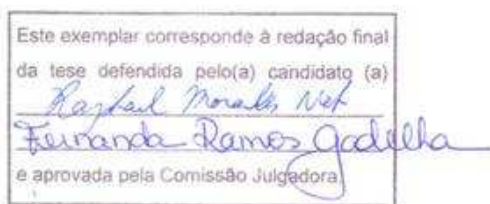




Dissertação de mestrado

Raphael Morales Neto

Atividade de fosfatases em duas cepas de *Trypanosoma cruzi*



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha.

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M792a Morales Neto, Raphael
Atividade de fosfatases em duas cepas de *Trypanosoma cruzi* / Raphael Morales Neto. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadora: Fernanda Ramos Gadelha.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Fosfatases. 3. Chagas, Doença de. I. Gadelha, Fernanda Ramos. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Phosphatase activity in two strains of *Trypanosoma cruzi*.

Palavras-chave em inglês: *Trypanosoma cruzi*; Phosphatases; Chagas' disease.

Área de concentração: Bioquímica.

Títuloção: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

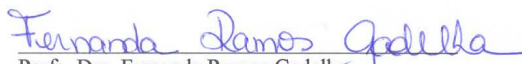
Banca examinadora: Fernanda Ramos Gadelha, Sérgio Marangoni, Maristela Cesquini Oliveira.

Data da defesa: 25/02/2008.

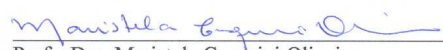
Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 25 de fevereiro de 2008.

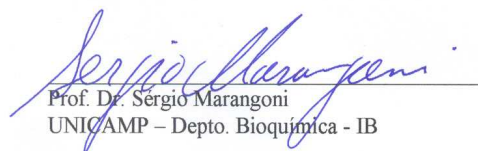
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha
UNICAMP – Depto. Bioquímica – IB



Profa. Dra. Maristela Cesquini Oliveira
UNIP – Universidade Paulista



Prof. Dr. Sérgio Marangoni
UNICAMP – Depto. Bioquímica – IB

Profa. Dra. Cintia Maria Saia Cereda
Faculdade Comunitária de Campinas

Profa. Dra. Selma Giorgio
UNICAMP – Depto. Parasitologia – IB

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck
UNICAMP – Depto. Bioquímica – IB

“O destino não é uma questão de sorte, é uma questão de escolha; não é algo a se esperar, é algo a se conquistar”.

William Jennings Bryan

Por todo incentivo e apoio recebido durante a realização deste trabalho, dedico-o aos:
meus pais, Silvana e Adjair;
minha irmã, Mirella;
minha vó, Lourdes; minha prima, Gislaine; meu amigo, Luiz Guilherme e
minhas amigas, Jandira e Laura.

Agradecimentos

A Deus pelas bênçãos recebidas.

Aos meus pais por todas as suas privações e renúncias em nome da minha formação. Muito obrigado por me apoiarem, ajudarem, acreditarem no meu potencial e me compreenderem nos momentos em que me dediquei a esse trabalho. Agradeço à minha mãe, que em todos os momentos da minha vida foi minha melhor amiga e professora, me passou segurança, amparo, muito amor e determinação em busca dos meus sonhos; e ao meu pai por toda a sua dedicação na minha formação e ao seu exemplo de vida.

À minha irmã, minha companheira com quem compartilhei experiências inenarráveis que com certeza marcaram nossas almas de maneira tão ímpar e especial. Muito obrigado pelo seu interesse em meus estudos e paciência em ouvir minhas explicações quando nem sempre podia compreendê-las em sua totalidade.

À minha vó Lourdes, pessoa tão especial na minha vida, obrigado por desde a minha infância me dar seu amor maternal, incentivo e muitas alegrias. Vó quero te agradecer pelo orgulho que a senhora sempre demonstrou sentir por mim, pela atenção, apoio incondicional e os momentos inesquecíveis que a senhora me proporcionou como a maravilhosa conta na “Mercedes”.

À minha prima Gislaine Ap. R. Fioco, por todo o seu exemplo de dedicação com os estudos, responsabilidade e comprometimento com a vida. Obrigado por todo o seu incentivo, carinho, palavras positivas e vibração com minhas conquistas. Tenho muito orgulho de ter uma prima tão inteligente e competente como você. Saiba que você é responsável por muito do meu caráter, pois é uma das pessoas em quem eu me espelho desde sempre.

À minha tia avó Lucila G. Predella por todo o seu amor, alegria contagiante, incentivo e incansável demonstração de orgulho. Tia, muito obrigado por ser tão amável comigo desde minha infância e por toda essa sua força dada a mim durante os meus estudos.

Aos meus tios avós Therezinha G. D’Angelo e Antonio D’Angelo Neto, pela influência positiva, incentivo, bons conselhos, todo amor e paciência comigo e meu primo Allan pelas nossas traquinagens.

Às minhas primas Elóia P. Barbeiro e Marta Predella obrigado por todo o carinho, atenção, admiração, companheirismo, sinceridade e sempre muitas risadas.

A toda a minha família pelo apoio.

Ao meu melhor amigo, Luiz Guilherme Michelinini Bueno, por todo o carinho, colaboração, incentivo, paciência e força nos momentos de dificuldade durante a realização deste trabalho. Muito obrigado pelos agradáveis momentos de convivência, pelas risadas, por sempre acreditar em meu potencial e principalmente por sua presença em minha vida.

À Profa. Dra. Mércia que desde os tempos da graduação me orientava e aconselhava positivamente, obrigado pela sua ajuda em ter “aberto a porta” para eu fazer contatos na Unicamp.

À Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha pela força, atenção, incentivo, amizade e confiança durante a realização desse trabalho. Além de uma orientadora responsável e extremamente profissional encontrei uma educadora que se preocupa com a formação não apenas do profissional, mas também do cidadão.

À minha amiga Laura pela valiosa ajuda que sem sombra de dúvida, contribuiu enormemente para a realização desse trabalho. Obrigado pela sua presença, entusiasmo e doçura em todos os momentos. Ter uma amiga como você me deixa entusiasmado com a vida e feliz de saber que existem anjos na Terra.

Ao meu grande amigo Kiko que considero um irmão, pela amizade, os momentos saudáveis de convivência, risadas, chateações e pela paciência em me ajudar tanto na rotina do laboratório quanto em meus problemas pessoais, muito obrigado por toda amizade, confiança, força e por sempre ter acreditado em mim.

À minha amiga Kelly Seligman, pelo companheirismo, força, apoio moral e paciência em me escutar nos momentos de preocupação com os entraves burocráticos. Sou grato a todos os nossos momentos de descontração permeados por muitas risadas e previsões do futuro. Minha eterna DIVA, obrigado por ter surgido na minha vida e segurado em minhas mãos nos momentos que trilhava tanto os caminhos de pedra quanto os suaves.

À Profa. Dra. Eneida de Paula e seus alunos Bispo e Cleyton, muito obrigado pela oportunidade de me envolver com o ensino da Unicamp. Cleyton sou grato pela indicação que você fez de mim para minha orientadora, isso contribuiu muito para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, pela sua disposição em sempre me atender, tirar minhas dúvidas e contribuir para esse trabalho.

À Profa. Dra. Carmen V. Ferreira, pela atenção, ajuda e interesse em me ajudar na realização desse trabalho.

À Luciana pela ajuda com os experimentos no laboratório do Prof. Dr. Hiroshi.

Aos membros das bancas prévia e definitiva: Profa. Dra. Giselle Zenker Justo, Profa. Dra. Ana Carolina S. S. Galvão, Prof. Dr. Sérgio Marangoni, Profa. Dra. Maristela Cesquini Oliveira pelas sugestões tão pertinentes feitas nas análises prévia e definitiva deste trabalho. Agradeço também a todos os suplentes pelo seu tempo em ler o meu trabalho.

À Carol e Lígia pelo apoio inicial na padronização de técnicas e elaboração dos primeiros resumos para congresso.

À Érika F. dos Anjos pelo fornecimento de *p*-NPP e dicas no manuseio de reagentes.

As secretárias Andréa e Marina pela ajuda burocrática, paciência e a alegria de sempre que me contagiava em nossos encontros.

À Capes pelo apoio financeiro.

Índice

Resumo	xi
Summary	xii
 1. Introdução	
Doença de Chagas	01
<i>Trypanosoma cruzi</i>	03
Fosfatases	06
Fosfatases ácidas	09
Fosfatases alcalinas	11
Proteínas fosfatases	13
Proteínas Tirosina fosfatases (PTPs).....	14
Serina-Treonina fosfatases (Ser/Thr).....	15
2. Objetivos	17
 3. Materiais e Métodos	
3.1 Cultura de células e obtenção do homogenado celular	18
3.2 Avaliação da atividade fosfatásica	18
3.3 Ensaios com inibidores	19
3.4 Análise estatística	20
 4. Resultados e discussão	
4.1 Determinação da concentração de extrato celular	21
4.2 Tempo de incubação	22
4.3 Parâmetros cinéticos	23
4.4 Atividade de fosfatases nas diferentes fases da proliferação celular	25
4.5 Efeito da adição de Ca ²⁺ sobre a atividade de fosfatases	28
4.6 Ação dos inibidores sobre a atividade de fosfatases	30

5. Conclusões	36
6. Referências bibliográficas	37
7. Anexos	
7.1 Participação em congressos	43
7.2 Manuscrito submetido à publicação	44

Resumo

Trypanosoma cruzi, o agente etiológico da doença de Chagas, exibe um notável grau de heterogeneidade estrutural e funcional, o qual pode modular sua patogenicidade, sobrevivência e adaptação. Em eucariotos superiores, mecanismos de fosforilação e desfosforilação são fundamentais para a regulação de uma ampla variedade de eventos celulares. Por essa razão, um melhor entendimento da atividade de fosfatases em *T. cruzi* pode ser útil para a identificação de potenciais alvos para o desenvolvimento de terapias mais específicas. Neste trabalho, analisou-se o perfil das fosfatases, em homogenatos de duas cepas de *T. cruzi*, Tulahuen 2 e Y. A atividade de fosfatases foi determinada espectrofotometricamente utilizando-se o *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) como substrato. Na cepa Tulahuen 2, que apresenta maior resistência ao estresse oxidativo gerado pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foi observada uma atividade de fosfatase sete vezes maior quando comparada a cepa Y. Em relação ao pH ótimo a Tulahuen 2 mostrou uma expressiva atividade em pH 4,0, a qual foi aumentada na presença de Mg^{2+} exógeno em uma ampla faixa de pH (5,0 - 8,0). A cepa Y, embora em menores níveis, exibiu o mesmo perfil sem a adição de Mg^{2+} , apresentando na presença desse íon um pico de atividade em pH 7,0. A adição de Ca^{2+} ao meio reacional afetou significativamente a cepa Tulahuen 2 em pH 8,0 e inibiu a atividade das fosfatases na cepa Y nos pHs 7,0 e 8,0. Inibidores clássicos de fosfatase ácida, bem como inibidores de proteína tirosina fosfatase e fosfatase alcalina, mostraram padrões distintos de inibição em ambas as cepas, reforçando a heterogeneidade entre os isolados de *T. cruzi*.

Summary

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas`disease, displays a remarkably high degree of both, structural and functional intraspecific heterogeneity, which could modulate its pathogenicity, survival and adaptability. In higher eukaryotes, phosphorylation and dephosphorylation are fundamental pathways that regulate a wide variety of cellular events. Therefore, a better understanding of phosphatases activities in *T. cruzi* could be useful to identify potential targets for the development of a more specific therapy. In this work, we analysed the phosphatase activity profile in *T. cruzi* homogenates of two strains (Tulahuen 2 and Y). The phosphatase activities was determined spectrophotometrically using *p*-nitrophenylphosphate (*p*-NPP) as substrate. In the strain more resistant to the oxidative stress generated by H₂O₂, Tulahuen 2, it was observed a seven-fold higher phosphatase activity when compared to the other strain. In relation to optimum pH and substrate specificity, Tulahuen 2 had an expressive acid phosphatase activity (optimum pH at 4.0), which was even higher in the presence of Mg²⁺ and had a broad range (pH 5-8). Y strain, although at lower levels, showed the same activity profile in the presence or absence of Mg²⁺. The presence of calcium showed significant effect on the Tulahuen 2 strain only at pH 8.0 and had an inhibitory effect on phosphatase activity in the Y strain at pHs 7-8. Classical inhibitors of acid phosphatases, as well as inhibitors of phosphotyrosine phosphatase, showed distinct patterns of effects in phosphatases from both strains.

1- Introdução:

1.1 Doença de Chagas:

O protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, é o agente etiológico da doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase americana (Dias & Coura, 1997; Manoel-Caetano & Silva, 2007). Descoberta em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, essa antroponose permanece até os dias atuais sem cura, vacina ou tratamento eficaz, principalmente em sua fase crônica (Brenner *et al.*, 2000). A Tripanossomíase americana acomete aproximadamente 20 milhões de pessoas e ainda 90 milhões encontram-se em áreas de risco (Dutra *et al.*, 2006). Distribui-se por todo o continente americano, desde o sul dos Estados Unidos até o extremo sul da Argentina, com prevalência que varia de 5 a 60% (Rojas de Arias *et al.*, 1999). Estimativas apontam que 5 a 6 milhões de pessoas estejam contaminadas no Brasil, ocorrendo 6000 óbitos/ano relacionados à doença (WHO, 2005).

No final da década de 1970, 18 estados e mais de 2200 municípios, nos quais se comprovou a presença de triatomíneos domiciliados, faziam parte da área com risco de transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. Contudo, mudanças ambientais, maior concentração da população em áreas urbanas e melhor compreensão dos mecanismos de transmissão, aliados as eventuais ações de controle químico de populações domiciliadas do vetor, resultaram em alteração do quadro epidemiológico da doença de Chagas no Brasil (Rocha *et al.*, 2005). Atualmente, no Brasil evidenciam-se duas áreas distintas geograficamente, onde os padrões de transmissão são diferenciados. Regiões originalmente de risco para a transmissão vetorial são compreendidas, pelos Estados: AL, BA, CE, DF, GO, MA, MG, MS, MT, PB, PE, PI, PR, RN, RS, SE, SP, TO. A outra área representada pela Amazônia legal formada pelos Estados do AC, AM, AP, RD, RR, PA, parte de TO, MA e MT, apresenta mecanismos de transmissão

diferenciados, compreendendo: transmissão oral, vetorial extradomiciliar, domiciliar ou peridomiciliar sem colonização do vetor (Rocha *et al.*, 2005). Eventualmente, têm sido relatados casos de transmissão oral a partir de alimentos contaminados como suco de cana de açúcar e açaí na região amazônica (Coura *et al.*, 1994) e mais recentemente nos Estados de Santa Catarina (Manoel-Caetano & Silva, 2007) e Ceará (Dias, 2006).

No atual panorama de controle da transmissão transfusional obtido a partir da introdução do monitoramento sorológico na rotina da rede hemoterápica (Anvisa, 2005) e da transmissão vetorial, a forma vertical passa a ser o principal mecanismo de transmissão do *T. cruzi* no Brasil. O Brasil foi a primeira nação da América latina a controlar e eliminar a transmissão do mal de Chagas pelo *Triatoma infestans*. O certificado internacional de eliminação da transmissão da doença de Chagas foi entregue ao Ministério da Saúde em 2006 pela Organização Pan Americana de Saúde (Opas, 2007).

Em outros países da América Latina, a forma de transmissão vetorial do *T. cruzi* é a mais destacada (80 à 90%), seguindo-se a transfusional (8 à 18%) e a congênita (0,5 à 2%) (Dias & Coura, 1997). Transplante de órgãos, leite materno e acidentes laboratoriais são considerados formas importantes de transmissão do parasita (Amato Neto, 1984).

A doença de Chagas apresenta um variável curso clínico, incluindo uma fase denominada aguda ou inicial, a qual pode ser assintomática, oligossintomática ou sintomática, com febre, adenomegalia, conjutivite unilateral, miocardite e meningoencefalite. A fase inicial pode ser fatal em mais de 10% dos casos severos, com alta mortalidade em crianças menores de três anos em decorrência da meningoencefalite (Coura, 2003). A fase crônica é representada por um período de latência que varia de 10-15 anos, referida como forma indeterminada, após a qual aproximadamente 27% dos indivíduos infectados desenvolvem sintomas cardíacos, podendo morrer repentinamente, 6% apresentam danos digestivos e 3% têm envolvimento do sistema nervoso periférico

(Coura, 2003). As variabilidades genéticas tanto do parasita como do hospedeiro podem influenciar a forma clínica da doença de Chagas (Macedo & Pena, 1998), entretanto o tropismo individual envolvido na patogênese da doença não está totalmente esclarecido (Manoel-Caetano & Silva, 2007).

Apenas duas drogas são geralmente utilizadas no tratamento da doença de Chagas. O benzonidazole (Rochagan[®]), atualmente é a única droga disponível no Brasil. O nifurtimox (Lampit[®]), existente na América Central, pode ser utilizado como alternativa no caso de intolerância ao benzonidazol (Rocha *et al.*, 2005). Ambas promovem alta incidência de toxicidade, efeitos colaterais severos, podem ser mutagênicas e são efetivas apenas na fase aguda da doença (Letelier *et al.*, 1986; Dias, 1999). Atualmente, sabe-se que os efeitos tóxicos do nifurtimox e benzonidazole são uma consequência da diminuição significativa dos níveis de glutathione e tripanotione, causados pela conjugação com metabólitos de ambas as drogas. A concentração de tripanotione e glutathione seria reduzida a um ponto que os níveis das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo ciclo redox, aumentariam causando dano as macromoléculas celulares (Maya *et al.*, 1997).

1.2 *Trypanosoma cruzi*:

O *T. cruzi* pertence ao Reino Protozoa, Filo Euglenozoa, Classe Kinetoplastidae, Ordem Bodonidae, Família Trypanosomatidae, Gênero *Trypanosoma* e Espécie *cruzi* (Dias & Coura, 1997). Outros agentes etiológicos como *Leishmania donovani*, *T. brucei* e *T. rhodesiense* também pertencem da Classe Kinetoplastidae. Essa classe, engloba protozoários com 1 (*T. cruzi*) ou 2 flagelos, que são distinguidos principalmente pela presença de um agregado de DNA mitocondrial, o cinetoplasto (kDNA) (Dias & Coura, 1997; Siqueira-Batista *et al.*, 1996). A presença do *T. cruzi* na Terra é muito antiga,

remontando-se a mais de 150 milhões de anos sua presença no planeta, sendo largamente distribuído na natureza, ocorrendo sua circulação primitivamente entre insetos vetores (Triatominae, Hemíptera, Reduviidae) e mamíferos silvestres (Dias, 2006).

Ao lado de organelas típicas encontradas em células eucarióticas, todas as formas evolutivas de *T. cruzi* apresentam organelas especializadas como acidocalcisomas e glicossomas. Apenas as formas epimastigotas apresentam compartimentos pré-lisossomais denominados reservossomos. Essas organelas são ácidas, contêm cisteína protease cruzipaina, (Cuevas *et al.*, 2005), fosfatase ácida, albumina, peroxidase, transferrina e lipoproteína de baixa densidade, tendo como principal função o acúmulo de lipídeos e macromoléculas ingeridas pelo parasita durante o processo de endocitose (Adade *et al.*, 2007).

A dispersão física e evolução clonal do *T. cruzi* promoveram uma grande diferenciação biológica, ocasionando o aparecimento de diferentes cepas de *T. cruzi* (Dias & Coura, 1997). Mais de 60 cepas já foram descritas segundo diferentes critérios, como a interação com células hospedeiras, tropismo, resistência ao estresse oxidativo, curvas de parasitemia, origem geográfica e resistência ou sensibilidade às drogas e medicamentos (Dias & Coura, 1997; Rey, 1991; Dutra *et al.*, 2006).

Estudos baseados na amplificação por PCR de seqüências do gene 24S alfa, apontam para um dimorfismo, permitindo a identificação de duas linhagens principais de *T. cruzi* (Dias & Coura, 1997). A linhagem I, embora também presente em ambiente silvestre, está associada preferencialmente ao ciclo doméstico sendo capaz de induzir manifestações patológicas em humanos. A linhagem II está freqüentemente associada ao ciclo silvestre, apresentando baixa infectividade humana (Zingales *et al.*, 1998). Além dos grupos I e II existe o grupo I/II, que se originou de um evento de transferência genética do grupo II para o grupo I (Souto *et al.*, 1996). A heterogeneidade é a grande responsável

pelas diferenças na evolução clínica da doença de Chagas e representa um grande desafio, pelo fato desses organismos responderem diferentemente a situações diversas, principalmente ao tratamento disponível (Dias & Coura, 1997).

O *T. cruzi* possui um complexo ciclo de vida, envolvendo quatro principais estágios morfológicos, alternando entre um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado (Tyler & Engman, 2001). Esse ciclo pode ser resumido da seguinte forma (Figura 1): ao picar o hospedeiro mamífero infectado, o inseto vetor adquire uma população pleomórfica de tripomastigotas sanguíneas (e aproximadamente 10% de amastigotas, Fig 1(5)). No trato intestinal, as tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas, transformando-se posteriormente em epimastigotas Fig. 1(6). Os epimastigotas anexam-se a parede intestinal do vetor, multiplicam-se Fig. 1(7) e sofrem modificação para a forma tripomastigota metacíclica Fig. 1(8). Uma vez transformadas, elas se destacam da parede do intestino e são excretadas. O vetor defeca no momento do repasto sanguíneo Fig.1(1) e geralmente o ato de coçar a região da lesão da picada provoca a contaminação da ferida ou de mucosas do hospedeiro mamífero, levando à infecção. As formas tripomastigotas metacíclicas parasitam um grande número de células mamíferas nucleadas, diferenciando-se em amastigotas Fig. 1(2), que multiplicam-se por divisão binária Fig. 1(3) e originam posteriormente as tripomastigotas sanguíneas Fig. 1(4). Uma vez formadas, as tripomastigotas escapam para o sangue, podendo invadir novas células e tornarem-se amastigotas novamente, ou serem destruídos por mecanismos do sistema imunológico do hospedeiro (Manoel-Caetano & Silva, 2007). Essa mistura de tripomastigotas e amastigotas presentes no sangue do mamífero infectado completa o ciclo quando esses parasitas são resgatados durante a picada do vetor Fig. 1(5) (Tyler & Engman, 2001).

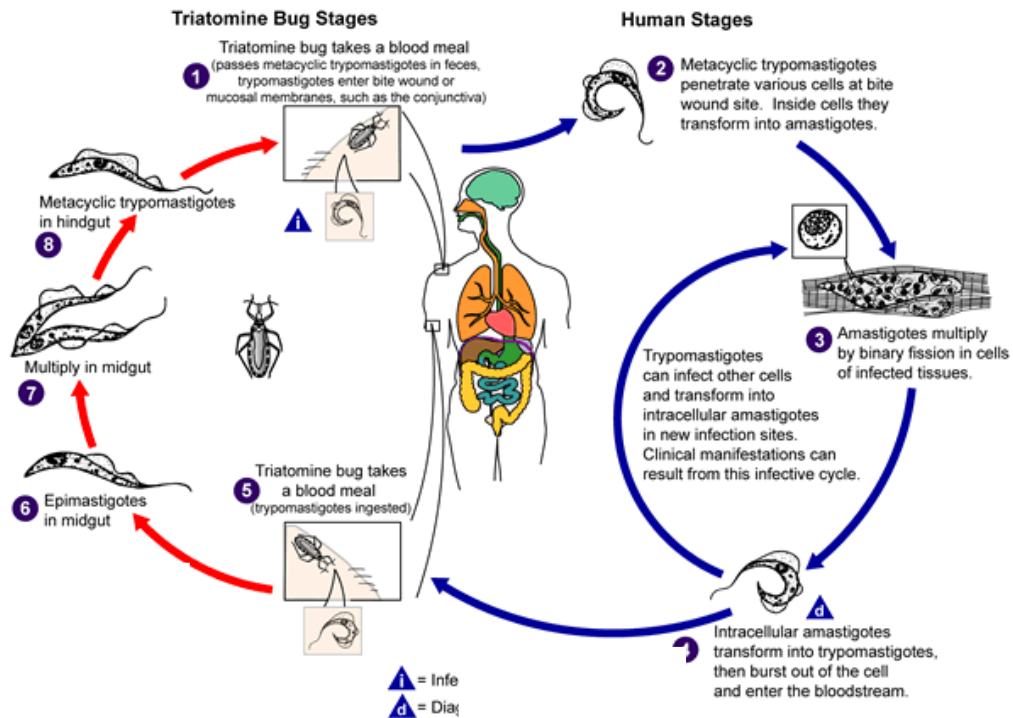


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, onde: (i) formas infectivas e (d) estágio onde o diagnóstico da parasitemia é possível. (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>).

Estes processos de transformação morfológica do parasita são altamente regulados e incluem significativas modificações bioquímicas, em vias de transdução de sinal, expressão gênica, alterações estruturais de moléculas de superfície e em componentes intracelulares do parasita (Dutra *et al.*, 2006). A melhor compreensão de enzimas chaves do metabolismo do parasita, como as fosfatases, poderá levar à identificação de alvos para o desenvolvimento de uma terapia mais específica.

1.3 Fosfatases:

As proteínas quinases e fosfatases catalisam de forma dinâmica reações opostas de fosforilação e desfosforilação, respectivamente. A adição ou remoção do grupamento fosfato de uma proteína pode, entre diversas conseqüências, gerar um motivo de reconhecimento para interação proteína-proteína, alterar a estabilidade protéica e modular a ativação de enzimas (Aoyama *et al.*, 2003). De forma importante, esse mecanismo reversível de fosforilação protéica está envolvido na regulação de vias de sinalização celular (Barford, 1995), sendo a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares, como mitógenos, carcinógenos, hormônios, citocinas ou neurotransmissores (Jia, 1997). Em conseqüência à ação destes efetores, ocorre regulação da divisão, diferenciação, desenvolvimento e morte celular (Klumpp & Krieglstein, 2002), regulação do metabolismo, expressão gênica, locomoção celular, aprendizado e memória (Barford, 1995).

A importância da fosforilação protéica como meio de regulação de processos celulares é demonstrada pelo fato de 30% das proteínas intracelulares serem fosfoproteínas, estimando-se que os genes para quinases e fosfatases juntos, compreendam 4% do genoma eucariótico (Hunter, 1995; Aoyama *et al.*, 2003).

As atividades das proteínas quinases e fosfatases são altamente reguladas *in vivo*. Mudanças anormais em suas atividades contribuem para o desenvolvimento de patologias como câncer e outras doenças resultantes de defeitos imunológicos (Barford, 1995; Hunter, 2002). As proteínas quinases e fosfatases também influenciam a sobrevivência, internalização e replicação de patógenos pela modificação dos níveis de fosforilação das células do hospedeiro, assim interferindo com muitas vias de transdução de sinal (Aguirre-Garcia, 2005).

As fosfatases são hidrolases que utilizam como substratos os fosfomonoésteres, encontram-se amplamente distribuídas na natureza sendo identificadas em vegetais, animais e em microorganismos (Aoyama *et al.*, 2003). Com base na função, estrutura, especificidade, inibidores e ativadores, as fosfatases são divididas em três grupos principais: fosfatases ácidas, fosfatases alcalinas, e proteínas fosfatases (Aoyama *et al.*, 2003).

1.3.1 Fosfatases ácidas:

As fosfatases ácidas (EC 3.1.3.2) apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 5,0 e utilizam como substratos compostos com baixa massa molecular, como açúcares fosforilados (Aoyama *et al.*, 2003). Inicialmente, a distinção entre fosfatases ácidas e alcalinas era baseada apenas no pH ótimo para catálise enzimática. Entretanto, Neuman observou em 1968 que as fosfatases ácidas catalisam a hidrólise de monoésteres O-substituídos de ácido fosfotióico do tipo ROPO_2SKH , produzindo álcool e tiofosfato, enquanto as fosfatases alcalinas apresentam mecanismo diferente. Além disso, as fosfatases ácidas não necessitam de íons divalentes para a catálise (Aoyama *et al.*, 2003).

Em eucariotos superiores como mamíferos, de acordo com a massa molecular relativa e inibição, as fosfatases ácidas podem ser classificadas em: fosfatase ácida de alta massa molecular relativa (AMr) e massa molecular intermediária (IMr). A forma maior está associada ao lisossomo e a membrana celular, sendo um clássico marcador da inflamação, já a menor é uma enzima citoplasmática (De Duve *et al.*, 1962).

Caracteristicamente, as AMr são fortemente inibidas por tartarato e fluoreto, as IMr apresentam resistência ao fluoreto e dividem-se em fosfatase ácida sensível e fosfatase ácida resistente ao tartarato (FATR) (Zhang & Van Etten, 1990). Níveis

normalmente altos da FATR no soro são encontrados em Doença Gaucher (Robinson & Glew, 1980) e leucemia tipo célula pilosa (Lau *et al.*, 1991).

As fosfatases ácidas ocorrem em diversos tecidos animais de mamíferos como próstata, corpo lúteo, placenta, testículos, útero, cérebro, fígado, tireóide, coração, rim, baço, glândulas salivares e ossos. No sangue, podem ser detectadas tanto nos eritrócitos e leucócitos, como no plasma, onde normalmente são utilizadas no diagnóstico de algumas patologias (Taga, 1979). Em células de origem mesenquimal, bem como células epiteliais distribuem-se em diversas regiões, como na membrana celular (Himeno, *et al.*, 1989), lisossomos (De Duve *et al.*, 1955), citoplasma (Mies & Miranda, 1976) e aparelho de Golgi (Schofield & McDonald, 1980).

Nos vegetais, sua função metabólica não é totalmente compreendida e o estudo dessas enzimas decorre do possível envolvimento das mesmas no metabolismo do fósforo, elemento essencial ao desenvolvimento normal dos órgãos das plantas (Senna *et al.*, 2006). Além disso, parecem ser estimuladas em resposta as deficiências de fosfato, água e estresse salino (Granjeiro *et al.*, 1999). Métodos citoquímicos confirmaram a presença destas enzimas na parede celular e no citoplasma de plantas, observando-se também aumento de sua atividade durante a germinação ou deficiência de fosfato inorgânico em trigo, arroz e rabanete (Lee, 1988).

Em tripanossomatídeos, não está descrito uma divisão das fosfatases ácidas como ocorre com os mamíferos. Estudos têm mostrado que muitos desses parasitas como *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana*, *Herpetomonas muscarum muscarum*, *Leptomonas collosoma*, *T. gambiense* e *T. cruzi* entre outros, apresentam essas enzimas ligadas a membrana endoplasmática, sendo as mesmas denominadas ectofosfatases (de Almeida-Amaral *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2006). Em 1996, utilizando procedimentos citoquímicos, Omalokoho e seu grupo demonstraram a presença de fosfatase ácida na

superfície externa da membrana endoplasmática de *T. congolense* (Omalokoho *et al.*, 1996). Em *T. cruzi*, a atividade de fosfatase ácida ligada à membrana plasmática é aumentada durante a modificação morfológica de tripomastigota para amastigotas mas não se sabe claramente se a elevada atividade enzimática é uma consequência da transformação morfológica ou uma estratégia para a adaptação às células do hospedeiro. A presença dessa enzima em *L. donovani* foi relacionada com mecanismos de adaptação do parasita ao ambiente intracelular do hospedeiro (Nagakura *et al.*, 1985). Embora, o papel fisiológico dessas ectofosfatases em tripanossomatídeos não esteja bem estabelecido, supõe-se que estejam envolvidas em nutrição, proteção, mecanismo de escape, virulência e diferenciação celular (Letelier *et al.*, 1986; Gomes *et al.*, 2006). As fosfatases nos tripanossomatídeos também estão presentes no citoplasma e em outras organelas. As fosfatases ácidas são enzimas marcadoras típicas de lisossomos, mas também foram citoquimicamente detectadas no complexo de Golgi e dentro da bolsa flagelar de vários tripanossomatídeos. Supõe-se que desempenhem papel importante na nutrição tanto do *T. cruzi* quanto da *Crithidia fasciculata*, por estarem relacionadas à digestão lisossomal e da membrana da bolsa flagelar (Adade *et al.*, 2007).

Em 1985, Letelier e seus colaboradores mostraram que em formas epimastigotas de *T. cruzi*, no mínimo dois tipos de fosfatase ácida estão presentes. Estando uma ligada a membranas (microssomal, mitocôndria e núcleo) com pH ótimo 4 e outra solúvel no citosol com pH ótimo 5,5.

1.3.2 Fosfatases alcalinas:

As fosfatases alcalinas (EC 3.1.3.1) apresentam um pH ótimo para a catálise em torno de 8,0 - 9,0 e semelhantemente as fosfatases ácidas atuam na hidrólise dos substratos de baixa massa molecular relativa. Entretanto, necessitam de íons bivalentes

como magnésio, cobalto ou manganês como cofatores para exibirem sua atividade máxima (Letelier *et al.*, 1985; Aoyama *et al.*, 2003).

Neuman observou em 1968, que as fosfatases alcalinas hidrolisam monoésteres S-substituídos de ácido fosforotióico RSPO_3Na_2 do tipo S-P, produzindo ortofosfato e o tioálcool correspondente. Este fato nos permite visualizar mecanismos de reação diferentes entre as fosfatases ácidas e as alcalinas, uma vez que apenas as ácidas requerem para sua atividade um oxigênio entre o radical e o fosfato.

As fosfatases alcalinas compreendem um grupo heterogêneo de enzimas que estão amplamente distribuídas em células de mamíferos, plantas e microorganismos. Em tripanossomatídeos freqüentemente estão associadas às membranas endoplasmáticas (Fernandes & Kidney, 2007), mas também são conhecidas formas solúveis no citoplasma, como a presente em formas epimastigotas de *T. cruzi* (Letelier *et al.*, 1985). Embora sua função biológica não esteja totalmente esclarecida, sabe-se que em eucariotos possui importante papel no processo de mineralização, transporte de fosfato e regulação celular através da hidrólise de proteínas fosforiladas (Letelier *et al.*, 1985). Além disso, estão envolvidas no processo de secreção da saliva, uma vez que localizadas nas glândulas salivares e tendo sua atividade diminuída, uma diminuição no fluxo salivar foi observada (Togari *et al.*, 1987).

São amplamente utilizadas em análises bioquímicas como indicadores de doenças hepáticas, principalmente colesterolemia. O aumento na atividade de fosfatase alcalina no soro e em outros fluídos corpóreos pode refletir modificações fisio ou patológicas diferentes das de origem hepática, como observado nas gestantes que possuem alta concentração dessa enzima secretada pela placenta. Doenças ósseas, endócrinas, neoplasias e outras desordens podem resultar do aumento dessas hidrolases (Fernandes & Kidney, 2007).

1.3.3 Proteínas Fosfatases

1.3.3.1 Proteínas Tirosina Fosfatases (PTPs):

A fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas é o mecanismo chave no controle de muitas funções celulares em eucariotos, incluindo metabolismo, mobilidade, crescimento, diferenciação, migração celular e expressão gênica entre outros. As PTPs formam uma grande família, composta por mais de 100 membros. Existem tanto como receptores transmembrânicos como formas citosólicas (Bakalara *et al.*, 1995).

As proteínas tirosina fosfatases caracterizam-se por possuir aproximadamente 240 resíduos de aminoácidos, e um domínio altamente conservado com uma sequência consenso no sítio catalítico característico desta família ([I/V]HCXAGXXR[S/T]G), onde I- isoleucina, V- valina, H- histidina, C- cisteína, A- alanina, G- glicina, R-arginina, S- serina, T- treonina e X- qualquer aminoácido, compartilhando um padrão de sítio ativo constituído por uma cisteína e uma arginina, que são essenciais para a catálise (Aoyama *et al.*, 2003).

PTPs clássicas podem ser identificadas pela sensibilidade ao vanadato, insensibilidade ao ácido ocadáico, perda da dependência de íons metálicos, pH ótimo ácido ou neutro e total perda da atividade catalítica em caso de mutação entre a cisteína por serina no sítio ativo (Senna *et al.*, 2006).

Estudos bioquímicos e farmacológicos mostraram que essas enzimas exercem controle fisiológico de muitos tecidos regulando tanto positivamente, como negativamente vias de sinalização celular (Zhang *et al.*, 2002). Mudanças anormais na atividade dessas enzimas acarretam na fosforilação inapropriada de resíduos de tirosina, contribuindo para o desenvolvimento de várias patologias como neoplasias. Em uma transformação oncogênica ou estimulação de fatores de crescimento, o nível de proteínas

fosforiladas em resíduos de tirosina aumenta de 1 a 2% na célula, podendo levar a graves doenças como o câncer (Zhang *et al.*, 2002; Aoyama *et al.*, 2003).

Essas proteínas podem ser divididas de acordo com sua homologia de sequência no sítio ativo e especificidade por substratos em PTPs específicas, fosfatases com especificidade dual e proteínas fosfatases de baixa massa molecular relativa (Aoyama *et al.*, 2003).

- **PTP específica:** hidrolisam apenas resíduos de tirosina fosforilados; foram subdividas em dois subgrupos (PTP tipo receptor e citossólica), e estão envolvidas em mecanismos de comunicação célula-célula e transdução de sinal.

- **Fosfatases com especificidade dual:** capazes de hidrolisar fosfatos monoésteres de peptídeos contendo fosfotirosina e fosfoserina/treonina, porém exibindo maior afinidade com fosfotirosina. Esta característica dual parece estar associada à profundidade do sítio ativo. Essas enzimas estão envolvidas no controle do ciclo celular, entre outras funções.

- **PTPs de baixa massa molecular relativa:** são curiosas e caracteristicamente ativas em pH ácido (Aguirre-Garcia *et al.*, 2005). Não compartilham nenhuma homologia de sequência com qualquer outra PTP, exceto pelo padrão do sítio ativo e mecanismo de catálise. Possuem um importante papel na regulação da proliferação celular através de mecanismo que culmina na inibição da divisão celular.

PTPs foram identificadas em bactérias como *Yersinia sp.*, *Salmonella sp* e *Entamoeba histolytica* e em protozoários como *T. brucei*. (Aguirre-Garcia, *et al.*, 2005). A diferenciação do *T. brucei* da forma sanguínea para a forma procíclica é aparentemente acompanhada por aumento da fosforilação em resíduos de tirosina (Fernandes *et al.*, 2007). Bakalara e seu grupo em 1995, observaram diferenças na atividade de PTPs (entretanto sem identificar ou caracterizá-las) em formas epimastigotas e tripomastigotas

de *T. cruzi* e sugeriram que a atividade dessas enzimas nesses organismos é regulada pelo ciclo celular (Bakalara *et al.*, 1995).

1.3.3.2 Serina-Treonina fosfatases (Ser/Thr):

As proteínas fosfatases (PPs) hidrolisam proteínas fosforiladas em serina/treonina e ou com menos especificidade em tirosina (Harrison *et al.*, 1999). Seis principais classes de proteínas fosfatases foram identificadas em células eucarióticas, Proteína Fosfatase 1 (PP1), PP2A, PP2B, PP2C, PP4, PP5 e PP7. Esta classificação é baseada no uso de ativadores, inibidores e substratos específicos, e requerimento de cátions bivalentes (Orr *et al.*, 1999). Sequenciamento de aminoácidos e cDNA revelaram que PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5 e PP7 são membros da mesma família de genes, denominada de família PPP, a qual apresenta caracteristicamente uma seqüência homóloga de 280 aminoácidos. A proteína PP2C é estrutural e mecanicamente diferente dos membros da família PPP, sendo classificada como um membro da família PPM, família essa das proteínas fosfatases dependentes de Mg^{2+} (Orr *et al.*, 2000; González *et al.*, 2003).

A importância das PPs em eucariotos superiores se deve a sua participação em processos como arranjo de microtúbulos, crescimento, diferenciação e proliferação celular, uma vez que as mesmas podem regular a atividade de outras enzimas por desfosforilação de resíduos de serina, treonina e tirosina. A PP1, um tipo de proteína Ser/Thr fosfatase com importante papel em vários processos celulares do ponto de vista bioquímico, genético e farmacológico (Aoyama *et al.*, 2003), está envolvida na diferenciação e crescimento celular de formas epimastigotas de *T. cruzi*, estando ativa em pH 7,0 apresentando 61% de homologia com a PP1 de mamíferos (Orr *et al.*, 2000). Gonzáles e seu grupo demonstraram a presença de PP2A em *T. cruzi*, também ativa em pH 7,0 e propuseram que tenha papel central na diferenciação de formas tripomastigotas

para amastigotas, provavelmente regulando a estabilidade de microtúbulos (González *et al*, 2003).

Em *T. cruzi* cepa G, PP2A é importante para a completa transformação de tripomastigotas em amastigotas durante o ciclo de vida deste protozoário. Esta enzima tem uma alta homologia com a PP2A de *T. brucei*, mas homologia não significativa com a enzima presente em humanos (González *et al*, 2003).

2. Objetivos:

Como descrito na Introdução, muitos grupos de pesquisa têm focado seus estudos nas ectofosfatases, justificando sua importância pela localização possível envolvimento em interações célula-célula, e papel central na modulação de diversas funções bioquímicas em *Trypanosoma spp.* Nosso principal interesse foi determinar a atividade de fosfatases utilizando-se homogenizados celulares, de duas cepas de *T. cruzi* pertencentes a diferentes linhagens e com diferentes resistências ao estresse oxidativo. As cepas selecionadas para esse estudo foram: Y (linhagem II) e Tulahuen 2 (linhagem I).

Os objetivos desse trabalho foram:

Comparar as duas cepas quanto às seguintes características:

- Especificidade das fosfatases pelo substrato (*p*-NPP), e determinação dos parâmetros cinéticos como K_m e $V_{máx}$;
- Influência do tempo de reação na atividade enzimática;
- Comportamento das fosfatases ao longo da curva de crescimento em relação ao pH e a presença e/ ou ausência de provável cofator no meio de reação;
- Comportamento das enzimas na presença de Ca^{2+} ;
- Avaliação da atividade enzimática na presença de inibidores específicos.

3. Materiais e métodos:

3.1 Cultura de células e obtenção do homogenato celular:

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepas Tulahuen 2 e Y) foram crescidas à 28°C em meio LIT (76 mM NaCl, 5,9 mM KCl, 12,3 mM de glicose, 78,5 mM Na₂HPO₄, 0,56% triptose, 0,56% de infusão de fígado, 20 mg.L⁻¹ de hemina, pH 7,4) e 10% de soro fetal bovino inativado (Castellani *et al.*, 1967). O homogenado celular foi preparado com células em início da fase estacionária (após 5 dias de proliferação) (Cicarelli *et al.*, 2007). As células foram coletadas por centrifugação (2500 rpm, 5 min a 4 °C), lavadas uma vez com solução fisiológica, sendo posteriormente ressuspensas em tampão Hepes (10 mM) pH 7,0 ou tampão Acetato de Sódio (10 mM) pH 5,0 de acordo com o descrito nas legendas das figuras. A sonicação foi realizada em sonificador da marca Bandelin Sonoplus, em dois ciclos de 10 segundos (intervalo de 10 segundos entre os ciclos) com 45% de potência. Utilizando-se essas condições, todas as células foram lisadas. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método do Biureto (Gornall *et al.*, 1949), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão. Para as determinações durante as diferentes fases de crescimento, as células foram coletadas após 3 dias (fase log) e 7 dias (final da fase estacionária) dias e o mesmo procedimento descrito acima foi empregado.

3.2 Avaliação da atividade fosfatásica:

O homogenato celular foi incubado por 15 minutos a 37 °C em 1 mL de meio reacional, contendo o tampão e 10 mM do substrato *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP). Os tampões utilizados na concentração final de 0,1 M foram: Citrato de sódio para pH 3,0, Acetato de sódio para ensaios em pH 4,0 e 5,0, para pH 6,0 Bis-Tris, nas determinações em pH 7,0 Hepes e Tris-HCl para pH 8 (Letelier *et al.*, 1986). A reação foi iniciada pela

adição do homogenato celular e paralisada com 1 mL de NaOH 1 M. No branco, o homogenato celular foi adicionado após a adição da solução de NaOH. A atividade também foi determinada na presença de 10 mM de Mg^{2+} e 1 mM de Ca^{2+} (concentrações finais) exógenos. A formação do *p*-nitrofenol (*p*-NP), produto da reação enzimática foi determinada pela leitura da absorbância em 405 nm, considerando-se o valor de $18000 \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ como a absorvidade molar da forma do *p*-NP (Prazeres *et al*, 2004). Em todos os ensaios, uma unidade de atividade enzimática (UE) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de produto por minuto. A atividade enzimática específica (AE) foi expressa como unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína ($AE = UE \cdot \text{mg}^{-1}$).

Fórmula da unidade enzimática:

$$U.E. = \frac{\text{Abs}_{(405\text{nm})} \times \text{volume total}^* (\text{mL}) \times 10^6}{\text{Tempo reação (min)} \times \text{volume extrato} (\mu\text{L}) \times \epsilon (p\text{-NP})}$$

* volume reacional + volume de NaOH adicionado.

3.3 Ensaios com inibidores:

A atividade de fosfatases na presença de inibidores foi realizada como descrito em 3.2, na presença do inibidor. Foram estudados os inibidores de: proteína tirosina fosfatase, $ZnSO_4$, *o*-vanadato de sódio, *p*-hidroximercuribenzoato (*p*HMB) e pervanadato (de Almeida-Amaral *et al.*, 2006); fosfatase ácida, tartarato e fluoreto de sódio (Fernandes *et al.*, 2007) e fosfatase alcalina, KH_2PO_4 (Dutra *et al.*, 2006). As concentrações de inibidores utilizadas nos ensaios estão descritas nas figuras.

3.4 Análise estatística:

Os resultados representam as médias de no mínimo cinco experimentos independentes, os quais foram realizados em duplicata. As barras representam o desvio padrão. Os dados foram analisados estatisticamente pelo Student's t test, valores de p igual ou menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Valores aparentes de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, foram calculados utilizando-se a regressão não linear computadorizada dos dados para a equação de Michaelis-Menten através de programa Microcal TM Origin[®], versão 6,0.

4. Resultados e discussão:

Estudos realizados anteriormente em nosso laboratório apontaram diferenças importantes entre as cepas de *T. cruzi*, Y e Tulahuen 2, em relação à resistência ao estresse oxidativo gerado pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), níveis de proliferação celular e concentração de tripartedoxina peroxidase citosólica (Mielniczki-Pereira *et al.*, 2007). Visto que em eucariotos reações de fosforilação e desfosforilação são vias fundamentais na regulação de uma ampla variedade de funções, como proliferação celular e nutrição entre outras, decidiu-se investigar as atividades das fosfatases nessas duas cepas.

4.1 Determinação da concentração de extrato celular:

O primeiro passo na realização deste trabalho foi determinar a concentração protéica ideal do extrato celular (homogenato), visando padronizar os experimentos subsequentes.

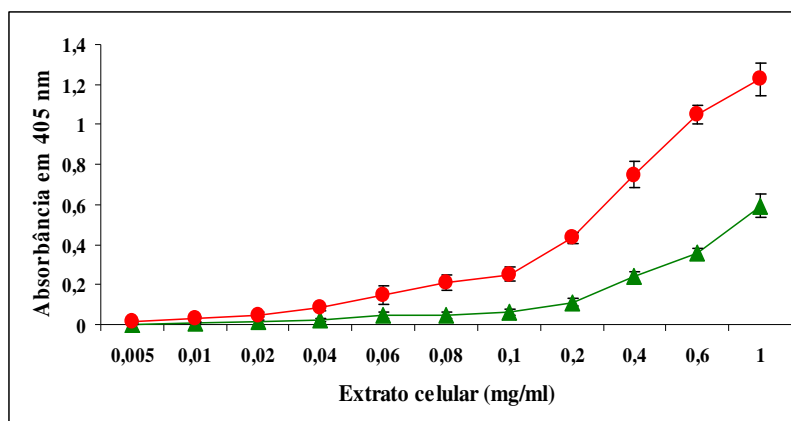


Figura 2 - Efeito da concentração de proteínas totais sobre o nível de *p*-NPP hidrolisado. Diferentes concentrações de extrato celular, das cepas de *T. cruzi* Tulahuen 2 (●) e Y (▲) foram incubadas em tampão Acetato de sódio pH 5,0 e a hidrólise do *p*-NPP foi determinada conforme descrito em materiais e métodos.

A desfosforilação do *p*-NPP foi dependente da concentração de proteína (Fig.2) para ambas as cepas, embora a Y tenha mostrado atividade de fosfatases menor em relação à outra cepa. Esse resultado, levou a escolha das concentrações de 0,1 mg/mL e 0,6 mg/mL de extrato celular para Tulahuen 2 e Y respectivamente, uma vez que aproximadamente o mesmo valor de absorbância é observado para as duas cepas. Isso é importante, pois efeitos de estímulo ou inibição da atividade enzimática puderam ser detectados na faixa de sensibilidade do espectrofotômetro.

Letelier e colaboradores em 1985 realizaram um estudo semelhante com a cepa Tulahuen (diferente da Tulahuen 2) comparando a atividade de fosfatases em extrato celular e em células intactas. Os resultados obtidos demonstraram que a produção do *p*-NP foi proporcional à concentração de células ou a concentração protéica, embora o extrato celular tenha promovido uma maior hidrólise do *p*-NPP em relação às células intactas. Tal fato foi atribuído à penetração e solubilidade do substrato em células inteiras; uma vez estando homogeneizadas, a disponibilidade e facilidade da interação fosfatases – *p*NPP é maior.

4.2 Tempo de incubação:

Partindo-se das concentrações de extrato celular pré-determinadas, analisamos o efeito do tempo reacional, objetivando estabelecer as condições ideais para a realização desse estudo (Fig.3).

A atividade de fosfatases presentes na cepa Tulahuen 2 foi linear com o aumento do tempo de incubação. O mesmo perfil foi exibido pela cepa Y até 15 minutos de reação, quando se constatou não haver diferença significativa na atividade enzimática com o aumento do tempo de incubação. Assim esse tempo foi adotado para os testes posteriores.

Neste tempo observamos uma atividade específica de 0,86 para a cepa Tulahuen 2 enquanto que a cepa Y apresentou atividade específica aproximadamente 32 vezes menor.

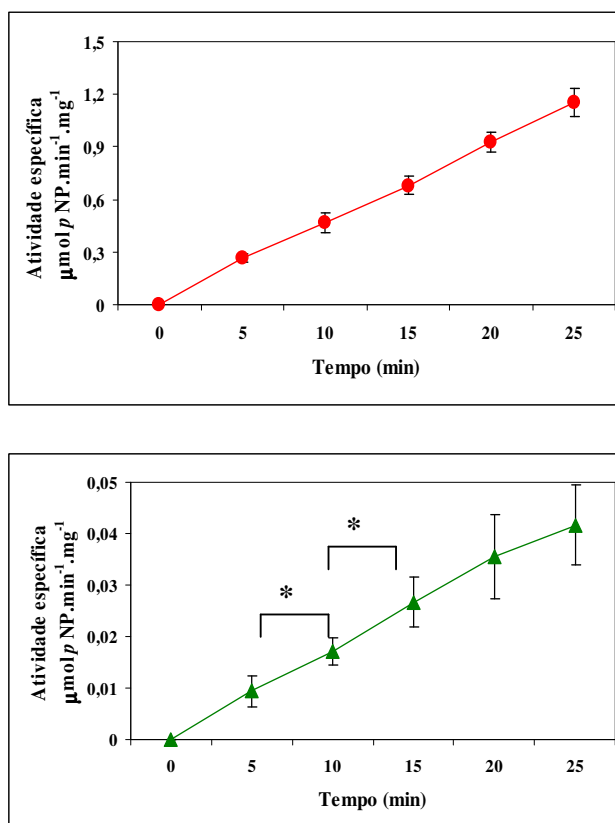


Figura 3 - Determinação da atividade de fosfatases em função do tempo de incubação. Incubações do extrato celular (Tulahuen 2, 0,1 mg/ml (●) e Y (▲), 0,6 mg/ml) em tampão Acetato de sódio pH 5,0 por 25 min foram realizadas e a atividade enzimática foi determinada conforme descrito em materiais e métodos. *Análise estatística:* * $p > 0,05$ representa diferença não significativa.

4.3 Parâmetros cinéticos:

A Figura 4 e Tabela I resumem os parâmetros cinéticos das fosfatases das duas cepas.

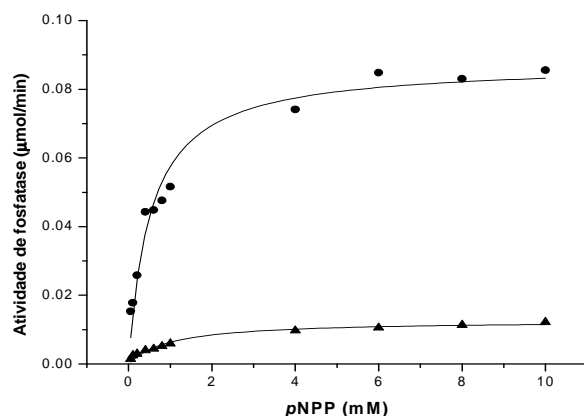


Figura 4 - Determinação dos parâmetros cinéticos das cepas Tulahuen 2 (●) e Y (▲). Concentrações crescentes de *p*-NPP foram utilizadas, para se determinar os valores aparentes de K_m e $V_{máx}$. A incubação foi feita em tampão Acetato de sódio pH 5,0 por 15 min.

Tabela I - Determinação dos parâmetros cinéticos das fosfatases de *T. cruzi*.

	Cepas	
Parâmetros cinéticos	Y	Tulahuen 2
K_m (mM)	1.04 ± 0.04	0.59 ± 0.2
$V_{máx}$ (µmol/min)	0.013	0.087
Constante de especificidade ($V_{máx}/K_m$)	0.012	0.147

Os parâmetros cinéticos foram calculados a partir da Figura 4. *Análise estatística:* $p < 0,05$ para todos os resultados.

Os parâmetros cinéticos exibidos na Tabela I, revelam um valor de K_m obtido para a cepa Y cerca de 1,8 vez maior que para a Tulahuen 2, refletindo uma baixa afinidade das enzimas da cepa Y pelo substrato *p*-NPP. Comparando-se os valores aparentes de $V_{máx}$ e constante de especificidade, a cepa Tulahuen 2 alcançou valores 7 e 12,3 vezes respectivamente, maiores que os da cepa Y. Este grupo de resultados mostra que a alta capacidade de hidrólise do substrato pelas enzimas da Tulahuen 2 (Fig. 2) é reflexo da maior especificidade pelo substrato.

4.4 Atividade de fosfatases nas diferentes fases da proliferação celular:

Alguns autores vêm demonstrando a capacidade do *T. cruzi* em se adaptar aos micro habitats com diferentes pHs aos quais é submetido ao longo de suas transformações morfológicas. As formas epimastigotas são aptas a sobreviver em ambientes com pH variando de 5,0 a 9,0; as tripomastigotas metacíclicas sobrevivem por poucas horas no meio ácido do vacúolo fagocitário (pH 4,5 – 5,5) e as amastigotas, multiplicam-se e transformam-se em tripomastigotas, os quais destroem a célula do hospedeiro escapando para o ambiente intercelular e sangue em meio neutro (pH 7,0 – 7,2). Além disso, as fases do ciclo de vida deste protozoário são condicionadas por uma série de mudanças abruptas no pH extracelular (Gil *et al.*, 2003).

Partindo desses conhecimentos decidiu-se investigar a atividade de fosfatases em diferentes pHs ao longo da curva de proliferação de formas epimastigotas (Fig. 5). Após 3 dias (começo da fase logarítmica), 5 dias (começo da fase estacionária) e 7 dias (fase estacionária) de proliferação as atividades enzimáticas foram determinadas.

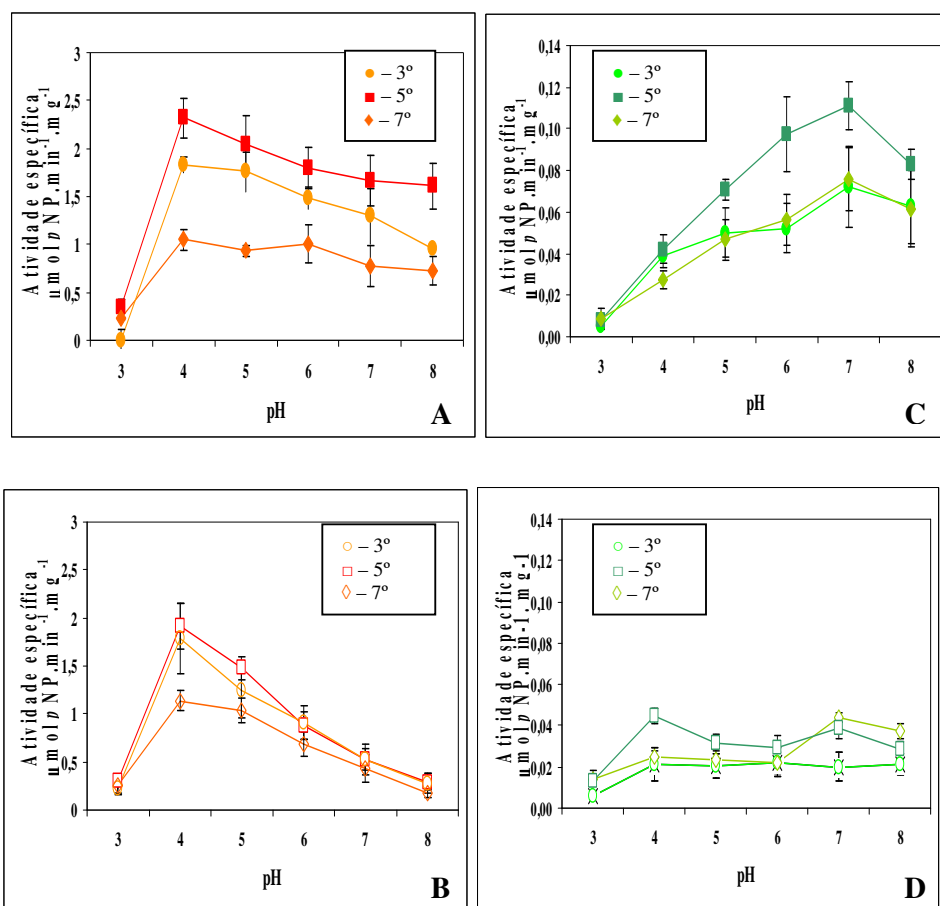


Figura 5 - Análise da atividade de fosfatases nas diferentes fases de proliferação celular. A atividade das fosfatases foi determinada nos extratos protéicos das cepas Tulahuen 2 (A- com 10mM de Mg²⁺) e (B- sem Mg²⁺) e na Y (C- com 10mM de Mg²⁺) e (D- sem Mg²⁺), nas diferentes fases da proliferação. *Análise estatística:* diferença significativa para todos ($p < 0,05$). Não significativa em: (A - 3° e 5° dias pH 5,0 e 3° and 7° dias no pH 8,0); (B - 3° e 5° dias: pH 4,0-8,0 5° e 7° dias: pH 3 e 7, 3° and 7° dias: pH 3, 5,0-8,0); (C - 3° and 5° dias, pH 4,0, 5° and 7° dias: pH 3,0, 3° and 7° dias: pH 5,0-8,0) e (D - 3° e 5° dias, pH 6,0, 5° e 7° dias: pH 3,0 e 7,0, 3° e 7° dias: pH 4,0-6,0).

Em geral, observou-se um aumento na atividade de fosfatases concomitantemente com a progressão da proliferação celular até a fase estacionária (7° dia), onde as atividades diminuíram a níveis próximos ou abaixo dos observados no início da fase log (3° dia).

O efeito da adição do magnésio foi avaliado uma vez que o mesmo é cofator para as fosfatases alcalinas. É importante ressaltar que com a adição de magnésio a atividade dependente e independente de magnésio foram medidas.

Com a cepa Tulahuen 2, na presença de Mg^{2+} , estando as células no início da fase estacionária (5º dia), um aumento significativo na atividade de fosfatases foi observado em pH 4,0 e 8,0 (21 e 40% respectivamente) (Fig. 5A). Na fase estacionária de crescimento (7 dias), uma diminuição de 55% em todos os pHs foi observada em comparação ao início desta fase. Este resultado assemelha-se ao obtido por Letelier e seu grupo, que reportaram a diminuição da atividade de fosfatases ácidas e alcalinas em 60% quando as culturas atingiram a fase estacionária de crescimento (Letelier *et al.*, 1985). No mesmo trabalho estabeleceram uma correlação entre essas atividades e as fosfatases localizadas no citosol e não ligadas a membranas.

Observando os resultados obtidos com células no início da fase estacionária, em ambas as cepas, a atividade de fosfatases foi maior em relação aos outros dias (Fig. 5A e C), indicando um papel importante das fosfatases nessa fase de crescimento. É interessante notar que na cepa Tulahuen 2 a atividade de fosfatases em pH 4,0 foi a mais pronunciada, enquanto que na Y uma maior atividade foi observada em pH 7,0. Muitos autores têm atribuído às fosfatases ácidas envolvimento em processos de nutrição do *T. cruzi* (Avila *et al.*, 1979; Letelier *et al.*, 1985; Dutra *et al.*, 2006) e às proteína tirosina fosfatases (PTPs), envolvimento na proliferação celular (Bakalara *et al.*, 1995). Um trabalho realizado em nosso laboratório com as cepas Tulahuen 2 e Y mostrou diferenças entre a densidades populacionais quando as duas cepas atingiram a fase estacionária de crescimento, tendo a Tulahuen 2 atingido a fase estacionária no mesmo tempo que a Y, porém com uma densidade populacional maior (Mielniczki-Pereira *et al.*, 2007). Um dos fatores que favorecem a entrada das células na fase estacionária é a disponibilidade de substratos. Assim, os resultados obtidos para as fosfatases em conjunto com o estudo de Mielniczki-Pereira sugerem que a cepa Tulahuen 2 por ter uma

maior atividade de fosfatases ácidas, seja capaz de proliferar-se mais rapidamente que a cepa Y.

Ainda analisando os resultados obtidos com adição de Mg^{2+} ao meio reacional (Fig. 5A e C), há a sugestão de que o Mg^{2+} seja um importante cofator para as fosfatases alcalinas, principalmente na cepa Y (Fig. 5C). Surpreendentemente, quando os ensaios foram realizados sem adição de Mg^{2+} ao meio reacional, uma diferença significativa na atividade de fosfatases (diminuição de 40%), para ambas cepas em pH 4,0 foi observada quando atingiram a fase estacionária (7º dia) (Fig. 5B e D).

Quando analisamos a atividade de fosfatases na cepa Y com adição de magnésio ao meio reacional, diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre o começo da fase estacionária e o começo da fase logarítmica e a fase estacionária, sendo as duas últimas iguais nos pHs 6,0 – 8,0 (Fig. 5C). É importante mencionar que diferentemente da cepa Tulahuen 2, na cepa Y atividades similares foram observadas no 3º e 7º dia de proliferação.

4.5 Efeito da adição de Ca^{2+} sobre a atividade de fosfatases:

O aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} em *T. cruzi* e nas células do hospedeiro é indispensável para o processo de invasão do parasita (Moreno *et al.*, 2007). Além do mais, mudanças no desenvolvimento e níveis de proliferação celular podem igualmente depender de cálcio (Moreno *et al.*, 2007). Uma proteína homóloga de calcineurina (PP2B) foi identificada em *T. cruzi*. Aparentemente, a mesma perdeu sua regulação por Ca^{2+} , sendo regulada diferentemente no *T. cruzi*. Entre as Ser/Thr fosfatases esta é a única conhecida que possui regulação pelo sistema Ca^{2+} /Calmodulina e é importante, pois está envolvida em ativação de cascata apoptótica (Moreno *et al.*, 2007). Em *Leishmania donovani* essa fosfatase foi identificada, estando

ativa em pH 7,5, exibindo dependência do sistema Ca^{2+} -calmodulina para estar ativa, entretanto seu papel fisiológico não está elucidado (Banerjee *et al.*, 1999).

Tomando essas informações, decidimos investigar os efeitos do cálcio sobre a atividade de fosfatases nos homogenatos celulares em uma ampla faixa de pH.

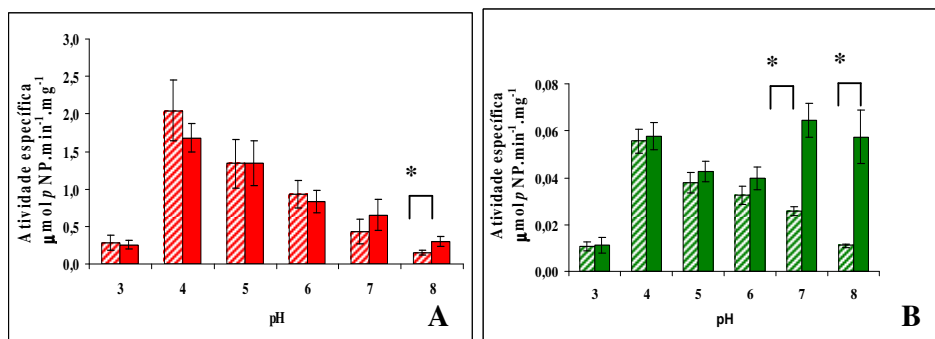


Figura 6 – Influência do cálcio sobre a atividade de fosfatases do *T. cruzi*. O extrato celular das cepas Tulahun 2 (A) e Y (B), foi incubado na presença (coluna rachurada) e ausência (coluna preenchida) de 1mM de CaCl_2 . Os tampões utilizados e as demais condições encontram-se em materiais e métodos. *Análise estatística:* * $p < 0,05$ representa diferença significativa.

Como pode ser visto na Figura 6, a adição de cálcio ao meio de reação, provocou efeito inibitório significativo na atividade de fosfatases da cepa Tulahun 2 (A) em pH 8,0, promovendo uma redução de 50% da atividade enzimática. A atividade das fosfatases da cepa Y (B) foi inibida, porém, nos pHs 7,0 (50%) e 8,0 (75%).

A literatura disponível relata que as fosfatases alcalinas têm pH ideal entre 8,0 e 9,0 e que dependem de cofatores como magnésio, cobalto ou manganês (Aoyama *et al.*, 2003). Embora o cálcio seja um íon bivalente, não há referências do mesmo como cofator para fosfatases alcalinas. Entretanto, o cálcio compete com os cofatores, exercendo inibição sobre a atividade enzimática de fosfatases alcalinas. O comportamento do cálcio como um inibidor ocorreu em valores altos de pH (8,0) para as duas cepas, onde as fosfatases alcalinas estão ativas. Curiosamente na cepa Y em

pH 7,0 um efeito inibitório (50%) foi observando, entretanto essa inibição foi mais pronunciada em pH 8,0 (75%). O trabalho publicado por Dutra e colaboradores em 2006, relatando que em pH 6,8 o cálcio não causa nenhuma alteração na atividade de fosfatases de formas epimastigotas de *T. cruzi*, assemelha-se ao resultado obtido com a cepa Tulahuen 2, uma vez que em pH 7,0 o cálcio não interferiu significativamente na atividade das fosfatases (Dutra *et al.*, 2006). Visto que nessa faixa de pH não estão ativas as fosfatases alcalinas e mesmo o grupo de Dutra empregando uma concentração 5 vezes maior de cálcio do que a utilizada nesse estudo, não detectaram diminuição na atividade enzimática (Dutra *et al.*, 2006). Intrigantemente o ocorrido com a cepa Y, levou-nos a outra hipótese, talvez nessa cepa em pH 7,0 algum tipo de proteína fosfatase dependente de cofator esteja ativa e não uma fosfatase alcalina, já que esse grupo de fosfatases apresenta atividade apenas em valores acima do pH 8,0.

4.6 Ação dos inibidores sobre a atividade das fosfatases:

Ao observarmos, o comportamento das cepas em relação ao pH, decidimos utilizar os valores onde a atividade mostrou-se mais pronunciada (4,0 e 7,0), para realizar os testes com inibidores específicos. Desde o começo do trabalho, estudamos as fosfatases em células no início da fase estacionária (5 dias), com interesse de entender mecanismos que se diferenciam nas duas cepas, nesse período da proliferação. De fato, os dados mostrados na Fig. 4, nos indicaram ser essa a fase da proliferação mais interessante para o estudo ser conduzido.

O estudo voltou-se então à investigação do perfil de alguns inibidores sobre a atividade de fosfatases nos pHs 4,0 (Tabela II) e 7,0 com e sem adição de Mg^{2+} (Tabela III).

Tabela II – Efeito de moduladores sobre a atividade de fosfatases de *T.cruzi* em pH 4,0

Moduladores	Inibição da atividade de fosfatases (%)	
	Tulahuen 2	Y
EDTA (1 mM)	11*	10*
NaF (10 mM)	92	88
Tartarato (10 mM)	77	68
KH₂PO₄ (5 mM)	25	-*
pHMB (1 mM)	26	-*
ZnSO₄ (1 mM)	16*	-*
o-vanadato (1 mM)	93	62
Pervanadato (0.1 mM)	88	70
Pervanadato (1 mM)	84	66

Os homogenados celulares foram incubados em tampão Acetato, pH 4,0 por 15 min, na presença de diferentes moduladores. Controle (100% de atividade de fosfatase): $1,75 \pm 0,36$ e $0,05 \pm 0,008 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ para as cepas Tulahuen 2 e Y, respectivamente. *Análise estatística*: * $p > 0,05$ foram considerados não significativos. Ausência de inibição é representada por (-).

Os resultados da (Tabela II) demonstraram que em pH 4,0 o agente quelante EDTA não teve efeito em ambas as cepas, indicando a ausência de fosfatases dependentes de metal neste pH nessas duas cepas de *T. cruzi*. Os inibidores clássicos de fosfatases ácidas, tartarato e fluoreto de sódio (Bakalara *et al.*, 1995) causaram o mesmo efeito nas duas cepas (inibição de 70 e 90% da atividade respectivamente), embora o fluoreto de sódio tenha sido mais efetivo. Fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄), um inibidor de fosfatase alcalina, inibiu em 25% a atividade enzimática na cepa Tulahuen 2 e falhou na inibição na cepa Y. Interessantemente, Dutra e colaboradores observaram o mesmo efeito deste inibidor sobre a atividade de ectofosfatases da cepa Y (Dutra *et al.*, 2006). Achamos intrigante o fato do KH₂PO₄ ter exibido efeito inibitório sobre as fosfatases da cepa Tulahuen 2 em pH 4,0 uma vez que nesse valor de pH as

fosfatases alcalinas não estão ativas, esse resultado nos levou à hipótese de que este inibidor não seja específico para fosfatases alcalinas.

A fosforilação de proteínas especificamente em resíduos de tirosina compreende um dos principais mecanismos de controle para uma série de eventos como, proliferação celular, diferenciação, metabolismo, ciclo celular e expressão gênica, entre outros (Cuevas *et al.*, 2005). As PTPs, como dito anteriormente, dependem do resíduo de cisteína, que é essencial para a catálise enzimática (Ferraro *et al.*, 2007). Esse resíduo de cisteína pode ser regulado por reações reversíveis de oxidação/redução por agentes oxidantes celulares (Ferraro *et al.*, 2007; Chiarugi, 2005) que provavelmente estão envolvidos no mecanismo de regulação *in vivo* da atividade desta classe de enzimas (Huyer *et al.*, 1997). Bakalara e colaboradores propuseram em 1995, que a atividade de PTPs pode desempenhar um papel central no crescimento e diferenciação de formas sanguíneas do *T. brucei* (Bakalara *et al.*, 1995).

As células da cepa Tulahuen 2 alcançam a fase estacionária no mesmo ponto que as da cepa Y, porém com uma densidade celular maior (Mielniczki-Pereira *et al.*, 2007). Essa diferença no número de células pode ser resultado de um aumento da atividade de PTPs nas mesmas, estimulando sua proliferação. Os dados representados na Figura 5 A e B, mostram em todas as fases da proliferação celular uma maior atividade de fosfatases na cepa Tulahuen 2 em comparação a outra cepa.

A partir destes resultados e das informações obtidas na literatura evidenciando a importância das PTPs, decidimos testar os efeitos de diferentes inibidores clássicos sobre a atividade desse grupo de fosfatases. O *pHMB*, um conhecido inibidor de enzimas dependentes de grupamentos SH, promoveu baixa inibição da atividade enzimática na cepa Tulahuen 2 (26%), enquanto que na cepa Y não afetou a atividade. Zinco, cujo mecanismo inibitório pode envolver oxidação reversível do resíduo de

cisteína, ou ainda a ligação coordenada de átomos de zinco no sítio ativo (Ferraro *et al.*, 2007), não teve efeito expressivo em ambas as cepas.

Os inibidores *o*-vanadato e pervanadato têm sido amplamente estudados por seus efeitos insulino miméticos e são geralmente empregados para inibir a atividade catalítica das PTPs. Pervanadato (combinação 1:1 de *o*-vanadato e peróxido de hidrogênio) é um inibidor irreversível das PTPs, diferente do *o*-vanadato que possui inibição completamente reversível (Lau *et al.*, 1989; Huyer *et al.*, 1997). O pervanadato é um potente inibidor de PTP graças ao H₂O₂, que promove a inativação enzimática através da oxidação da cisteína essencial para a catálise (Huyer *et al.*, 1997). Estudos *in vitro* mostram que tal inibição é revertida apenas em incubações contendo tióis (Chiarugi, 2004). O mecanismo de inibição pelo *o*-vanadato é atribuído a sua conformação quando oxidado, pois assume forma tetraédrica, semelhante a estrutura do fosfato, agindo competitivamente (Chiarugi, 2004). Houve inibição de 93% na atividade das fosfatases da cepa Tulahuen 2 e 62% nas da cepa Y quando *o*-vanadato foi testado. O pervanadato, inibiu em 88 e 70% a atividade enzimática nos extratos celulares de Tulahuen 2 e Y respectivamente.

Tabela III - Efeito de moduladores sobre a atividade de fosfatases de *T.cruzi* dosadas em pH 7,0 com ou sem adição de Mg^{2+} (10mM).

Moduladores	Inibição da atividade de fosfatases (%)			
	Tulahuen 2		Y	
	- Mg^{2+}	+ Mg^{2+}	- Mg^{2+}	+ Mg^{2+}
EDTA (1 mM)	4	ND	43	ND
NaF (10 mM)	80	96	75	86
pHMB (1 mM)	65	67	57	7*
Tartrato (10 mM)	12*	18*	20*	7*
o-vanadato (1 mM)	75	90	84	86
KH_2PO_4 (5 mM)	33	34	20*	21*
$ZnSO_4$ (1 mM)	42	83	36	71
Pervanadato (0.1 mM)	79	83	59	79
Pervanadato (1 mM)	69	89	75	93

Os homogenatos celulares foram incubados em tampão Hepes 1M, pH 7,0 por 15 min, na presença de diferentes moduladores. Controle (100% de atividade de fosfatase): $0,52 \pm 0,09$ e $1,60 \pm 0,39 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ para a cepa Tulahuen 2, com e sem adição de Mg^{2+} (10 mM) adicionado respectivamente. Para a cepa Y $0,044 \pm 0,008$ e $0,14 \pm 0,04 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, com ou sem adição de Mg^{2+} respectivamente. *Análise estatística:* * $p > 0,05$ foram considerados sem diferença significativa. Ausência de inibição é representada por (-) e não determinada por (ND).

Analisando-se os resultados obtidos com a cepa Tulahuen 2 em meio reacional com pH 7,0 sem adição de Mg^{2+} (Tabela III), EDTA e tartarato não inibiram significativamente as fosfatases. Entretanto, o fluoreto (NaF), outro inibidor de fosfatases ácidas promoveu uma inibição na ordem de 80%. O inibidor de fosfatase alcalina, KH_2PO_4 , levou a uma inibição de 33% na atividade enzimática, sendo o mesmo padrão de inibição observado com a adição de magnésio à reação, mas como em pH 7,0 as fosfatases alcalinas estão inativas, provavelmente esses resultados são devidos à inibição da atividade de outro tipo de fosfatase, talvez uma proteína fosfatase. Relacionando esse resultado aos obtidos na presença de cálcio (Fig. 6-A) podemos levantar a hipótese de que a cepa Tulahuen 2 possua um tipo de fosfatase ativa em pH 7,0 e que provavelmente sua atividade não dependa de cofator. Os inibidores de PTP,

*p*HMB e Zn^{2+} , promoveram uma inibição de 65 e 42% respectivamente. O *o*-Vanadato e pervanadato tiveram efeito similar, que foi de 75 e 79%. Comparando este perfil com o da cepa Y, notamos que o EDTA tem um forte efeito inibitório, enquanto que o do tartarato e do KH_2PO_4 não foi significativo (20%). O *p*HMB, Zn^{2+} e *o*-vanadato, inibiram a atividade em 57, 36 e 84% respectivamente. Talvez a fosfatase alcalina da Y seja semelhante a do trabalho de Dutra, onde levantam a suposição de estarem tratando de uma nova fosfatase, pois o KH_2PO_4 falhou em inibir a atividade desta enzima sem magnésio adicionado ao meio. No caso deste trabalho observamos que tanto na presença quanto ausência do Mg^{2+} os níveis de inibição foram baixos (aproximadamente 20%) respectivamente. Interessantemente, foi necessário aumentar em 10 vezes a concentração de pervanadato quando a atividade de fosfatases foi dosada na cepa Y, para se obter o nível semelhante de inibição alcançado na cepa Tulahuen 2.

Quando Mg^{2+} exógeno estava presente na reação, uma alta porcentagem de inibição foi observada com fluoreto, zinco e pervanadato, para ambas as cepas. O *o*-vanadato promoveu nas duas cepas alta inibição, entretanto na cepa Tulahuen 2 essa inibição foi maior na presença de magnésio. Tartarato não promoveu inibição significativa, KH_2PO_4 (e *p*HMB inibiram as fosfatases da Tulahuen 2 de forma diferente, tendo o *p*HMB exibido praticamente o dobro de inibição em relação ao KH_2PO_4 .

Resultados interessantes foram obtidos com a cepa Y na presença de *p*HMB e tartarato. Especulamos que o Mg^{2+} pôde interagir no sítio de reação bloqueando o acesso do inibidor à enzima, uma vez que a presença de magnésio reverteu a inibição alcançada na reação sem a adição desse cátion.

O substrato artificial, inespecífico e de baixo peso molecular *p*NPP utilizado nesses experimentos permitiu determinar a atividade de fosfatases presentes em extrato

celular das cepas Tulahuen 2 e Y de *T. cruzi*. O entendimento mais preciso sobre essas proteínas fosfatases requer uma investigação detalhada com substratos específicos, visando uma melhor caracterização das fosfatases nos pHs estudados.

5. Conclusões:

- As cepas Tulahuen 2 e Y apresentam diferentes parâmetros cinéticos, resultantes da diferença na constante de especificidade pelo substrato, exibindo a cepa Tulahuen 2 12 vezes mais afinidade pelo *p*-NPP que a cepa Y.

- As fosfatases da cepa Tulahuen 2 foram mais ativas em pH 4,0 mesmo com adição de Mg^{2+} ao meio. Na cepa Y, a maior atividade de fosfatases após a adição do magnésio foi em pH 7,0.

- O perfil de inibição promovido pelo Ca^{2+} sugere que as cepas Tulahuen 2 e Y possuem fosfatase alcalina ativa apenas em pH 8,0; na cepa Y provavelmente uma proteína fosfatase dependente de cofator está ativa em pH 7,0.

- Os inibidores mostraram que em pH 4,0 o perfil de fosfatases ácidas é semelhante nas duas cepas. Entretanto, a cepa Tulahuen 2 apresenta maior atividade de PTP. Isso nos leva a concluir que não apenas as fosfatases ácidas são as responsáveis pelas diferenças observadas na proliferação celular (início da fase estacionária). Talvez ocorra sinergismo entre esses dois grupos de enzimas promovendo a proliferação das células.

- Diferentemente do descrito na literatura, ambas as cepas apresentam fosfatases ácidas ativas também em pH neutro, uma vez que o NaF inibiu cerca de 80% da atividade de fosfatases medidas em pH 7,0.

Esses resultados reforçam a heterogeneidade existente na população de *T. cruzi* e indicam um possível envolvimento das fosfatases no ciclo celular do parasita, assim

uma caracterização mais específica dessas enzimas poderá fornecer indícios de novos alvos para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da doença de Chagas.

6. Referências bibliográficas:

Adade, C.M., de Castro, S.L., Soares, M.J. Ultrastructural localization of *Trypanosoma cruzi* lysosomes by aryl sulphatase cytochemistry. *Micron*. 2007; 38(3): 252-256.

de Almeida Amaral. E.E., Belmont, F. R., Vannier-Santos, M.A., Meyer-Fernades, J.R. *Leishmania amazonensis*: Characterization of an ecto-phosphatase activity. *Exp. Parasitol.* 2006; 114(4): 334-340.

Amato Neto, V. Modalidades alternativas de transmissão: empecilhos às cogitações de erradicação da doença de Chagas. Ver. Hosp. Clín. Fac. Méd. S. Paulo. 1984; 39: 93-95.

Aoyama, H., Silva, T.M.A., Miranda, M.A., Ferreira, C.V. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Quim. Nova*. 2003; 26(6): 896-900.

Avila, J.L., Casanova, A., Avila, A., & Breña, A. Acid and neutral hydrolases in *Trypanosoma cruzi*. Characterization and assay. *J. Protozool.* 1979; 26(2): 304-311.

Bakalara, N., Seyfang, A., Davis, C., Baltz, T. Characterization of a life-cycle-stage-regulated membrane protein tyrosin phosphatase in *Trypanosoma brucei* - *Eur. J. Biochem.* 1995; 234(3): 871-877.

Bakalara, N., Seyfang, A., Baltz, T. & Davis, C. *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*: life cycle-regulated protein tyrosine phosphatase activity. *Experimental Parasitology*. 1995; 81: 302-312.

Banerjee, C., Sarkar, D. & Bhaduri, A. Ca^{2+} and calmodulin-dependent protein phosphatase from *leishmania donovani*. *Parasitology*. 1999; 118: 567-573.

Barford, D. Protein phosphatases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1995; 5(6): 728-734.

Brener, Z., Zilton, A.A., Barral-Neto, M. *Trypanosoma cruzi e doença de chagas*, 2ª ed: Guanabara Koogan, 2000.

Chiarugi, P. PTPs versus PTKs: the redox side of the coin. *Free Radical Research*. 2005; 1-13.

Coura, J.R., Barretto, T.V., Naranjo, M.A. Ataque de populações humanas por triatomíneos sivistres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção chagásica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1994; 27:251-3.

Coura, J.R. Tripanossomose, doença de Chagas. *Ciê. Cult.* (São Paulo). 2003; 55:30-33.

Cuevas, I. C., Rohloff, P., Sánchez, D. O., Docampo, R. Characterization of Farnesylated Protein Tyrosine Phosphatase Tc PRL-1 from *Trypanosoma cruzi*. *Eucaryotic Cell*. 2005; 4(9): 1550-1561.

De Duve C., Pressman B.C., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmans F. Tissue fractionation studies. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.* 1955; 60(4):604-17.

De Duve C., Wattiaux R., Baudhuin P. Distribution of enzymes between subcellular fractions in animal tissues. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.* 1962; 24:291-358.

Dias, J.C.P. & Coura, J.R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas – uma abordagem prática para o clínico geral**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997.

Dias, J.C.P., Schofield, C.J. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1999; 94(1): 103-121

Dias, J.C.P., Silveira, A.C., Schofield, C.J. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97(5): 603-612.

Dias, J.C.P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39(4):370-375.

Dutra, P.M.L., Couto, L.C., Lopes, A.H.C.S., Meyer-Fernandes, J.R. Characterization of ecto-phosphatase activities of *Trypanosoma cruzi*: A comparative study between Colombiana and Y strains. *Acta Tropica*. 2006; 100(1-2): 88-95.

Fernandes N.J, Kidney B.A. Alkaline phosphatase: beyond the liver. *Vet Clin Pathol.* 2007; 36(3): 223-33.

Gil, JH.R., Soler, A., Azzouz, S., Osuna, A. Ion regulation in the different life stages of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* 2003; 90(4): 268-272.

Gomes, S.A.O., Fonseca de Souza, A.L., Silva, B.A., *et al.* *Trypanosoma rangeli*: differential expression of cell surface polypeptides and ecto-phosphatase activity in short and long epimastigote forms. *Experimental Parasitology*. 2006; 112: (253-262).

González, J., Cornejo, A., Santos, M.R.M., *et al.* A novel protein phosphatase 2A (PP2A) is involved in the transformation of human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 2003, 374. 647-656.

Gornall, A.G., Bardawill, C.J. & David, M.M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 1949; 177: 751-766.

Granjeiro, P.A., Ferreira, C.V., Granjeiro, J.M., Taga, E.M. & Aoyama, H. Purification and kinetic properties of a castor bean seed acid phosphatase containing sulfhydryl groups. *Physiologia plantarum*. 1999; 107: 151-158.

Harrison, S., Page., C.P., Spina, D. Airway nerves and protein phosphatases. *Gen. Pharmacol.* 1999; 32(3): 287-298.

Himeno, M., Nakamura, K., Tanaka, Y., Yamada, H., Imoto, T., Kato, K. Mechanism of a conversion from membrane associated lysosomal acid phosphatase to content forms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 180(3): 1483-1489.

Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signalling. *Cell*. 1995; 80: 225-236.

Hunter, T. Tyrosine phosphorylation in cell signaling and disease. *Keio J. Med.* 2002; 51(2): 61-71.

Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsaprailis, G., Gresser, M.J. & Ramachandran, C. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(2): 843-851.

Jia, Z. Protein phosphatases: structures and implications. *Biochem. Cell. Bio.* 1997; 75(1): 17-26.

Lau, K.H.W., Farley, J.R. & Baulink, D.J. Bone acid phosphatase is a neutral pH phosphotyrosyl protein phosphatase. *Adv. Prot. Phosphatases*. 1991; 4: 165-198.

Lee, R.B. Phosphate influx and extracellular phosphatase activity in barley roots and rose cells. *New Phytol.* 1988; 109: 141-148.

Letelier, M.E., Repetto, Y., Aldunate, J., Morello, A. Acid and alkaline phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 1985; 81(1): 47-51.

Letelier, M.E., Alliende, C., Gonzalez, J., Aldunate, J., Repetto, Y., Morello, A. Phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi*. Phosphate removal from ATP, phosphorylated proteins and other phosphate compounds. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 1986; 85(2): 375-380.

Macedo A.M. & Pena, S.D. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol. Today*. 1998; 14(32):119-124.

Manoel-Caetano, F.S., Silva, A.E. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2007; 23(10): 2263-2274.

Maya, J.D.; Repetto, Y.; Agostín, M.; Ojeda, J.M.; Tellez, R.; Gaule, C. e Morello, A. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1997; 86: 101-106.

Mielniczki-Pereira, A.A.; Chiavegatto, C.M.; López, J.A.; Colli, W.; Alves, M.J.M. e Gadelha, F.R. *Trypanosoma cruzi* strains, Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases activities. *Acta tropica.* 2007; 101: 54-60.

Moreno, V.R., Agüero, F. Tekiel, V. & Sanchez, D.O. The calcineurin A homologue from *Trypanosoma cruzi* lacks two important regulatory domains. *Acta Tropica.* 2007; 101(1): 80-89.

Nagakura, K., Tachibana, H. e Kaneda, Y. Alteration of the cell surface acid phosphatase concomitant with the morphological transformation in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1985; 81B(4): 815-817.

Organização Panamericana de Saúde. **Chagas.** Acesso em 13/11/2007. <http://www.opas.br/mostrant.efm?codigodest=312>

Orr, G.A, Werner, C., Xu, J., *et al.* Identification of novel serine-threonine protein phosphatases in *Trypanosoma cruzi*: a potential role in control of cytokinesis and morphology. *Infection and Immunity.* 2000; 68(3): 1350-1358.

Prazeres, J.N., Rocha, A., Ramos-Jr, A.N., Ostermayer, A.L. Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2005; 38(3): 1-30.

Rojas de Arias, A., Ferro, E.A., Ferreira, M.E. & Simancas, L.C. Chagas disease vector control through different intervention modalities in endemic localities of Paraguay. *Bulletin of the World Health Organization.* 1999; 77(4): 331-339.

Rey, L. (1991) In: Parasitologia. 2ª edição: Guanabara Koogan

Robinson, D.B. & Glew, R.H. A tartarate resistant acid phosphatase from Gaucher Spleen. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 1980; 255(5): 840-870.

Senna, R., Simonin, V., Silva-Neto, M.A.C., Fialho, E. Induction of acid phosphatase activity during germination of maize (*Zea mays*) seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2006; 44: 467-473.

Siqueira-Batista, R., Quintas, L.E.M. & Vahia- Loureiro, A.M. **O *Trypanosoma cruzi***. In: Moléstia de Chagas. Ed. Cultura Médica, p. 40-51, 1996.

Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A. & Zingales, B. DNA markers define two major lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1996; 83: 141-152.

Togari, A., Sakai, J. & Matsumoto, S. Highly sensitive assay for alkaline and acid phosphatase activities by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of chromatography*. 1987; 417: 41-46.

Tyler, K.M. & Engman, The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Inter. J. Parasitol.* 2001; 31: 472-481.

World Health Organization. Chagas. Acesso em: 17 de setembro de 2007. http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/swg_chagas.pdf.

Zhang, Z.Y., & Van Etten, R.L. Purification and characterization of a low-molecular-weight acid phosphatase- a phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1990; 282(1): 39-49.

Zingales, B., Souto, R.P., Mangia, R.H., Lisboa, C.V., Campbell, D.A., Coura, J.R.; Jansen, A. & Fernandes, O. Molecular epidemiology of American tripanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Inter. J. Parasitol.* 1998; 28:105-112.

7. Anexo I

7.1 Participação em congressos:

SOUZA, G.G; REGONHA, L.F; DEGASPERI, G.R; **MORALES NETO, R**; GADELHA, F.R. Ibuprofen induces oxidative stress in *Trypanosoma cruzi*. In: XXXIV ANNUAL MEETING ON BASIC RESEARCH IN CHAGAS' DISEASE AND XXIII ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF PROTOZOOLOGY, Caxambu-MG, 2007.

REGONHA, L.F; SOUZA, G.G; DEGASPERI, G.R; **MORALES NETO, R**; GADELHA, F.R. Ibuprofen induces oxidative stress in *Trypanosoma cruzi* cytotoxicity induced by Ibuprofen does not impair mitochondrial function. In: XXXIV ANNUAL MEETING ON BASIC RESEARCH IN CHAGAS' DISEASE AND XXIII ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF PROTOZOOLOGY, Caxambu-MG, 2007.

HULSHOF, Laura; **MORALES NETO, Raphael**; FERREIRA, Carmem Veríssima; GADELHA, Fernanda Ramos. Caracterização da atividade de fosfatases em diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. In: II SAF - SEMANA ACADÊMICA DA FARMÁCIA, FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS (FCM) UNICAMP, Campinas-SP, 2007

MORALES NETO, Raphael; FERREIRA, Carmem Veríssima; GADELHA, Fernanda Ramos. Distinct phosphatase activities in two strains of *Trypanosoma cruzi*. In: XXXVI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR E 10th IUBMB CONFERENCE: "Infectious Diseases: Biochemistry of Parasites, Vectors and Hosts", Salvador-BA, 2007.

MORALES NETO, Raphael; FERREIRA, Carmem Veríssima; GADELHA, Fernanda Ramos. Effect of calcium and inhibitors on phosphatase activity in two strains of *Trypanosoma cruzi*. In: XXXIII REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS E XXXII REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROTOZOOLOGIA, Caxambu-MG, 2006.

SOUZA, Tiago Antonio de; **MORALES NETO, Raphael**; FERREIRA, Carmem Veríssima; GADELHA, Fernanda Ramos. Efeito do peróxido de hidrogênio na bioenergética mitocondrial e na atividade das fosfatases em *Trypanosoma cruzi*. In: XIV CONGRESSO INTERNO DE INICIÇÃO CIENTÍFICA UNICAMP, Campinas-SP, 2006.

MORALES NETO, Raphael; PAVAN, Maria Carolina Figueiredo Pereira; HULSHOF, Laura; REGONHA, Lígia Fernanda; FERREIRA, Carmem Veríssima; GADELHA, Fernanda Ramos. Determination of phosphatase activities in two different strains of *Trypanosoma cruzi*. In: XXXV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, Águas de Lindóia-SP, 2006.

7.2 Manuscrito submetido para publicação:

Morales Neto, R., Husholf, L., Ferreira, C.V. & Gadelha, F.R. Distinct phosphatase activity profiles in two strains of *Trypanosoma cruzi*.