassance, norte de Minas Gerais - Brasil, para combater casos de malária em habitantes desta população. Em 1909, a doença de Chagas foi descrita a Academia Nacional de Medicina (ICC-Fiocruz, 2014) e, desde então, muitos outros casos foram descobertos e estudados chegando atualmente a uma incidência anual de 28.000 casos nas Américas, com aproximadamente 6 a 8 milhões de pessoas infectadas, 12.000 mortes por ano e 65 milhões de pessoas vivem em áreas de risco nas Américas. (PAHO/WHO, 2014).

1.1 Ciclo de vida

Ao longo do ciclo de vida do parasito, o *T. cruzi* se diferencia em quatro estágios principais, assim, possui variações morfológicas e funcionais, alternando entre estágios que sofrem divisão binária e as formas não replicativas e infectante. Entre as formas replicativas estão incluídos os epimastigotas presentes no tubo digestivo do inseto vetor e amastigotas no interior das células de mamíferos. Enquanto as formas infectantes, os tripomastigotas metacíclicos são encontrados nas fezes e urina do inseto vetor e os tripomastigotas circulantes estão localizados no sangue de mamíferos (Souza, 1984).

Após a eliminação de fezes e urina pelo inseto vetor, contendo a forma tripomastigota metacíclica, estes parasitos podem interagir com as células de seu hospedeiro vertebrado e iniciar a infecção. Dentro das células do hospedeiro, os tripomastigotas transformam-se em amastigotas, sendo capazes de se multiplicar por divisão binária e diferenciar-se então em tripomastigota circulante (tripomastigota sanguíneo). Ao processo de diferenciação de tripomastigota em amastigota, denomina-se amastigogênese. Ela ocorre na natureza preferencialmente no interior das células hospedeiras, embora na fase aguda da infecção ocorram formas amastigotas extracelulares (Souza, 1984; Souza, Carvalho & Barrias, 2010).

Uma vez na circulação sanguínea, o parasito pode ser ingerido pelo vetor durante o repasto sanguíneo. Quando estas formas tripomastigotas estão dentro do

trato digestivo do inseto sofrem uma série de mudanças, diferenciando-se em epimastigotas, passam por divisão binária e transformam-se em tripomastigotas metacíclicas. (Souza, 1984). A figura 1 exemplifica o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* com suas diferentes formas de vida em seus hospedeiros.

**DOENÇA DE CHAGAS:
TRIPANOSSOMÍASE AMERICANA**

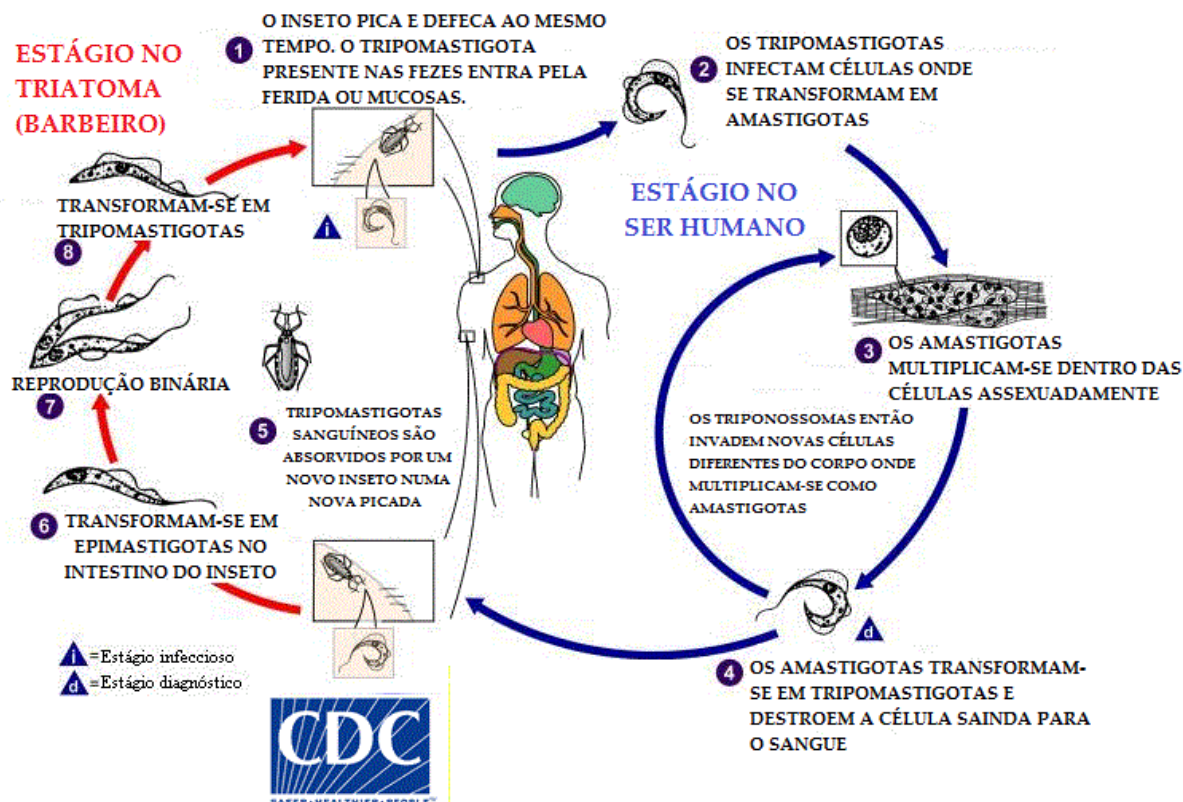


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

1.2 Insetos vetores e animais reservatórios

Dentre as espécies de insetos vetores transmissores da doença no Brasil temos *Triatoma infestans*, *T. rubrofasciata*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius neglectus*, *R. nasutus*, *Triatoma rubrovaria* e *T. vitticeps* (Tartarotti, Azeredo-Oliveira & Ceron, 2004).

Mudanças no ciclo selvagem dos vetores da doença de Chagas, como do *T. infestans*, devido a desmatamentos e destruição de seu habitat natural, levaram-no a procurar outras regiões para obtenção de alimento e reprodução. Com isso, outros animais passaram a serem utilizados para o repasto sanguíneo, permitindo a

possibilidade desses passarem a ser novos focos de infecção ou reservatório das formas parasitárias (Coura & Borges-Pereira, 2010).

Existem ao menos duas hipóteses para tentar explicar como os vetores passaram a frequentar o domicílio humano e, conseqüentemente, terem maiores chances de infectá-lo. A primeira diz respeito ao fato de ao se trazer as madeiras e materiais provenientes do desmatamento para a construção de casas, traz-se junto os insetos vetores de forma passiva. E a segunda hipótese seria que ao destruir o ambiente silvestre, os insetos viram-se obrigados a procurar novos nichos, aproximando-se dos domicílios humanos (Coura & Borges-Pereira, 2010).

Alguns animais podem ser parasitados pelo *T. cruzi*, despertando um importante papel epidemiológico como reservatórios deste parasita. Dentre estas espécies encontra-se *Didelphis marsupialis*, *Philander opossum*, *Metachirus sp.* e *Marmosa cinerea* (marsupiais); *Dasybus novemcinctus* (tatu); *Tamandua tetradactyla* (tamandua); *Nectomys squamipes* (roedor); *Tayra barbara* (mustelídeo); *Saimiri sciureus* (macaco), e espécies de morcego (Lainson, Miles & Draper, 1979).

1.3 Manifestações clínicas da doença de Chagas

Alguns fatores influenciam para o sucesso da infecção, tais como: cepa; número de parasitos infectantes presentes na invasão celular; interação entre moléculas durante a invasão e multiplicação e a resposta imunológica do hospedeiro vertebrado. Uma vez que a infecção foi bem sucedida, a resposta inflamatória é estimulada no local da inoculação levando a sinais característicos como sinal de Romaña. Após esse processo inicial, os tripomastigotas podem se espalhar pela circulação sanguínea e atingir outros órgãos, infectando-os onde irão formar ninhos de amastigotas (Coura & Borges-Pereira, 2010).

Existe certo tropismo por parte do *T. cruzi* a órgãos como coração, esôfago e cólon. A presença de ninhos de amastigotas, bem como seus fragmentos ou material genético, podem levar a complicações clínicas, como fibrose, arritmias, cardiomiopatias crônicas, megaesôfago e megacólon. Isso acontece devido a resposta imunológica efetuada pelos linfócitos T do tipo CD4⁺ e CD8⁺, e por interleucinas (IL-2 e IL-4), levando à destruição de células musculares e neurônios, característico de hipersensibilidade tardia. Porém a auto-imunidade da doença de

Chagas que contribui para fase crônica da doença explica apenas em partes este quadro. Sendo necessário destacar a migração de macrófagos e fatores de agregação que influenciam a miocardite chagásica crônica e lesões isquêmicas do miocárdio (Coura & Borges-Pereira, 2010).

As manifestações clínicas da doença de Chagas podem ser divididas em três fases: aguda, fase crônica indeterminada e fase crônica digestiva e/ou cardíaca. A fase aguda pode apresentar-se de forma assintomática ou com sintomas inespecíficos (febre, adenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia e meningoencefalite em casos mais graves). Cabe ao sistema imune inato conter o início da infecção, com auxílio de células *natural killer* (NK), macrófagos e neutrófilos. Estudos demonstram que as moléculas de mucina-GPI estimulam a resposta das células supracitadas e a liberação de citocinas (Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF α) e Interferon gama (IFN γ) possibilitando o controle da parasitemia. A resposta adquirida vem logo em seguida, podendo ainda na fase aguda ser detectada a presença de imunoglobulina M (IgM) seguida de IgG (Andrade, Gollob & Dutra, 2014; Coura & Borges-Pereira, 2010). Alguns pacientes em fase aguda tem sido submetido a eletrocardiograma mostrando algumas alterações já nesta fase (Rassi Jr, Rassi & Rezende, 2012).

Na fase crônica assintomática, acredita-se haver um equilíbrio entre o parasito e seu hospedeiro. A atuação de células do sistema imune e liberação de citocinas, principalmente interleucina 10 (IL-10) contribui para que ocorra este equilíbrio. Nesta fase, os exames radiológicos e o eletrocardiograma apresentam valores normais e não há sintomas, sendo possível encontrar anticorpos anti-*T.cruzi* no soro do paciente (Andrade, Gollob & Dutra, 2014; Coura & Borges-Pereira, 2010).

Na fase crônica, sintomática são observadas complicações como cardiomiopatia chagásica crônica, megacólon e megaesôfago. Os sinais e os sintomas de cardiomiopatia chagásica são arritmias, bloqueios atrioventricular, insuficiência cardíaca, morte súbita e outros. Já com a forma digestiva observamos dificuldades peristálticas, por destruição dos plexos mesentéricos, presença de megacólon e megaesôfago (Coura & Borges-Pereira, 2010).

O dano cardíaco pode ir se acentuando à medida que a doença se cronifica. A cardiomiopatia dilatada, que pode aparecer em fases mais avançadas da doença, apresenta alta mortalidade, com agravos como insuficiência cardíaca, arritmias, bloqueios e eventos trombóticos (Nunes et al., 2013). Na forma digestiva são

observados problemas motores e secretores. Com a cronificação da doença observamos danos nas fibras musculares e nervosas de estruturas como esôfago e cólon. Algumas das consequências do ocorrência de megaesôfago são disfagia, regurgitação e dor. Já os sinais e sintomas dos casos de megacólon podem ser dor, constipação intestinal, cólicas e outros (Rassi Jr, Rassi & Rezende, 2012).

A forma congênita também tem importância clínica porque pode induzir o aborto e a má formação de órgãos (coração e baço) (Coura & Borges-Pereira, 2010; Neves, 2007).

1.4 Formas de transmissão

A transmissão vetorial foi por muito tempo uma importante fonte de disseminação do *T. cruzi*, como por intermédio do inseto hematófago *Triatoma infestans*. No entanto, em 2006, o Ministério da Saúde recebeu da Organização Pan-Americana da Saúde a certificação internacional de eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *T. infestans*. Isso não exime o governo de manter constante vigilância, pois a certificação apenas relata que por ora não estão ocorrendo novos casos da doença para esse tipo exato de transmissão. No entanto, ainda há presença deste inseto em muitas casas e no peridomicílio de várias populações (Ferreira & Silva, 2006).

A transfusão sanguínea também pode ser uma forma de transmissão do *T. cruzi*, tendo em vista que formas tripomastigotas sanguíneas podem ser encontradas no doador, principalmente na fase aguda, quando a parasitemia é alta. A transmissão congênita pode ocorrer majoritariamente em gestantes que se encontram na fase crônica da doença. Também são relatados casos de transmissão do parasito através de transplante de órgãos sólidos (fígado, medula óssea e outros) (Neves, 2007; Rassi Jr, Rassi & Rezende, 2012; Parker & Sethi, 2011).

A via oral é considerada uma importante forma de transmissão, principalmente no Brasil, por meio de alimentos e bebidas contaminados, como açaí e caldo-de-cana. Os alimentos podem estar contaminados, com fezes e urina, contendo formas tripomastigotas metacíclicos, ou durante algum processamento do alimento os vetores são moídos liberando as formas infectantes (Andrade, Gollob & Dutra, 2014). Outras formas menos usuais também podem ser citadas como acidentes de laboratório e

talvez a transmissão sexual, que já foi descrita para camundongos e sugeriu-se esta transmissão em humanos. (Dias e Amato Neto, 2011; Silva, 2013).

1.5 Diagnóstico

Para a realização do diagnóstico da doença de Chagas deve-se escolher o melhor método de acordo com a fase clínica em que se encontra o indivíduo. Na fase aguda, devido à alta parasitemia, exames diretos como exames a fresco (sangue periférico) ou corados com Giemsa são indicados para visualização de formas tripomastigotas no sangue (Rassi Jr, Rassi & Rezende, 2012). Métodos moleculares como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) podem ser realizados como diagnóstico na fase aguda também (Ferrer et al., 2013). Outras técnicas como hemocultura, inoculação e xenodiagnóstico também são indicados para diagnóstico nesta fase, no entanto já estão em desuso (Neves, 2007).

Na fase crônica, a parasitemia diminui portanto os testes sorológicos (presença de Ig) passam a ser os mais indicados, como *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), Hemaglutinação indireta (HAI) e Imunofluorescência Indireta (IFI). Estudo realizado por Araújo & Berne (2013), comparam estes métodos sorológicos e concluem que IFI e HAI podem ter interpretação subjetiva quando os resultados são “fracamente positivos”; os ensaios de ELISA mostraram-se os mais sensíveis; enquanto o HAI apresentou maior especificidade em comparação ao ELISA. Reações cruzadas devem ser levadas em consideração para os testes sorológicos, principalmente para paciente que tiveram contato com *Leishmania sp.* (Araújo & Berne, 2013).

Além da pesquisa do agente etiológico, outros exames médicos como eletrocardiograma e radiológicos podem contribuir para o diagnóstico, mas isso somente na fase crônica da doença. Realização de microhematócrito e investigação microscópica do cordão umbilical ou de sangue periférico da criança é indicado para diagnóstico da doença em casos de suspeita de transmissão congênita. Testes sorológicos não são indicados neste caso, a não ser para presença de IgM anti-*T. cruzi* (Neves, 2007; Rassi Jr, Rassi, Rezende, 2012).

1.6 Tratamento

Atualmente as drogas disponíveis para tratamento desta doença são o Benzonidazol e Nifurtimox, sendo indicados para fase aguda e transmissão congênita. O tratamento da fase crônica limita-se a aliviar os sintomas e tratar as complicações que o paciente apresente. O mecanismo de ação proposto para estes medicamentos é a formação de radicais livres, devido à presença do grupo nitro em suas moléculas, o que permite que estes radicais possam interagir com proteínas, lipídios, material genético e outros (Oliveira et al., 2008).

O Benzonidazol é considerado primeira escolha terapêutica. A administração indicada é de 5-7mg/kg/dia subdivididos em duas doses diárias durante 60 dias. Devido aos vários efeitos adversos decorrente do uso do Nifurtimox ele não é mais comercializado no Brasil (INBEQMeDI, 2014). Estes medicamentos apresentam muitos efeitos adversos, como hipersensibilidade, febre, dermatite esfoliativa, vômitos, náuseas, entre outros. Ambos medicamentos apresentam outros vários efeitos indesejáveis podendo gerar cepas resistentes o que apenas retarda a cronificação da doença, sem expectativa de cura para a fase crônica (Rassi Jr, Rassi & Rezende, 2012). Aconselha-se a realização de hemogramas, testes do perfil hepático e renal para monitoramento do paciente (Parker & Sethi, 2011).

O uso de antifúngico também foi sugerido como alternativa, atuando na membrana do parasito de modo a prejudicar sua síntese de esteróides (Oliveira et al., 2008). As terapias atuais oferecem muitas desvantagens e riscos, portanto a pesquisa de novas formas de tratamento são atuais e estão sendo estudadas para essas doenças negligenciadas. A pesquisa científica busca como alternativa o estudo de extratos vegetais com atividade tripanocida, vacinas de DNA, e também o estudos de novos alvos terapêuticos como base em pesquisas proteômicas e biomoleculares (Ferreira & Silva, 2006; Coura & Borges-Pereira, 2010; Andrade, Gollob & Dutra, 2014).

No caso deste trabalho, propomos o estudo de uma proteína de *T. cruzi* - proteína fosfatase metalo-dependente (PP2C) - que, segundo estudos prévios do nosso grupo, parece estar relacionada com a amastigogênese (Queiroz, 2013).

1.7 Algumas moléculas para a interação celular

Algumas interações moleculares são importantes para o desenvolvimento do ciclo de vida do parasito ou para invasão da célula do hospedeiro, tanto do vertebrado como invertebrado. Tem sido mostrado, por exemplo, que alguns glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) estão envolvidos no processo de fixação das formas epimastigotas no intestino do hospedeiro invertebrado (Souza, Carvalho & Barrias, 2010).

Algumas etapas importantes para o processo de invasão das células de hospedeiro vertebrado são: adesão e reconhecimento, sinalização e invasão. As mucinas presentes na superfície do *T. cruzi*, por exemplo, são glicoproteínas fundamentais para a interação com as células de mamíferos, estimulando a liberação de óxido nítrico nos macrófagos e contribuindo para a liberação de agentes pró-inflamatórios (Acosta-Serrano et al., 2001; Souza, Carvalho & Barrias, 2010). Outra glicoproteína, a Tc85, está presente no protozoário, sendo abundantemente expressa em tripomastigotas, podendo interagir com moléculas da célula hospedeira, tal como fibronectina. Já algumas glicoproteínas como gp82 e gp35/50 demonstram ser bastante imunogênicas e são preferencialmente, produzidas em tripomastigotas metacíclicos (Souza, Carvalho & Barrias, 2010).

Outras moléculas de superfície importantes para processo de invasão das células do hospedeiro vertebrado são as trans-sialidades, proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI). As trans-sialidades interagem com o ácido siálico das células de mamíferos, fazendo com ele seja transferido para glicoconjugados do parasito, como exemplo as mucinas (Schenkman & Eichinger, 1993).

As proteases também possuem um papel importante para o sucesso da invasão do parasito. Dentre elas podemos citar: Cruzipaína, Oligopeptidase B (OPBTc) e Prolil oligopeptidase (POPTc80) (Souza, Carvalho & Barrias, 2010). A primeira degrada albumina sérica, azocaseína e hemoglobina em pH 5 (Cazzulo et al., 1990). Estudos mostram que a POPTc80 é capaz de degradar colágeno humano (I e IV) e também fibronectina, sugerindo que esta enzima pode facilitar a movimentação do parasito pela matriz extracelular do hospedeiro (Bastos et al., 2005). Já a OPBTc é considerada um fator necessário para a invasão celular, por intermédio da geração de um agonista de Ca^{2+} que está envolvido com os lisossomos do hospedeiro (Fernandes et al., 2005).

1.8 Proteínas Serina/Treonina Fosfatase – PP2C

As proteínas Serina/Treonina fosfatases podem ser classificadas em fosfoproteínas fosfatases (PPPs), proteína fosfatase metalo-dependente (PPMs/PP2C), proteína baseada em aspartato ou ainda proteínas tirosina fosfatase (PTPs) (Szöör, 2010). As proteínas PP2C assemelham-se estruturalmente a outras proteínas serina/treonina, mas não em sequência ou sítio catalítico (Wilkes & Doerig, 2008). As PP2C podem ainda ser subdivididas em dois grupos: Grupo I (RXXME/QD) e Grupo II (KXXNED) a depender do motivo que estiver conservado (Joshi et al., 2007).

Há diferenças entre as sequências de pares de bases de PPM de parasitos com as proteínas humanas o que reforça o interesse da pesquisa científica em torná-las alvos quimioterápicos. Em humanos, as PP2C estão envolvidas com crescimento celular, bem como a resposta ao estresse celular (Kutuzov & Andreeva, 2008).

A proteína putativa serina/treonina fosfatase de *T. cruzi* pertence à classe das enzimas dependentes de íons metálicos, principalmente Mn^{2+} e Mg^{2+} . Estudos de caracterização com este grupo de proteínas já foram realizados em *Leishmania chagasi* (LcPP2C) e, segundo os autores, a expressão da LcPP2C está presente em formas promastigotas e amastigotas (Bruns et al., 1993). Para algumas proteínas fosfatases (PPM) acredita-se haver o sítio catalítico e outros domínios que possam exercer outras funções como perceber o nível de cálcio no meio, a exemplo da PP2C de *Arabidopsis thaliana* (Mamoun et al., 1998).

Estudos apontam que uma PP2C de *Toxoplasma gondii* desfosforila o resíduo de serina na posição 53 da proteína toxofilina, sendo esta regulação essencial para o controle da interação entre esta e a actina. São levantadas hipóteses de que a presença do aminoácido arginina na posição 50 da toxofilina e a ausência do aminoácido prolina na posição 60 constituam o motivo de interação desta proteína com a PP2C (Jan et al., 2007).

No trabalho de Gilbert et al., (2007) foi observado que entre as proteínas liberadas pelas roptrias do *T. gondii* durante o processo de invasão celular, encontra-se uma proteína serina/treonina fosfatase (PP2C), sendo então nomeada de PP2C-hn (hospedeiro nuclear). Provavelmente a proteína é liberada no citoplasma e vai em direção ao núcleo da célula hospedeira. Mais estudos precisam ser realizados para

comprovar a localização da PP2C-hn em nível celular, bem como sua participação na infecção. A PP2C-hn possui menor atividade de fosfatase quando comparada com outras PP2C do parasito, levantando a hipótese de que talvez ela apenas se ligue ao sítio de ação das PP2C de modo a inibir sua modulação (Gilbert et al., 2007),

Acredita-se que uma PP2C de *Plasmodium falciparum* esteja envolvida na desfosforilação de um fator de transcrição (PfEF1) (Kutuzov & Andreeva, 2008). A PP2C de *P. falciparum* é composta por duas proteínas unidas e ativas, ou seja, para este protozoário a PP2C é expressa e ativa quando na forma dimérica (Mamoun et al., 1998).

Testes feitos com inibidores de fosfatase como o ácido ocadáico e caliculina A, mostraram que a utilização de 0,25 nM de caliculina A, em tripomastigotas, induziu a transformação dessa forma tripomastigota em amastigota em mais de 95% (Grellier e al., 1999). Enquanto que o ácido ocadáico, remove o fosfato de aminoácidos serina e treonina, inibindo a diferenciação (Gonzalez et al., 2003). Isso significa que as proteínas-alvo de fosforilação/desfosforilação estão implicadas na diferenciação do *T. cruzi*. A fosforilação de proteínas constitui um dos mais importantes tipos de modificação pós-traducional e é bem conhecida como tendo um papel-chave na regulação do ciclo celular e na transdução de sinal.

Os autores Joshi et al., (2007) estudaram uma PP2C mitocondrial (PTMP) de adipócitos. Uma de suas funções seria a regulação do catabolismo de aminoácidos e, na mitocôndria, as proteínas PP2C realizam a desfosforilação de outras enzimas (exemplo: piruvato desidrogenase). Estas PP2C apresentam características semelhantes a proteínas fosfatases de bactérias (SpolIE e SpolIAA) como relatado pelos autores Adler et al., (1997).

2. Justificativa

Devido as complicações clínicas e socio-econômicas que a doença de Chagas pode acarretar e devido às dificuldades de tratamento e a resistência do *T. cruzi* às terapias atuais. A busca por novos alvos terapêuticos, torna-se uma estratégia importante para pesquisa e desenvolvimento de fármacos mais eficazes e seguros. Sabe-se que o perfil de expressão protéica do parasito é característico do seu estágio no ciclo de vida, portanto aprofundar o estudo sobre uma proteína diferencialmente

expressa no processo de amastigogênese pode resultar na identificação de um bom alvo para futuro desenvolvimento de fármacos. Este trabalho está inserido no estudo dos processos celulares de *T. cruzi* desenvolvido nos laboratórios de Interação Patógeno-Hospedeiro e de Bioquímica e Química de Proteínas do departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.

3.Objetivos gerais e específicos

Este trabalho tem por objetivo geral a caracterização bioquímica e funcional de uma proteína putativa Serina/Treonina PP2C de *T. cruzi*. Para tal, propõem-se como objetivo específico as seguintes etapas: clonagem, expressão heteróloga e purificação da proteína recombinante, caracterização bioquímica e citolocalização da enzima em diferentes formas do parasito.

4.Metodologia

4.1 Cultura e obtenção de parasitos

Todos os parasitos foram obtidos da linhagem CL Brener. As formas epimastigotas foram obtidas por cultura em meio LIT (*liver infusion tryptose*) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF), incubados a 28 °C. As formas tripomastigotas e amastigotas foram coletadas a partir da cultura celular em fibroblastos, mantidos em meio Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Andrews & Colli, 1982).

4.2 Clonagem do gene de interesse

O gene de interesse foi amplificado por PCR utilizando iniciadores desenhados a partir da seqüência de DNA disponibilizada nos bancos de dados TcruziDB (<http://tcruzidb.org/tcruzidb/>) e NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). A saber as sequências dos primers são: primer senso (5´-CA/TATG-GGTATACCTCTACCAAAGCCC-3´) e primer anti-senso (5´-C/TCGAG-TTATTCCTGCGTCTGACCTGC-3´). Para a realização da PCR foram

utilizados os seguintes reagentes: DNA (10ng), dNTP (0,2mM), primers (0,5µM cada), Taq DNA polimerase Pfx 50 (1unidade), tampão 10x (1x), e MgSO₄ (0,5mM) e água ultrapura (quantidade suficiente para completar o volume de 50µL). As etapas da PCR foram: 1 minuto a 94°C, 30 ciclos (1 minuto a 94°C, 30 segundos a 54°C e 68°C por 1 minuto e 30 segundos), 10 minuto a 68°C e 4°C por tempo indeterminado). As PCR de colônias foram nas mesmas condições, porém com um volume final de 25µL.

O produto de PCR foi clonado no vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega) e subclonado no vetor de expressão pET-15b (Novagen) para produção da enzima recombinante. As enzimas de restrição utilizadas foram *Xho*I (Promega) e *Nde*I (Promega). Ambas clonagens foram realizadas de acordo com as instruções dos fabricantes.

4.3 Expressão heteróloga e purificação da enzima de interesse

A proteína recombinante foi produzida em *Escherichia coli* BL21(DE3). As bactérias foram incubadas até que o inóculo atingisse uma densidade óptica (OD) a 600nm entre 0,4-0,6, onde então foram induzidas com a presença de Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), em diferentes temperaturas e tempo. Foram testados as diferentes concentrações de IPTG: 1mM, 0,5mM e 0,1mM; nos tempos de 4h, 3h, 2h, 0h e durante a noite toda. Após a indução, as bactérias foram lisadas com BugBuster (Novagen), o extrato total contendo a proteína recombinante foi submetido a cromatografia de afinidade em coluna de Agarose-níquel (Novagen), a 4 °C, eluída com tampão contendo imidazol. Após padronizada da purificação foi utilizada a concentração de 30mM para eluição das frações de interesse.

4.4 Teste de atividade com a proteína recombinante

O teste de atividade com a proteína recombinante (0,03 µg) foi padronizado com o substrato fosfato ligado ao p-nitrofenil (pNPP) a 10mM (Joshi et al., 2007) a 30°C. Foram testadas condições ideais para atividade enzimática com diferentes concentrações dos íons divalentes Magnésio e Maganês, de ditionitroto (DTT) e em diferentes pHs. Para os ensaios de cinética enzimática, o tampão utilizado foi Tris-HCl 20mM pH 7,5 adicionado ou alterado do que haveria de ser testado. Já para avaliar a

atividade em diferentes pH foi utilizado o tampão AMT (100mM de Ácido Acético, 100mM de MES, 200mM de Tris-HCl) ajustado ao pH de interesse.

4.5 Ensaio de imunofluorescência (IFA) - citolocalização

Para determinar a citolocalização da proteína PP2C de *T. cruzi*, formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas do parasito foram fixadas com paraformaldeído 3,7% diluído em PBS por 30 min. Posteriormente, os parasitos foram depositados em lâmina carregada com solução 0,1% poli-Lisina. Em seguida, a lâmina com os parasitos foi permeabilizada com solução de Triton 0,1%. Então, as células foram incubadas com o anticorpo policlonal anti-PP2C de *T. cruzi* na diluição 1:50 por 2 h, seguida de incubação, por 2 h, com anticorpo secundário (*goat anti-mouse IgG antibody*) conjugado com *Alexa Fluor 488* (Invitrogen) diluído 1:400. Após a lavagem com PBS 1X e posteriormente com H₂O milli-Q, foi adicionada uma gota de *ProLong® Gold antifade* com DAPI (Invitrogen) e as lâminas observadas no microscópio de fluorescência.

5.Resultados e Discussão

O gene *Tcpp2C* foi amplificado (Figura 2), e posteriormente clonado no vetor pGEM T-Easy. As sequências do gene e da proteína estudada podem ser analisadas na Figura 3. Observa-se que a amplificação do *Tcpp2C* não foi tão específica, tendo em vista o surgimento de duas bandas no gel (Figura 2A). O produto de amplificação do tamanho esperado de 1224pb obtido a partir da temperatura de enovelamento de 54°C foi ligado ao vetor pGEM T-Easy. A digestão dos plasmídeos (pGEM T-Easy *Tcpp2C*) contendo o vetor de clonagem (3000pb) e o inserto (1224pb) ocorreu adequadamente, com base na quantidade de pares de base que cada um possui, observado através da eletroforese de DNA em gel de agarose (Figura 2B). Após confirmação da clonagem neste vetor, o plasmídeo (pGEM-*Tcpp2C*) foi submetido à digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *NdeI* (Figura 3), assim como o vetor de expressão pET-15b.

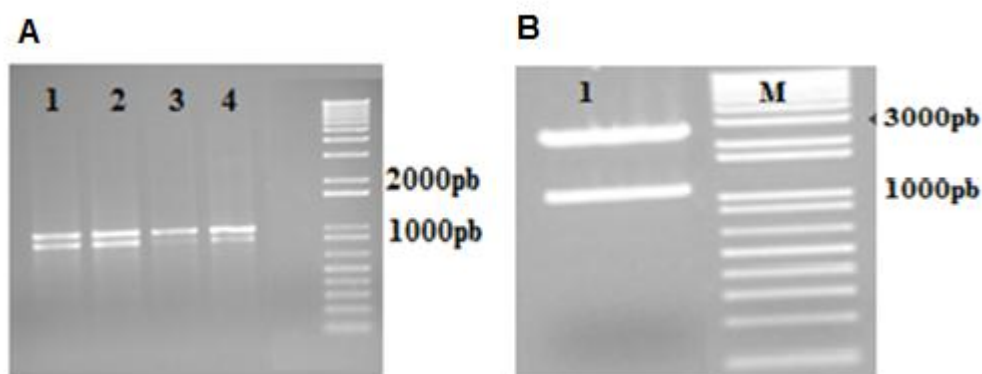


Figura 2. Análise em gel de agarose 0,8%. (A) Amplificação do *Tcpp2C*. Poços 1, 2, 3, e 4 representam respectivamente as temperaturas de anelamento de 58°C, 56°C, 54°C e 52°C referentes a amplificação do gene que codifica a TcPP2C. (B) Digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *NdeI* para confirmação da clonagem no vetor pGEM. (M) Marcador 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Gene Serina/Treonina Fosfatase de *Trypanosoma cruzi*. Cepa CL Brener
(XM_816466-1224 bp)

```

1      ATGGGIATAC CTCTACCAAA GCCCGTTAIG ACACAGCTGC GGGAGCGCCA CGGCAATGAA
61     ATATTCGCT GTGGCTCAAG CTGCGTCAAT GGATTCCGTG AAAGTATGGA AGATGCACAC
121    ATCATATAAC TTCAGCCITGG ATGGGGATTI TTTGGTGTIT TTGACGGCCA TGTCAACGAC
181    CAGTGCTCAC AGTACCTGGA AGGTGCAATG AAGGAAATTC TTGAAAAGGA GAAAATGCCG
241    ATGACGGATG ATCGCATGAA GGAACITGCT TTGGAGATTG ACAAACAATG GATGGACTTA
301    GGCCGAGAAG GCGGCAGCAC CGGTACTTTT TTTGCCGCCA TGAAGAAGGA TGATAAATIT
361    CATTITGCAAG TTGGTAATGT TGGTGATTCT CGCGTICTGG TCTGCGTGAA TGGCCAAGCT
421    AGAGCAATGA CAGAGGATCA CAAGCCTAAC AACAATGATG AGAGACGTCG AATTGAAGAT
481    TGTGGCGGTC GTGTTGAGGG TAATCGTGTI GACGGAAGCC TAGCTGTGAG CCGGGCCTIT
541    GGAGATCGTG ATTACAAAAC CAATACCACT GGTAGCCAAC TACAGCAGAA GGTGATTGCG
601    CITCCGGATG TGACCCATGT GGACTTAACC TGGGGIAGCA AGGACTTITG CGTGTITGTC
661    TCGGATGGCG ITTTCGAGGG TCAATTCAGT AATGAAGAGG TTGTGGAATT TATTAAGTTA
721    CAGCTTGAGA CATCAGAIGA ICTTGCAGTC ATTGCAGGTA GAGTGTGCGA AGAGGCTGTA
781    AATCGCGGTA GTCGCGACAA CGTCTCATGT GTAATCGTTC AATCAAGAG TGGCAAGGAC
841    TACGCGGACA CTGACCACCT TGAGGTAGTC CCAGGACCAT TTAGCCTGCC TAAAAATGGT
901    GTTTTCCGCA AAGTATATGG CATCATGGCG CAGAAGGCAG GCTGTACAAT TCACGAGGTC
961    CTAGAAAAGC GTTACGACCA GCTTGTITTC ATGGACAAAAG AGCTTTTGTCA GGAGGAGTGG
1021   CAATGGTITCA AGGGCGGACC GCCTGCCAGC TTGAAGGGGA AGGATCGCAC ACAGTGGTIT
1081   GCCGACCTGT TGGAGCAGCA TGCGGCAGAG AGTCCATCGG ACAGCCGATC AGAGCAGCTG
1141   GAGCGTATTC AGTTGCTACA GCAGCAGATA GGTGTCCAC TGCCTGTCTT GCTTCTTTT
1201   ATGGCAGGTC AGACGCAGGA ATAA

```

Proteína Serina/Treonina Fosfatase de *Trypanosoma cruzi*. Cepa CL Brener

(GI|71659677-407 aa, 45kDa)

```

Met GIPLPKPVMTQLRERHGNEIFRCGSSCVNGFRESMEDAHIIY
LQPGWGGFFGVFDGHVNDQCSQYLEGAWKEILEKEKMPMTDDR
MKELALEIDKQWMDLREGGSTGTFFAAMKKDDNIHLQVGNVG
DSRVLVCSVNGQARAMTEDHKPNNNDERRIEDCGGRVEGNRV
DGS LAVSRAFGDRDYKNTTGSQ LQKQVIALPDVTHVDLTWGS
KDFAVLCCDGVFEGQFSNEEVVEFIKLQLETSDDLAVIAGRVC
EAVNRGSRDNVSCVIVQFKSGKDYADTDHLEVVP GPFSLPKNG
VFRKVY GIMAQKAGCTIHEVLEKRYDQLVSMDKELLQEEWQWF
KGGPPASLKGKDR TQWFADLLEQHA AESPSDSRSEQLERIQLL
QQQIGVPLPVLLSLMAGQTQE Stop

```

Figura 3. Sequência do gene *Tcpp2C* e da proteína.

Após realizadas as digestões com as enzimas de restrição, tanto da construção pGEM-*Tcpp2C* como do vetor de expressão pET15b, foi realizada a ligação do inserto ao vetor. O pET15b foi escolhido por permitir de obter uma proteína fusionada com

uma cauda de 6 histidinas na extremidade N-terminal. Para confirmação da clonagem no vetor de expressão foram realizadas PCR de colônia, utilizando os primers T7forward e T7reverse, sendo este último específico ao pET15b (Figura 4). Confirmou-se a clonagem de 9 em 10 colônias para pET15b-*Tcpp2C*, como pode ser observado na figura 4.

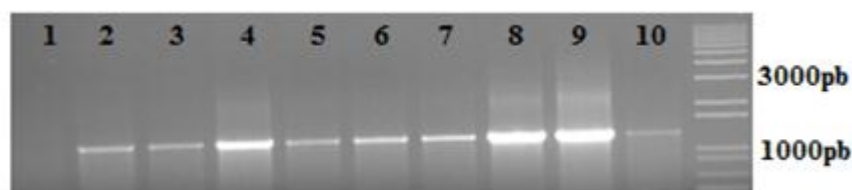


Figura 4. Análise da PCR de colônia em gel de agarose 0,8%. PCR de colônia para verificar a clonagem do gene de interesse no vetor de expressão pET-15b. Os números de 1 a 10 correspondem a diferentes colônias.

Uma vez o inserto referente ao gene de interesse clonado no vetor de expressão, iniciaram-se os testes de expressão heteróloga da proteína recombinante TcPP2Crec. Nota-se a expressão da TcPP2Crec na fração solúvel, com o tamanho esperado de 48kDa (45kDa da proteína e 3kDa da calda de histidina derivada do pET 15b), com indução a 37°C por 3h na presença de 1mM de IPTG (Figura 5A). No entanto, a expressão da proteína na presença de 0,1 mM de IPTG a 20°C por 16 h mostrou uma melhor expressão, sendo adotada como padrão para o trabalho (Figura 5B). Em outros estudos, a proteína PP2C-hn recombinante de *T. gondii* foi obtida com indução a 25°C por 3h com 0,05mM de IPTG (Gilbert et al., 2007).

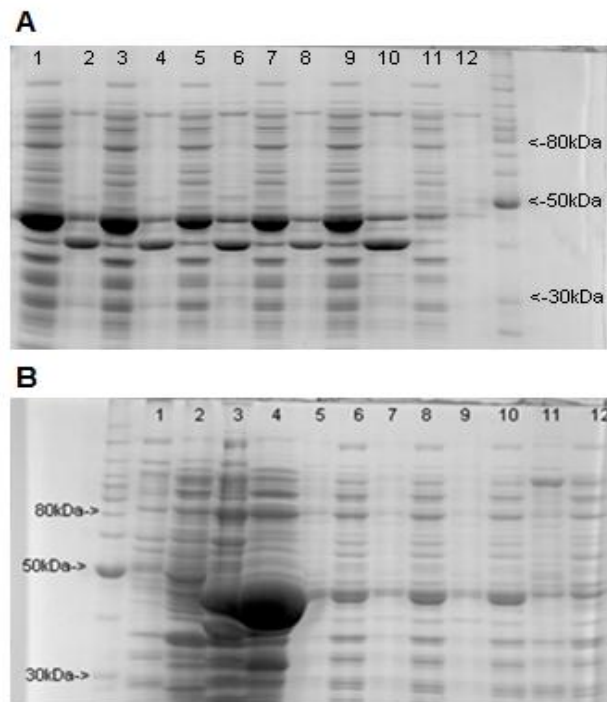


Figura 5. Análise em gel SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Blue. (A) Expressão da TcPP2Crec a 37°C na presença de 1mM de IPTG por 3h. As amostras 1 a 10 correspondem a diferentes colônias. As amostras 11 e 12 são a indução feita com pET15b vazio. Os números ímpares correspondem as frações solúveis e os números pares as frações insolúveis. (B) Expressão da TcPP2Crec a 20°C na presença de 0,1mM de IPTG em diferentes tempos de indução. Nas amostras 1 e 2 estão respectivamente a fração insolúvel e solúvel do pET15b vazio. As amostras 3-12 representam as frações insolúveis pelos números ímpares e as frações solúveis pelos números pares, as condições são as respectivas: durante toda a noite (3 e 4), 4h (5 e 6), 3h (7 e 8), 2h (9 e 10), 0h (11 e 12).

Testes de indução da expressão da proteína recombinante TcPP2C com diferentes concentrações de IPTG (1, 0,5, 0,1 mM) foram realizados a 37°C durante a noite toda. O maior nível de expressão visualizado no gel foi com a concentração de 0,1mM (Figura 6).

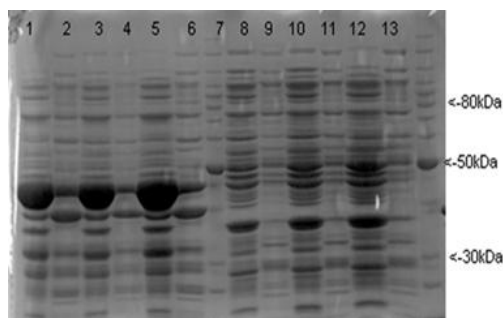


Figura 6. Análise em gel SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Blue. Indução do pET15b-Tcpp2C a diferentes concentrações de IPTG comparado com o pET15b (vazio), todos induzidos no período da noite toda a 37°C. Os números pares são a porção solúvel enquanto os ímpares as frações insolúveis.

As amostras de 1-6 são referentes ao pET15b-*Tcpp2C*, amostra 7 e a última fileira são marcadores de peso molecular e as amostras 8-13 são o pET15b vazio. A concentração de IPTG nos poços 1,2 e 8,9 são de 1mM de IPTG; 3,4 e 10,11 de 0,5mM de IPTG; e 5,6 e 12,13 de 0,1mM de IPTG.

Depois de confirmada a expressão da proteína recombinante, iniciamos o processo de purificação. Como observado na Figura 7, as frações com maior concentração de TcPP2C são as correspondentes a eluição com tampão contendo 20 e 30 mM de imidazol. A proteína PP2C-hn de *T. gondii* foi eluída com 350mM de imidazol usando o mesmo sistema de purificação (Agarose/Níquel²⁺) (Gibert et al., 2007). Isto pode ter ocorrido pelo fato da TcPP2C se ligar mais fracamente à coluna de purificação, portanto sendo eluída com menor concentração de imidazol.

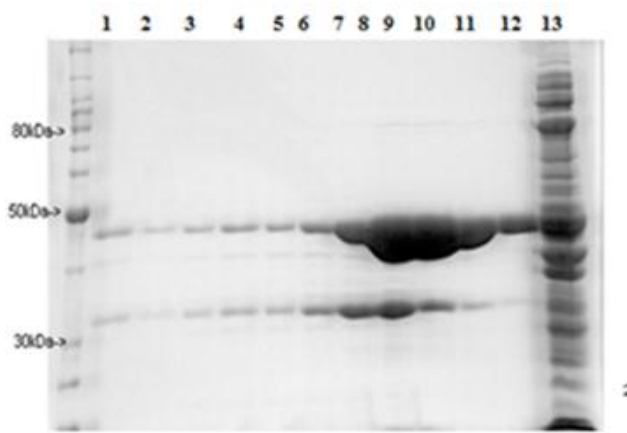


Figura 7. Purificação da TcPP2Crec em coluna de Agarose/Níquel²⁺. Gel de SDS-PAGE 12%. As amostras no sentido de 13 para 1 correspondem a extrato total, lavagem com 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 200, 400mM de imidazol, respectivamente.

Com base nos resultados anteriores, realizamos um *Western Blot* utilizando como primeiro anticorpo o anti-Histag para confirmar a expressão desta proteína recombinante. Podemos inferir, por meio da Figura 8, que a TcPP2Crec é expressa por ser reconhecida pelo anticorpo primário anti-Histag, uma vez que possui uma cauda de histidina, derivada do vetor pET 15b. A banda de tamanho inferior, que aparece logo abaixo, é decorrente de sua degradação, uma vez que o anticorpo anti-Histag foi capaz de reconhecê-la.

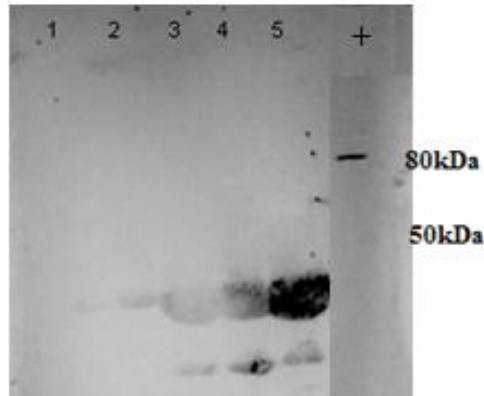


Figura 8. *Western Blot* das purificações da TcPP2C. A amostra 1 refere-se a fração solúvel do pET15b vazio, a amostra 2 (lavado da coluna), amostra 3 (eluição com 20 mM de Imidazol), amostra 4 (eluição com 30 mM de Imidazol), amostra 5 (eluição com 60 mM de imidazol). A amostra “+” - controle positivo.

O próximo passo do trabalho foi verificar a expressão da proteína nativa na forma epimastigota do parasito. Como pode ser percebido na figura 9, houve o reconhecimento do anticorpo policlonal anti-TcPP2C em ambas as frações solúvel e insolúvel do extrato do parasito. No entanto, de acordo com o resultado deste *western blot*, a proteína aparece em maior quantidade na fração solúvel desta forma de vida analisada. Sugeriu-se então que provavelmente seja expressa no citoplasma do parasito, como pode ser observado em paralelo aos resultados da imunofluorescência. A PP2C também é expressa nas formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania chagasi* e *L. amazonensis* sendo a expressão maior nas formas promastigotas em comparação as formas amastigotas (Burns et al., 1993).

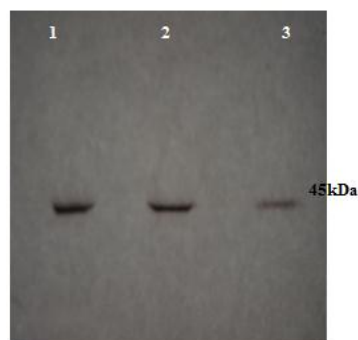


Figura 9. *Western Blot* de extrato total, solúvel e insolúvel de epimastigotas para teste dos anticorpos anti-TcPP2C. Amostra 1 - extrato total, 2 - fração solúvel e 3 - fração insolúvel.

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados com as três formas de vida do *T. cruzi*. A figura 10 mostra os resultados de citolocalização referentes a este experimento.

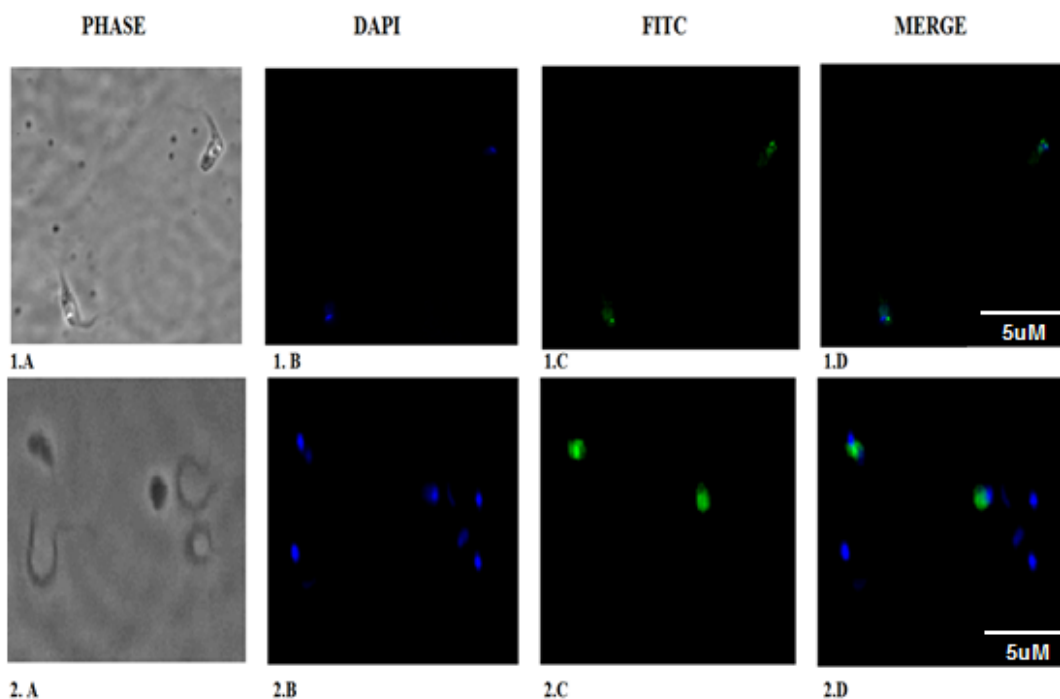


Figura 10. Imunocitocalização da TcPP2C. (1 A - D) Epimastigota. (2 A - D) Tripomastigota e Amastigota.

A localização da proteína TcPP2C no parasito na forma epimastigota é pontual, como observamos na figura 10 (1A – D). Enquanto que na forma amastigota a proteína é mais difusa pelo citoplasma e nas formas tripomastigotas ela parece ausente (Figura 10: 2 A-D). Mas nas duas formas replicativas epimastigota e amastigota, a TcPP2C está localizada próximo ao cinetoplasto, quando analisada as imagens da imunofluorescência. Estes dois últimos resultados nos levam a sugerir que esta proteína pode estar envolvida em vias de sinalização celular como a divisão celular para ambos e a amastigogênese para amastigota, portanto influenciando no seu ciclo de vida e, provavelmente, na sua patogenicidade. Ademais, no trabalho de Joshi et al., (2007) a localização da PP2C em adipócitos era mitocondrial. Em *T. gondii* a PP2C-hn está localizada nas roptrias (forma vesicular) e em pontos difusos do núcleo da célula hospedeira (Gilbert et al., 2007).

Após padronização da purificação da enzima TcPP2C_{rec} (20-30mM de Imidazol), a mesma foi utilizada em vários testes de atividades para analisar sua capacidade de hidrolisar o fosfato ligado ao p-nitrofenil (pNPP). Foram testadas

diferentes concentrações da enzima, íons, DTT e pH. Para os testes com os íons Mn^{2+} e Mg^{2+} , podemos observar que a proteína recombinante apresenta maior atividade quando na presença do íon Mn^{2+} (Gráfico 1A e B). Gráfico 1C e D mostra que não existe uma relação dose-dependente entre a atividade da enzima e concentrações de DTT. No entanto, a enzima está inativa na ausência total deste agente redutor. O teste de atividade da enzima na presença de diferentes pHs mostra que sua maior atividade é em pH 7,5 (Gráfico 1E).

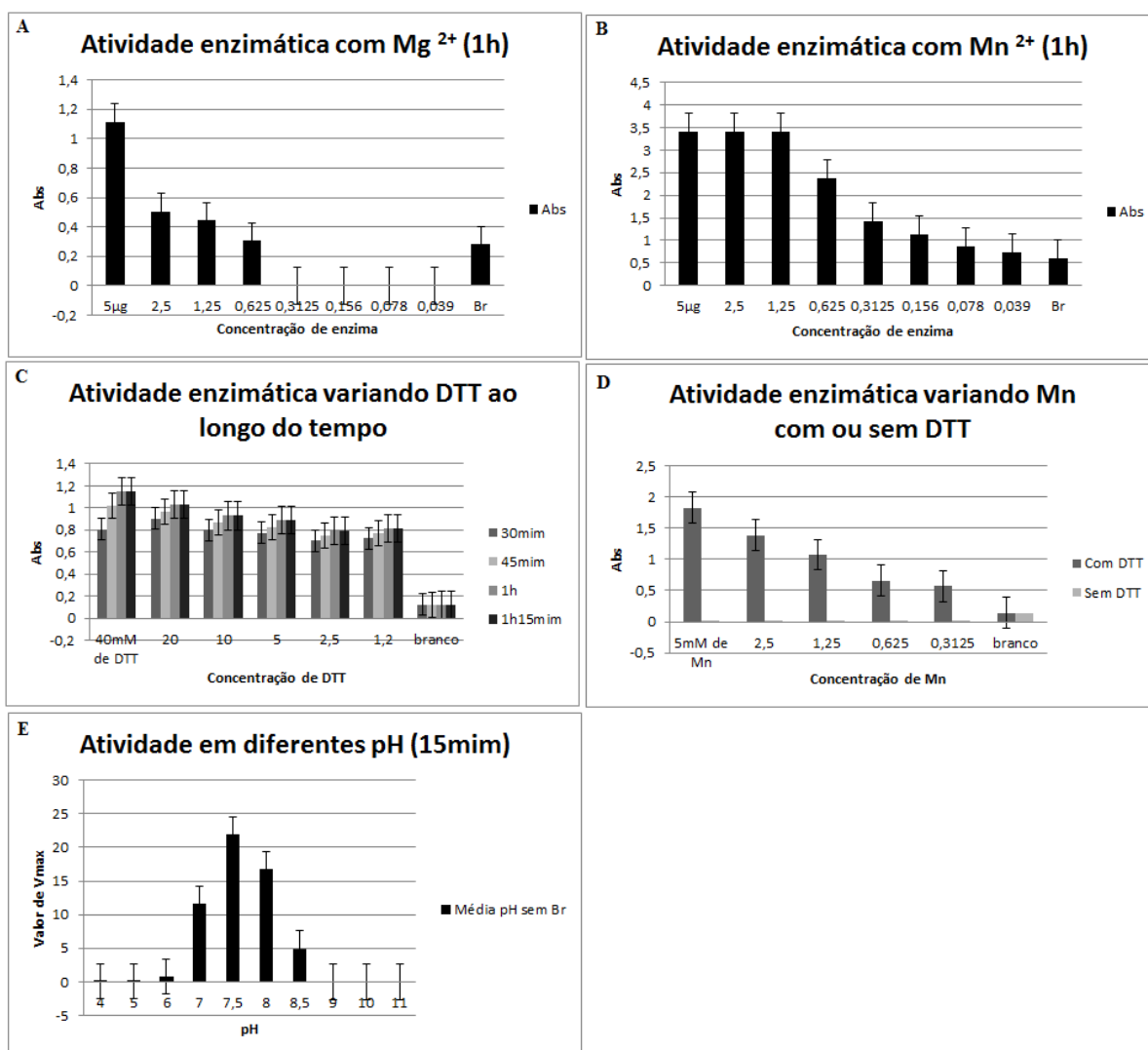


Gráfico 1. Teste de atividade da *TcPP2Crec* na presença do substrato *pNPP*. (A) Atividade enzimática na presença de Mg^{2+} . (B) Na presença de Mn^{2+} . (C) Atividade enzimática em diferentes concentrações de DTT, com 10mM de Mn^{2+} . (D) Atividade enzimática na presença ou ausência de DTT, com 10mM de Mn^{2+} . (E) Atividade enzimática em diferentes pHs, com 10mM de Mn^{2+} .

Os dados obtidos com os testes de atividade concordam com resultados encontrados por outros autores. Joshi et al., (2007) demonstraram em seu estudo que a proteína PP2C mitocondrial recombinante de adipócitos também apresenta atividade parcial com Mg^{2+} , e melhor atividade com Mn^{2+} , mas sem íons não apresenta atividade. Em pH 7,5, na presença de Mn^{2+} , a TcPP2C teve maior atividade enzimática quando em comparação com as outras faixas de pH (Gráfico. 1E). Burns et al., (1993) demonstram que a atividade da recombinante PP2C de *Leishmania chagasi* (LcPP2C) apresenta atividade catalítica em pH 7, não tendo diferença entre Mg^{2+} ou Mn^{2+} .

6. Conclusão

A proteína recombinante PP2C de *Trypanosoma cruzi* foi obtida a partir de clonagem, usando os vetores pGEM T-Easy (vetor de clonagem) e o pET15b (vetor de expressão). Sua expressão em fração solúvel foi possível na temperatura de 37°C, bem como na de 20°C na presença de 0,1mM IPTG. A purificação ocorreu em coluna de Agarose/Níquel²⁺ sendo a proteína eluída nas frações com 20-30mM de imidazol.

Com auxílio de imunofluorescência foi possível identificar a expressão diferencial da TcPP2C nas diferentes formas de vida do parasito. Os resultados indicaram expressão nas formas epimastigota e amastigota.

Com os testes de atividades, podemos concluir que a TcPP2C recombinante possui atividade de fosfatase ao conseguir clivar o substrato pNPP, tendo sua atividade ótima em pH 7,5. A presença de íons divalentes (10mM Magnésio e Manganês) é necessária para sua atividade, apresentando maior atividade na presença Manganês. O DTT é importante para sua atividade, tendo em vista se tratar de um sistema de expressão heteróloga, mas não foi conclusivo qual concentração necessária. A TcPP2C nativa por estar presente nas formas de vida replicativas do *T. cruzi*, localizada próximo ao cinetoplasto, ela poderia principalmente estar envolvida nas vias de sinalização da divisão celular e da amastigogênese.

Com a caracterização desta proteína serina/treonina espera-se abrir a oportunidade de novos estudos sobre os processos celular da replicação e da amastigogênese do *Trypanosoma cruzi*, permitindo assim ferramentas para melhor compreensão sobre o parasito.

7.Referências Bibliográficas

ACOSTA-SERRANO, A., ALMEIDA, I. C., FREITAS-JUNIOR, L. H., YOSHIDA, N., SCHENKMAN, S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 143–50, 2001.

ADLER, E., DONELLA-DEANA, A., ARIGONI, F., PINNA, L. A., STRAGIER, P. Structural relationship between a bacterial developmental protein and eukaryotic PP2C protein phosphatases. **Molecular Microbiology**, v. 23, n.1, p. 57–62, 1997.

ANDRADE, D. V, GOLLOB, K. J., & DUTRA, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p.1-10 , 2014.

ANDREWS, N.W & COLLI, W. Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. **Journal of Protozoology**, v. 29, p. 264-269, 1982.

BASTOS, I.M., GRELLIER, P., MARTINS, N.F., CADAVID-RESTREPO, G., DE SOUZA-AULT, M.R, TEIXEIRA, A.R.L., SCHRÉVEL, J., MAIGRET, B., SILVEIRA, J.F., SANTANA, J.M. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. **Biochem J**, v.388, p. 29–38, 2005.

BURNS JR, J.M., PARSONS, M., ROSMAN, D.E., REED, S.G. Molecular Cloning and Characterization of a 42-kDa Protein Phosphatase of *Leishmania chagasi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 7155–7161, 1993.

CAZZULO J. J., FRANKE, M.C.C., MARTINEZ, J., CAZZULO, B.M.F. “Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*,”. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1037, n 2, p. 186–191, 1990.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Parasites-American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Disponível em <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em 23 set 2014.

DIAS, J.C. & AMATO NETO, V. Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, suppl 2, p. 68-72, 2011.

COURA, J. R., & BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v.115, n. 1, p. 5–13, 2010.

Fernandes, L.C., Bastos, I.M., Lauria-Pires, L., Rosa, A.C., Teixeira, A.R., Grellier, P., schrével, j., santana, j.m. Specific human antibodies do not inhibit *Trypanosoma cruzi* oligopeptidase B and cathepsin B, and immunoglobulin G enhances the activity of trypomastigotesecreted oligopeptidase B. **Microbes Infect**,v. 7, p. 375–384, 2005.

FERREIRA, I.L.M & SILVA, T.P.T. Carta ao leitor. Eliminação de transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 507-509, set-out, 2006.

FERRER, E., LARES, M., VIETTRI, M., & MEDINA, M. Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 31, n. 5, p. 277–282, 2013.

GILBERT, L. A., RAVINDRAN, S., TURETZKY, J. M., BOOTHROYD, J. C., & BRADLEY, P. J. *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 1, p. 73–83, 2007.

GONZALEZ, J., CORNEJO, A., SANTOS, M.R., CORDERO, EM., GUTIERREZ, B., PORCILE, P., MORTARA, R.A., SAGUA, H., DA SILVEIRA, J.F., ARAYA, J.E. A novel protein phosphatase 2A (PP2A) is involved in the transformation of human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, n. 374, p. 647-656, 2003.

GRELLIER, P., BLUM, J., SANTANA, J., BYLEN, E., MOURAY, E., SINOU, V., TEXEIRA, A.R., SCHREVEL, J. Involvement of calyculin A-sensitive phosphatase(s) in the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 98, p. 239-252, 1999.

ICC-Fiocruz: Instituto Carlos Chagas-Fundação Oswaldo Cruz. Quem foi Carlos Chagas. Disponível em: <<http://www.icc.fiocruz.br/index.php/quem-foi-carlos-chagas>>. Acesso em 22 set. 2014.

Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças infecciosas (INBEQMeDI). Doença de Chagas. Disponível em: <http://www.inbeqmedi.ifsc.usp.br/doencas_de_chagas.php>. Acesso em 31 out 2014.

JAN, G., DELORME, V., DAVID, V., REVENU, C., REBOLLO, A., CAYLA, X., & TARDIEUX, I. The toxofilin-actin-PP2C complex of *Toxoplasma*: identification of interacting domains. **The Biochemical Journal**, v. 401, n. 3, p. 711–719, 2007.

JOSHI, M., JEOUNG, N.H., POPOV, K.M., HARRIS, R.A. Identification of a novel PP2C-type mitochondrial phosphatase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, p.38–44, 2007.

LAINSON, R., MILES, M.A., & DRAPER, C. C. Chagas's Disease in the Amazon Basin : I . *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine man in the State of Pará, north Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 193-204, 1979.

KUTUZOV, M. A, & ANDREEVA, A. V. Protein Ser/Thr phosphatases of parasitic protozoa. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 161, n. 2, p. 81–90, 2008.

MAMOUN, C. B., SULLIVAN, D. J., BANERJEE, R.J., & GOLDBERG, D. E. Identification and Characterization of an Unusual Double Serine/Threonine Protein

Phosphatase 2C in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 18, p. 11241–11247, 1998.

NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p.85-108.

NUNES, M. C. P., DONES, W., MORILLO, C. A, ENCINA, J. J., RIBEIRO, A. L. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 9, p. 767–76, 2013.

OLIVEIRA, M.F., NAGAO-DIAS, A. T., PONTES, V.M.O., SOUZA JUNIOR, A.S., COELHO, H.L.L., & COELHO, I.C.B. Tratamento etiológico da doença de chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p.209–228, 2008.

PAHO/WHO. Small big threats-Chagas disease. Disponível em: <<http://www.paho.org/world-health-day-2014/wp-content/uploads/2014/04/Chagas.pdf>>. Acesso em 22 set. 2014.

PARKER, E. R., & SETHI, A. Chagas disease: coming to a place near you. **Dermatologic Clinics**, v. 29, n. 1, p. 53–62, 2011.

QUEIROZ, R.M.L. Proteômica de *Trypanosoma cruzi* : variações em subproteomas durante a amastigogênese. Dissertação de Doutorado, Patologia Molecular, Universidade de Brasília (UnB), 2013.

RASSI JR, A., RASSI, A., & REZENDE, J M. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n.2, p. 275–91, 2012.

SILVA, A.R. Transmissão sexual do *Trypanosoma cruzi* em *Mus musculus*. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília (UnB), 2013.

SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cytology**, v. 86, p. 197 – 283, 1984.

SOUZA, W., CARVALHO, T. M. U., & BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 18p, 2010.

SZÖÖR, B. Trypanosomatid protein phosphatases. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 173, p. 53-63, 2010.

TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., & CERON, C. R. (2004). Problemática vetorial da Doença de Chagas. **Arq Ciênc Saúde**, v.11,n. 1, p. 44-47, 2004.

WILKES, J. M., & DOERIG, C. The protein-phosphatome of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **BMC Genomics**, v. 9, n. 412, p1-19, 2008.

World Health Organization (WHO). Chagas disease. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743>. Acesso em 22 set. 2014.