

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA  
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA CELULAR

CLAUDIA FERNANDA DICK

Influência do fosfato inorgânico  
extracelular nas atividades ecto-  
enzimáticas de *Trypanosoma rangeli*

Rio de Janeiro

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Claudia Fernanda Dick

Influência do fosfato inorgânico extracelular nas atividades ecto-  
enzimáticas de *Trypanosoma rangeli*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Química Biológica), Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Química Biológica).

Orientador: Prof. José Roberto Meyer Fernandes

Rio de Janeiro

2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

Dick, Claudia Fernanda 2009 -

- **Influência do fosfato inorgânico extracelular nas atividades ectoenzimáticas de *Trypanosoma rangeli***

Rio de Janeiro, UFRJ – Instituto de Bioquímica Médica, 2008.

xii, 102f.

Dissertação de Mestrado: Mestrado em Ciências (Química Biológica)

1. *Trypanosoma rangeli*. 2. Ecto-fosfatases. 3. Ecto-ATPases. 4. Ecto-3'-nucleotidasas. 5. Depleção de fosfato inorgânico 6. Proliferação celular. I. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química Biológica. II. Título.

*"Para bem conhecer uma coisa é preciso tudo ver,  
tudo aprofundar, comparar todas as opiniões,  
ouvir os prós e os contras."*

*Allan Kardec*

*Este trabalho é dedicado ao meu avô  
Adalberto. Nada disso seria possível  
sem sua presença em minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de todos, e a todos os seus intercessores. Obrigado por permitir que eu chegasse até aqui.

Ao grande homem e cientista que fez com que, desde muito cedo, eu me encantasse pelo fantástico mundo dos laboratórios. Muito obrigado ao meu avô Adalberto.

A minha mãe Rosângela, por sempre querer me defender e me proteger, mesmo quando eu dizia que tudo fazia parte do processo. Obrigado pelo carinho e dedicação. Obrigada ao meu irmão Paulo, pelos momentos divertidos e agradáveis, que fizeram com que eu pudesse recarregar minhas baterias.

Ao meu noivo André, que não tenho palavras para expressar o quanto sou agradecida pelo apoio e dedicação. Apenas meu muito obrigado mesmo!

Ao meu orientador José Roberto pelos ensinamentos preciosos (tais como a fábula do ovo e da galinha), e por garantir meu amadurecimento profissional e pessoal. Ainda tenho muito que aprender com você!

Aos amigos do laboratório de Bioquímica Celular, Naira, Elmo, Dani, Tina, Thaís, Rafael, Anita (companheira de MSN), Larisse e Anderson “Xapa”, por propiciar um excelente ambiente de trabalho, cada um a sua maneira, obviamente. A ex-colega de laboratório, Maria Ester, por ainda torcer e se preocupar, mesmo (bem) distante.

Ao meu amigo e ex-orientador (será?), André Fonseca, por seu apoio, carinho e dedicação, mesmo quando brigado. Obrigado por ser brasileiro e não desistir nunca.

A minha aluna de iniciação científica Juliana Ferreira, por propiciar meu crescimento profissional, pessoal e também por se preocupar sempre com minha alimentação!!

As amigas Ana Lúcia e Meirylane, pela amizade, carinho e preocupação. Adoro vocês! Gostaria de agradecer novamente a amiga Naira e a toda a sua família de Minas. Obrigada por nos adotarem como membros!

Aos professores Marcelo Einicker Lamas, Suzete Gomes, Narcisa Cunha e Silva e sua aluna de doutorado Miria Gomes, por suas excelentes colaborações realizadas e pela expansão de meus conhecimentos científicos.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Celular do Instituto de Bioquímica Médica, sob a orientação do Prof. José Roberto Meyer Fernandes, com o auxílio financeiro das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)

## RESUMO

Dick, Claudia Fernanda. Influência do fosfato inorgânico extracelular nas atividades ectoenzimáticas de *Trypanosoma rangeli*. Dissertação de Tese (Mestrado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Neste estudo, mostramos o efeito da depleção do fosfato inorgânico em *T. rangeli*. Células mantidas em meio com baixo Pi apresentaram aumento de suas atividades ectoenzimáticas envolvidas com a produção e a liberação de Pi. Assim, as atividades ecto-ATPásica (medida pela liberação do  $^{32}\text{Pi}$  a partir do  $[\gamma\text{-}^{32}\text{Pi}]\text{ATP}$ ), ecto-3'-nucleotidásica (medida pela liberação de Pi a partir do substrato 3'-AMP) e ecto-fosfatásica (medida pela hidrólise do substrato artificial para fosfatases, o  $p$ -nitrofenilfosfato) mostraram-se, respectivamente, três, duas ou cinco vezes maiores nas células crescidas em meio com baixo Pi, quando comparadas com as das células mantidas em meio com alto Pi. Como a atividade ecto-fosfatásica foi a que mais variou frente à depleção de Pi exógeno, identificamos as diferenças entre as atividades ecto-fosfatásicas das células mantidas em meio com alto ou baixo Pi. Epimastigotas mantidos no meio com baixo Pi apresentou uma redução na proliferação. As células mantidas no meio com alto Pi mostraram atividade ecto-fosfatásica de  $5,90 \text{ nmoles } p\text{-NP} \times \text{h}^{-1} \times 10^{-7} \text{ células}$ , enquanto as células mantidas no meio com baixo Pi apresentaram um aumento de cinco vezes ( $24,08 \text{ nmoles } p\text{-NP} \times \text{h}^{-1} \times 10^{-7} \text{ células}$ ) na atividade ecto-fosfatásica. Ainda, as células crescidas em meio com alto Pi apresentam uma clássica cinética de Michaelis-Menten, enquanto as células crescidas em meio com baixo Pi apresentaram uma curva cinética com dois sítios catalíticos, mostrando dois valores de  $V_{\text{máx}}$  e  $K_{\text{m}}$  para o  $p$ -NPP, um deles com alta afinidade pelo  $p$ -NPP e baixa capacidade, e o outro com baixa afinidade pelo substrato e alta capacidade. e tendo o primeiro sítio com altíssima afinidade pelo substrato. A atividade ecto-fosfatásica das células crescidas em meio com baixo Pi apresentaram atividade máxima a pH 6,0, enquanto no meio com alto Pi não há efeito do pH. A atividade ecto-fosfatásica das células crescidas no meio com alto Pi reconheceu, além do  $p$ -NPP, também  $o$ -fosfoaminoácidos (P-tirosina, P-serina e P-treonina). Todavia, no meio com baixo Pi, há uma hidrólise preferencial de fosfoserina e fosfotreonina, levando nos a supor que, com a depleção de Pi, existam na membrana de *T. rangeli*, pelo menos, duas enzimas com atividade fosfatásica



## ABSTRACT

In this study, we showed the effect of inorganic phosphate starvation on *T. rangeli*. Cells maintained at low-Pi medium presented a modulation of its ecto-enzyme activities involved on the Pi production and release. Then, ecto-ATPase (measured by  $^{32}\text{Pi}$  release from  $[\gamma\text{-}^{32}\text{Pi}]\text{ATP}$ ), ecto-3'-nucleotidase (measured by Pi production from 3'-AMP) and ecto-phosphatase (measured by hydrolysis of artificial substrate for phosphatases, *p*-nitrophenylphosphate) activities showed, respectively, three-, two- or five-fold higher in cells maintained at low-Pi medium than the cells of the high-Pi medium. Because the ecto-phosphatase activity the most sensitive to the exogenous Pi starvation, we choose this activity for the study of Pi starvation effects, evaluating the differences between ecto-phosphatase activities of the cells maintained at low-Pi or high-Pi media. Epimastigotes maintained at low-Pi medium presented inefficient cell proliferation. Cells maintained at the high-Pi medium presented ecto-phosphatase activity of  $5.90 \text{ nmols } p\text{-NP} \times \text{h}^{-1} \times 10^{-7} \text{ cells}$  while cells maintained at low-Pi medium showed an increase of five-fold ( $24.08 \text{ nmols } p\text{-NP} \times \text{h}^{-1} \times 10^{-7} \text{ cells}$ ) on the ecto-phosphatase activity. In addition, ecto-phosphatase activity from cells maintained at high-Pi medium exhibited a classical Michaelian-Menten kinetics curve, while ecto-phosphatase activity from cells maintained at low-Pi medium exhibited a curve with two catalytic sites, showing two values of  $V_{\text{máx}}$  and  $K_{\text{m}}$ , one of them presenting high substrate affinity and low capacity and other one with low substrate affinity and high capacity parameters. We observed that cells maintained at low-Pi medium presented higher ecto-phosphatase activity at pH 6,0. On the other hand, at high-Pi medium, no effects of pH were detected. The ecto-phosphatase activity of cells maintained at high-Pi medium recognized, besides *p*-NPP, *o*-phosphoaminoacids (P-tyrosine, P-serine and P-threonine) as substrates. However, the ecto-phosphatase activity from cells maintained at low-Pi medium presented a preference for P-serine and P-threonine, suggesting to us that, on Pi starvation, there are two enzymes with phosphatase activity on *T. rangeli* plasma membrane external surface.

## LISTA DE ABREVIações

APases – fosfatases ácidas

ALPases – fosfatases alcalinas

ATP – adenosina trifosfatada

CDK – proteína cinase dependente de ciclina

GPI – glicose fosfato isomerase

HEPES – ácido 4,2-hidroxietil-piperazina-1-etanosulfônico

$K_m$  – constante de Michaelis-Menten para uma reação enzimática, isto é, a concentração de substrato que leva a 50% da velocidade máxima de uma enzima.

nm – nanômetros

Pi – fosfato inorgânico

$\rho$ -NP –  $\rho$ -nitrofenol

$\rho$ -NPP –  $\rho$ -nitrofenilfosfato

poliP – polifosfato

P-ser – *o*-fosfoserina

PSP ou PP – proteínas serina/treonina fosfatases

P-tir – *o*-fosfotirosina

PTP – proteínas tirosina fosfatases

P-tre – *o*-fosfotreonina

TRIS – tris-(hidroximetil)aminometano

$V_{max}$  – velocidade máxima de uma reação enzimática

# ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA .....	III
RESUMO .....	VII
ABSTRACT .....	VIII
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Trypanosoma rangeli.....	1
a) O parasito <i>Trypanosoma rangeli</i> .....	1
b) Posição Taxonômica .....	2
c) Os vetores naturais .....	3
d) Ciclo de vida nos insetos triatomíneos .....	4
1.2. Trypanosoma rangeli x Trypanosoma cruzi.....	7
1.3. Fosfatases.....	9
a) Proteínas Fosfoserina/Fosfotreonina Fosfatases (PPs) .....	11
b) Proteínas Fosfotirosina Fosfatases (PTPs) .....	15
c) Proteínas Fosfohistidina Fosfatases (PHPs) .....	19
d) As Fosfatases Alcalinas .....	20
e) As fosfatases ácidas .....	21
1.4. Ecto-Fosfatases .....	22
1.5. Fosfato Inorgânico Exógeno.....	25
a) Sistema <i>PHO</i> .....	26
b) Via regulatória do sistema <i>PHO</i> .....	29
c) Membrana Plasmática: Adaptação dos componentes da superfície celular à depleção de Pi.....	31
2. OBJETIVOS .....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. Microrganismos e condições de cultivo .....	35
3.2. Obtenção da massa celular .....	35
3.3. Teste da viabilidade celular .....	35
3.4. Avaliação da proliferação celular de T. rangeli submetidos à depleção de Fosfato Inorgânico .....	36
3.5. Determinação da Atividade Ecto-ATPásica de Trypanosoma rangeli .....	37
3.6. Determinação da atividade ecto-fosfatásica em Trypanosoma rangeli .....	38
a) Dosagem de <i>p</i> -nitrofenol ( <i>p</i> -NP) – (Método 1, FERNANDES <i>et al.</i> , 1997) .....	38

b) Dosagem de Fosfato Inorgânico (Pi) (Método 2, FISKE & SUBBAROW, 1925).....	38
3.7. Teste para fosfohidrolases secretadas.....	40
3.8. Modulação das Atividades ecto-fosfatásicas de <i>T. rangeli</i> pelo conteúdo de fosfato inorgânico do meio de cultura.....	40
3.9. Caracterização Bioquímica .....	40
a) Efeito do pH nas atividades ecto-fosfatásicas .....	41
b) Efeito de diferentes cátions nas atividades ecto-fosfatásicas .....	41
c) Influência da concentração de <i>p</i> -NPP nas atividades ecto-fosfatásicas: determinação dos parâmetros cinéticos ( $K_m$ e $V_{max}$ ).....	41
d) Efeito de diferentes inibidores e substratos fosforilados nas atividades ecto-fosfatásicas.....	42
e) Atividades ecto-fosfatásicas frente a diferentes substratos fosforilados .....	42
3.10. Composição Fosfolipídica .....	42
3.11. Microscopia ótica de contraste diferencial interferência.....	43
3.12. Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET.....	44
3.13. Consumo de oxigênio.....	44
3.14. Análise estatística .....	45
4. RESULTADOS .....	46
4.1. Modulação de atividades ecto-enzimáticas de <i>T. rangeli</i> pelo Fosfato Inorgânico Exógeno .....	46
4.2. Comparação da atividade ecto-fosfatásica de <i>T. rangeli</i> nos meios padrão e com baixo Pi. ....	47
4.3. A depleção de Pi do meio de cultura inibe a proliferação celular .....	55
5. DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa das Américas Central e do Sul mostrando sobreposição da distribuição geográfica de <i>Trypanosoma rangeli</i> e <i>T. cruzi</i> (sombreado cinza) e ocorrência de <i>T. rangeli</i> em humanos, triatomíneos e animais selvagens.....	2
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. rangeli</i> . .....	7
Figura 3: Enzimas que controlam a fosforilação de proteínas na célula. ....	10

Figura 4: Representação do sítio ativo de uma PP.....	14
Figura 5: Hidrólise de ésteres de fosfato por Serina/Treonina fosfatases.....	15
Figura 6: Representação esquemática de uma fosfotirosina fosfatase 1B.....	17
Figura 7: Ilustração dos passos de defosforilação catalisada por PP de um substrato fosforilado em resíduo de tirosina.....	18
Figura 8: Mecanismo de catálise de PTPases: complexo enzima-substrato e intermediário enzimático fosforilado.....	19
Figura 9. Mecanismo molecular de transdução do sinal de fosfato inorgânico extracelular para os genes estruturais PHO no núcleo.....	30
Figura 10. Hidrólise do substrato artificial <i>p</i> -NPP.....	39
Figura 11. O conteúdo de Pi do meio de cultura pode modular a atividade de ecto-enzimas de <i>T. rangeli</i> .....	47
Figura 12. Efeitos de diferentes faixas de pH na atividade Ecto-Fosfatásica de <i>T. rangeli</i> .....	48
Figura 13. Efeito dos íons metálicos na atividade ecto-fosfatásica de <i>T. rangeli</i> .....	49
Figura 14. Dependência da concentração de <i>p</i> -NPP para a atividade Ecto-Fosfatásica de <i>T. rangeli</i> mantidos em meio padrão.....	50
Figura 15. Dependência da concentração de <i>p</i> -NPP para a atividade Ecto-Fosfatásica de <i>T. rangeli</i> mantidos em meio com baixo Pi.....	51
Figura 16. Hidrólise de Fosfoaminoácidos pela Ecto-fosfatase de <i>T. rangeli</i> .....	53
Figura 17. Atividades Ecto-Fosfatásicas de <i>T. rangeli</i> medidas ao longo do crescimento do parasito em meio padrão.....	54
Figura 18. Atividades Ecto-Fosfatásicas de <i>T. rangeli</i> medidas ao longo do crescimento do parasito em meio com baixo Pi.....	54
Figura 20. Microscopia ótica de contraste diferencial interferencial de epimastigotas de <i>T. rangeli</i> .....	57
Figura 20. Microscopia ótica de contraste diferencial interferencial de epimastigotas de <i>T. rangeli</i> .....	57
Figura 21. Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de <i>Trypanosoma rangeli</i> cultivados em meio LIT padrão.....	59
Figura 22. Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de <i>Trypanosoma rangeli</i> cultivados em meio LIT com baixo Pi.....	61
Figura 23: Taxas de consumo de oxigênio de <i>T. rangeli</i> mantidos em meios padrão (barras azuis) ou baixo Pi (barras vermelhas).....	63
Figura 24: Composição fosfolipídica total de <i>T. rangeli</i> mantidos em meios padrão (lane 1) ou baixo Pi (lane 2).....	64

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição do meio LIT padrão e meio com baixo Pi.....	37
Tabela 2. Efeito de inibidores de fosfatases na atividade ecto-fosfatásica de <i>T. rangeli</i> .....	52

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Trypanosoma rangeli

a) O parasito *Trypanosoma rangeli*

O *Trypanosoma rangeli* foi inicialmente descrito em 1920 na Venezuela por Tejera. Posteriormente, foi encontrado na Colômbia, Guatemala, Guiana Francesa, Chile, Argentina e Brasil (LUCENA e MARQUES, 1954). Este tripanossomatídeo, em contraste com o *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, em geral não é considerado patogênico para hospedeiros vertebrados e pode ser distinguido pelo seu desenvolvimento no inseto vetor. Contudo, o *T. rangeli* tem sido identificado em hospedeiros invertebrados, especificamente os triatomíneos vetores, em vertebrados não-humanos em várias partes do Brasil (DEANE, 1958a, b; DEANE *et al*, 1972; CUBA, 1975; BARRET *et al*, 1977; D’ALESSANDRO *et al*, 1986; STEINDEL *et al*, 1991; DIOTAIUTI *et al*, 1992; COURA *et al*, 1996; CUBA-CUBA, 1998; EICHLER e SCHAUB, 2002) e também em humanos (CUBA-CUBA, 1998; GUHL e VALLEJO, 2003).

Este parasito apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo amplamente disseminado nas Américas Central e do Sul, apresentando assim uma sobreposição com *T. cruzi*, permitindo a ocorrência de infecções simples ou mistas em hospedeiros vertebrados e invertebrados numa mesma região geográfica (D’ALESSANDRO e SARAVIA, 1992; CUBA-CUBA, 1998; GRISARD *et al*, 1999b; GUHL e VLLEJO, 2003).



Figura 1. Mapa das Américas Central e do Sul mostrando sobreposição da distribuição geográfica de *Trypanosoma rangeli* e *T. cruzi* (sombreado cinza) e ocorrência de *T. rangeli* em humanos, triatomíneos e animais selvagens. Não estão incluídos os tripanossomas chamados *T. rangeli*-“like” (tipo rangeli). (Adaptado de GRISARD *et al.*, 1999a).

## b) Posição Taxonômica

Os tripanossomatídeos são parasitos conceituados como digenéticos, uma vez que se desenvolvem nos insetos triatomíneos e infectam hospedeiros vertebrados (HOARE, 1972).

O *T. rangeli* está posicionado taxonomicamente na ordem *Kinetoplastida*, possuindo um a dois flagelos e um cinetoplasto que se localiza na base do flagelo, onde se encontra uma massa de DNA disposta em forma de rede de dois tamanhos: maxicírculos e minicírculos (DE OLIVEIRA e DE SOUZA, 2001). O *T. rangeli* está posicionado na família *Trypanosomatidae*, caracterizada pela presença de flagelo livre da superfície do corpo, e é considerado fagotrópico por ingerir o alimento através de um citóstoma, que se abre perto da bolsa flagelar. Está posicionado no subgênero *Herpetosoma* (LYNN e SMALL, 1988), em que se encontram parasitos de tamanhos médios, que possuem cinetoplasto em forma de bastão e subterminal, extremidade posterior pontuda e núcleo

discretamente posicionado na porção anterior do corpo, diferindo do *T. cruzi*, uma vez que este está posicionado no subgênero Schyzotrypanum. Atualmente, a posição taxonômica do *T. rangeli* tem sido de ampla discussão, se pertencente à seção *Salivaria* e/ou *Stercoraria*, sendo assunto ainda controvertido (HOARE, 1972; AÑEZ, 1983; STEVENS e GIBSON, 1999; GRISARD, 2002), uma vez que a seção *Stercoraria* está relacionada com tripanossomatídeos que se desenvolvem exclusivamente no aparelho digestivo do inseto vetor e são transmitidos pelas fezes, enquanto a seção *Salivaria* está relacionada com os tripanossomatídeos cujas formas metacíclicas são inoculadas pela saliva do inseto vetor, sendo assim de difícil distinção, uma vez que durante seu desenvolvimento no inseto triatomíneo, *T. rangeli* apresenta ambos ciclos de vida (MAIA DA SILVA *et al.*, 2004).

#### c) Os vetores naturais

O *Trypanosoma rangeli* é considerado uma espécie de tripanossomatídeo não patogênico para o homem. Entretanto, aspectos fundamentais de sua reprodução no hospedeiro vertebrado, que poderiam explicar essa aparente falta de virulência, não estão totalmente elucidados (CUBA CUBA, 1998; GUHL e VALLEJO, 2003; MAIA DA SILVA *et al.*, 2004).

Quanto aos seus hospedeiros invertebrados, DE LEON (1949) realizou uma infecção de *T. rangeli* através do xenodiagnóstico usando *Triatoma dimidiata*, *T. philossoma* e *T. nitida*, mas constatou infecção natural somente em *Rhodnius prolixus*. PESSÔA & FREITAS (1952) condicionaram a presença de *T. rangeli* à existência de *R. prolixus* pelo fato deste hemíptero ser o vetor na Venezuela. Por outro lado, COUTINHO e NUSSENZWEIG (1952) infectaram experimentalmente, por técnica de xenodiagnóstico, *T. infestans*, *T. viticeps*, *Panstrongylus megistus* e *R. prolixus* usando uma cepa de *T. rangeli*



isolada da Venezuela e concluíram que, mesmo na ausência de *R. prolixus*, caracterizado como vetor natural, qualquer triatomíneo poderia se tornar vetor potencial deste parasito. Entretanto, sabe-se hoje que, em condições naturais, *Dipetalogaster maximus* não tem habilidade para ser vetor de *T. rangeli*. Esta espécie de triatomíneo tem habilidade de eliminar infecções hemolinfáticas, matando o parasito (MACHADO *et al.*, 2000).

A princípio, acreditava-se que o ciclo de *T. rangeli* estava confinado ao tubo digestivo, como no caso de *T. cruzi*. PIFANO e MAYER (1949) foram os primeiros a sugerir a transmissão através da picada do inseto quando observaram tripanossomas na probóscide de *R. prolixus*. O ciclo no inseto foi finalmente esclarecido quando GROOT (1954), observando flagelados em *R. prolixus* infectados com *T. rangeli*, relatou que os parasitos encontrados na glândula salivar passavam pela hemolinfa.

#### d) Ciclo de vida nos insetos triatomíneos

Durante o ciclo de vida no inseto vetor, *T. rangeli* interage com diversos compartimentos, nos quais existem microhabitats distintos. Este parasito, para sobreviver nesses ambientes, é capaz de diferenciar-se e sofrer mudanças morfogênicas (CUBA CUBA, 1998).

Vetores triatomíneos tornam-se infectados ao ingerir formas tripomastigotas sanguíneas de *T. rangeli*, provenientes de animais infectados. Uma vez no vetor, o parasito se multiplica no intestino, penetra na hemocele e migra até as glândulas salivares, onde se diferencia em tripomastigotas metacíclicos, que são injetados com a saliva através da picada no hospedeiro vertebrado (HOARE, 1972; D'ALESSANDRO, 1976; D'ALESSANDRO e SARAVIA, 1992; GUHL e VALLEJO, 2003). Acredita-se que a adesão do *T. rangeli* ao epitélio do tubo digestivo seja uma das etapas necessárias ao

mecanismo de invasão para atingir a cavidade geral do inseto (D’ALESSANDRO e SARAVIA, 1992). DE OLIVEIRA e DE SOUZA (2001) observaram que *T. rangeli* adere-se à membrana perimicrovilar para posteriormente penetrar em células epiteliais do intestino médio com morfologia alterada e, assim, invadir a hemocele.

Sabe-se que *T. rangeli* é patogênico para o vetor *R. prolixus*, além do que, após a invasão da hemocele, ele pode se desenvolver intracelularmente em todos os órgãos do inseto (WATKINS, 1971; SCHAUB, 1992). O tempo que *T. rangeli* leva para invadir a hemocele é controverso. Muitos autores afirmam que tal invasão ocorre algumas semanas depois do repasto sanguíneo, quando o intestino apresenta um grande número de flagelados (GROOT, 1954; GREWAL, 1956; D’ALESSANDRO, 1963; STEINDEL *et al.*, 1991). A literatura também registra variação da percentagem de *R. prolixus* que sofre invasão da hemocele e glândula salivar pelo parasito quando essa espécie de inseto é exposta a diferentes cepas de *T. rangeli* por diferentes técnicas de infecção (GROOT, 1954; GREWAL, 1957; D’ALESSANDRO, 1963; TOBIE, 1964; GOMEZ, 1967; MACHADO *et al.*, 2001).

Durante a fase extracelular, epimastigotas, juntamente com tripomastigotas recém-formados, invadem hemócitos, onde sofrem progressivas divisões nas formas esferomastigotas ou arredondadas. Grande número de parasitos foram observados após a ruptura de hemócitos sendo a maioria deles encontrados como tripomastigotas metacíclicos ou formas arredondadas (CUBA, 1975; AÑEZ, 1983; CUBA-CUBA, 1998; D’ALESSANDRO e SARAVIA, 1999; GRISARD *et al.*, 1999a). Segundo AÑEZ (1983), a principal forma de divisão do parasito no ciclo extracelular é a epimastigota, e no intracelular a esferomastigota ou forma arredondada.

Estudando o desenvolvimento de *T. rangeli* na glândula salivar de *R. prolixus*, CUBA (1975) e ELLIS *et al.* (1980) observaram epimastigotas curtos interiorizados nas células das paredes das glândulas salivares, sendo posteriormente visualizados neste mesmo tecido epimastigotas longos em divisão ativa. HECKER *et al.* (1990) observaram que, na glândula salivar, os parasitos penetravam pela lâmina basal e, por uma rota intracelular, ficavam contidos em vacúolos, podendo migrar para o lúmen da glândula onde se dividiam e passavam a formas metacíclicas. Em 2002, BASSERI *et al.* demonstraram que a invasão da glândula salivar de *R. prolixus* por *T. rangeli* é um processo mediado pelo reconhecimento de açúcares específicos, tais como N-acetil-galactosamina, N-acetil-glicosamina e galactose e por lectinas expressas na superfície de formas epimastigotas longas do parasito, formas estas capazes de aderir e invadir as glândulas salivares do inseto. Além disso, uma vez no interior das glândulas salivares, os parasitos são capazes de causar algumas mudanças importantes na composição bioquímica da saliva do inseto, como foi demonstrado por GARCIA *et al.*, em 1994. No artigo, os autores mostraram que o conteúdo de proteína total, a atividade apirásica, a quantidade de intermediários reativos de nitrogênio, e de componentes da atividade anti-hemostática da saliva de *R. prolixus*, diminuía significativamente em insetos infectados com *T. rangeli*.

MACHADO *et al.* (2001), utilizando um método de infecção artificial por inoculação diretamente na hemocele em triatomíneos, demonstraram diferenças na susceptibilidade de quatro espécies do gênero *Rhodnius* para diferentes cepas de *T. rangeli*, e sugeriram que a habilidade deste flagelado para invadir a glândula salivar e completar a metaciclo-gênese é dependente da cepa do parasito e da espécie do triatomíneo vetor.

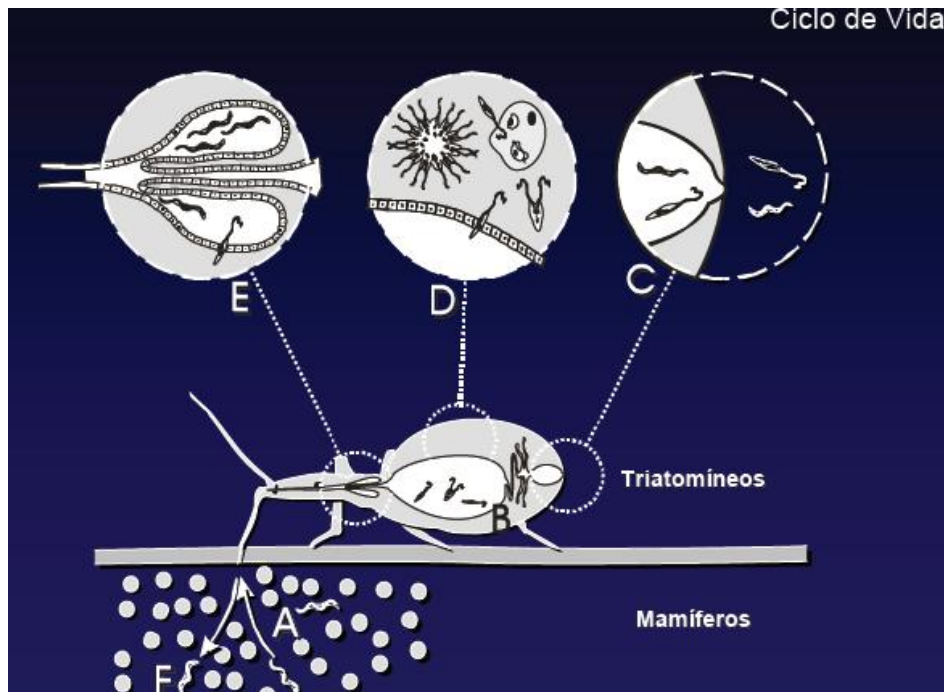


Figura 2. Ciclo de vida de *T. rangeli*. Desenho esquemático do ciclo biológico de *T. rangeli* nos seus hospedeiros vertebrados e no inseto triatomíneo vetor. Estão representadas as formas evolutivas mais freqüentemente observadas do flagelado. (A): ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. rangeli* durante o repasto sanguíneo do inseto *R. prolixus*; (B): uma vez no intestino médio do inseto, os parasitos se diferenciam para formas epimastigotas curtas; (C) uma percentagem bem baixa de parasitos são eliminados pelas fezes do barbeiro, ao contrário de *T. cruzi*; (D): os parasitos atravessam a barreira do epitélio intestinal e alcançam a hemolinfa, onde se diferenciam para formas epimastigotas longas. Segundo alguns autores, essas formas podem invadir hemócitos circulantes e se diferenciar para formas amastigotas intracelularmente; (E): as formas epimastigotas longas do parasito aderem à superfície da glândula salivar do inseto e a invadem, para realizar a metaciclogênese, onde são produzidas novamente as formas tripomastigotas metacíclicas, (F) que serão infectivas ao hospedeiro vertebrado num próximo repasto sanguíneo pelo inseto (Adaptado de CUBA-CUBA, 1998).

## 1.2. *Trypanosoma rangeli* x *Trypanosoma cruzi*

Durante muitos anos se utilizou os termos *T. rangeli*-“like”, ou tripanossomas semelhantes ao *T. rangeli*, ou também tipo-*rangeli*, quando eram descritos em estudos basicamente morfológicos, flagelados nos diversos hospedeiros vertebrados e em triatomíneos infectados naturalmente. D’ALESSANDRO (1976) definiu claramente que, para um tripanossoma ser denominado como *T. rangeli*, ele deve evoluir na hemolinfa do

triatomíneo, invadir suas glândulas salivares e ser transmitido pela picada no vertebrado susceptível. Todos estes são parâmetros biológicos considerados indispensáveis na identificação e na caracterização do parasito. Recentemente, e com o objetivo principal de discriminar o *T. rangeli* do *T. cruzi*, tanto no inseto vetor como nas formas de cultivo *in vitro*, têm sido efetuados estudos utilizando-se outros parâmetros bioquímicos e moleculares. As diversas metodologias incluem a lise mediada pelo complemento e as investigações empregando marcadores isoenzimáticos, que demonstram que as cepas de *T. rangeli* e *T. cruzi* procedentes de diversas fontes e origens geográficas podem ser facilmente diferenciadas através de seus padrões isoenzimáticos característicos. Esse e outros estudos mostraram um polimorfismo menos acentuado nos perfis eletroforéticos de enzimas, por parte das cepas de *T. rangeli*, em comparação com *T. cruzi*.

Importante campo de estudo tem sido também o uso de lectinas como marcadores da composição dos resíduos de açúcares da superfície de *T. rangeli*. Observações com ConA (Concanavalina A) e aglutinina de amendoim (*Pisum sativum*) feitas com formas provenientes de cultivo, da hemolinfa, e também dos tecidos dos insetos infectados, sugerem que as variações desses açúcares na superfície do tripanossoma permitiriam explicar por que algumas cepas de *T. rangeli* se adaptam a algumas espécies de triatomíneos e são mais propícias para evoluir nos insetos do que outras. Significativo aporte tem surgido ultimamente do arsenal de ferramentas de biologia molecular. TANAKA *et al.* (1994) e HENRIKSON *et al.* (1996), em seus estudos de cariotipagem molecular de *T. rangeli*, usando o sistema de “Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)” e hibridização com diversas sondas moleculares, foram capazes de identificar bandas cromossômicas específicas de *T. rangeli*, que permitiriam clara distinção com as de *T. cruzi*.

A atividade da enzima sialidase, com expressão exclusiva em *T. rangeli*, foi demonstrada por MEDINA-ACOSTA *et al.* (1994) e para os autores, este fator constitui um marcador potencial específico do parasito.

### 1.3. Fosfatases

Todas as células necessitam monitorar seus ambientes internos para responder à estímulos indutores de proliferação, diferenciação e morte celular (DICKMAN & YARDEN, 1999). Principalmente os parasitos intracelulares, tais como espécies de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos, que durante seu ciclo de vida precisam perceber o meio em que se encontram para que possam se adaptar e sobreviver. Uma das formas mais comuns de controle exercido por parasitos intracelulares é a alteração de vias de transdução de sinal do hospedeiro, subvertendo-as e assim se estabelecendo no interior da célula hospedeira (DOCAMPO & MORENO, 1996). Presume-se tratar-se de uma boa adaptação, pois dentro do rico ambiente intracelular, o parasito está protegido do sistema imune do hospedeiro (BLISKA *et al.*, 1993). Entretanto, nem todos os parasitos se estabelecem em um ambiente intracelular, e para estes a membrana plasmática é um elemento diretamente envolvido na troca de informações com o meio, incluindo transporte de nutrientes, íons, e ainda a proteção do parasito contra a resposta imune do hospedeiro (ZILBERSTEIN e SHAPIRA, 1994; MEYER-FERNANDES *et al.*, 1997).

Em células eucarióticas, a fosforilação reversível de proteínas tem se mostrado principal mecanismo de controle da maioria dos eventos celulares, tais como processos metabólicos, expressão gênica, controle do ciclo celular, mecanismos secretórios e de transporte, organização do citoesqueleto, adesão celular e apoptose (HUNTER, 1995; WERA e HEMMINGS, 1995; BARFORD *et al.*, 1998; McCLUSKEY & SAKOFF, 2001).

O estado de fosforilação de uma proteína estrutural e/ou regulatória é um processo dinâmico e envolve duas classes de enzimas: as proteínas quinases, as quais catalisam a adição covalente de grupos fosfato a resíduos de aminoácidos, e as proteínas fosfatases, que efetuam a ação reversa (Figura 3; HANKS *et al.*, 1988; BARFORD *et al.*, 1998). Nestas proteínas, os eventos de fosforilação e defosforilação em resíduos de serina, treonina e tirosina provocam mudanças conformacionais que levam a variações nas suas propriedades biológicas (GONZÁLES, 2000).

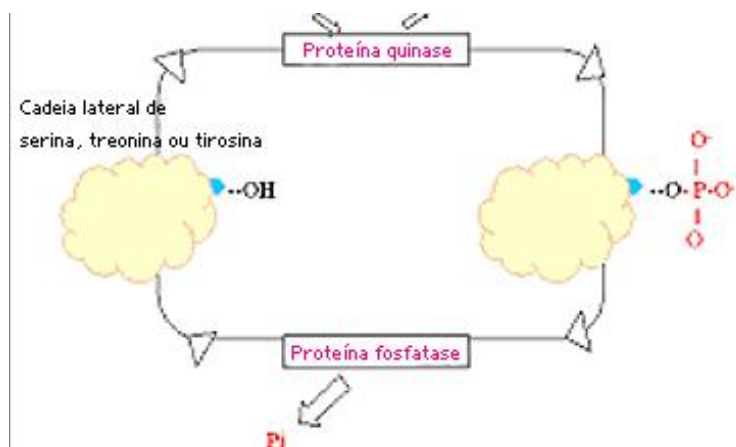


Figura 3: Enzimas que controlam a fosforilação de proteínas na célula. (Figura adaptada de HANKS *et al.*, 1988).

A fosforilação protéica permite a regulação de atividades enzimáticas ou através de mudanças conformacionais alostéricas ou impedindo o acesso ao sítio catalítico da enzima (JOHNSON & BARFORD, 1993). Desta forma, a adição ou remoção de um grupo fosfato pode alterar profundamente a atividade ou propriedade de uma proteína.

As proteínas fosfatases, que constituem uma classe de enzimas estrutural e funcionalmente diversa, fazem parte integral do sistema regulatório de fosforilação e hidrolisam uma ampla variedade de ésteres orgânicos, incluindo proteínas, com liberação

de fosfato inorgânico (FISCHER *et al.*, 1991). Elas podem ser classificadas em dois principais grupos, de acordo com o fosfoaminoácido hidrolisado. São elas: as fosfoserina/treonina proteínas fosfatases (PPs), que defosforilam resíduos de fosfoserina/treonina, e as fosfotirosina fosfatases (PTPs), que hidrolisam fosfotirosina (HUNTER, 1995). Existem ainda as fosfatases de especificidade dupla, que são enzimas capazes de defosforilar fosfoserina/treonina e tirosina. Estas enzimas, por possuírem um mecanismo de ação e sítio ativo homólogo às PTPs (DENU *et al.*, 1996b; DUCRUET *et al.*, 2005), são classificadas como uma sub-família das PTPs. A especificidade de substratos das PPs e PTPs se dá devido a diferenças em suas estruturas tridimensionais e nos distintos mecanismos catalíticos (HUNTER, 1995; DENU *et al.*, 1996b). As fosfatases podem ser classificadas, ainda, de acordo com o seu pH ótimo de atividade. São classificadas, então, como fosfatases ácidas, englobando as fosfotirosina fosfatases, as fosfoserina/treonina fosfatases e as fosfatases duplo-específicas (EC 3.1.3.2), que apresentam pH ótimo de atividade abaixo de 6,0, ou alcalinas (EC 3.1.3.1), na qual o pH ótimo para catálise é acima de 8,0 (GUIMARÃES *et al.*, 2001). As fosfatases ácidas foram descritas como marcadores de lisossomos em mamíferos, ou como constituintes da superfície celular de diferentes tipos celulares (HUNTER, 1995). Porém, alguns microorganismos, como *Mycobacterium bovis*, podem apresentar simultaneamente uma atividade ácida e alcalina em sua superfície, classificada como uma fosfomonoesterase não-específica (BRAIBANT & CONTENT, 2001).

#### a) Proteínas Fosfoserina/Fosfotreonina Fosfatases (PPs)

As PPs são uma família de metaloproteínas de funções extremamente diversas, e estão envolvidas na regulação da expressão de genes, diferenciação celular, modulação do



metabolismo do glicogênio, e ciclo celular (SHENOLIKAR, 1994). A hidrólise diferencial de substratos, aliada à sensibilidade diferencial a inibidores e ativadores, possibilitou o agrupamento das PPs em quatro tipos principais: tipos 1, 2A, 2B e 2C (PP1, PP2A, PP2B, PP2C, respectivamente) (COHEN, 1989). Múltiplas isoformas de cada tipo também foram descritas (McCLUSKEY & SAKOFF, 2001). A comparação das seqüências de aminoácidos de seus domínios catalíticos tem demonstrado que PP1, PP2A e PP2B (calcineurina) são membros de uma mesma família gênica conhecida como PPP (DENU, 1996a). Outras fosfatases foram identificadas através de clonagem e foram denominadas PP4, PP5 e PP6 (COHEN, 1997). No entanto, as enzimas do tipo 2C não apresentam homologia com a família PPP e representam uma nova família gênica conhecida como PPM (VILLAFRANCA *et al.*, 1996; COHEN, 1997). Um dos muitos critérios bioquímicos para identificação dos diferentes tipos de fosfoserina/treonina fosfatases é a sensibilidade ao ácido okadáico, uma toxina produzida por flagelados marinhos. PP2A, PP4, PP5, e PP6 são inibidas por concentrações dez vezes menores de ácido okadáico do que as utilizadas para inibir as do tipo PP1. Embora PP2B, uma fosfatase ativada por cálcio/calmodulina, seja fracamente inibida pelo ácido okadáico, as enzimas da família PPM, tal como PP2C, uma enzima dependente de magnésio, não são afetadas por este inibidor (WERA & HEMINGS, 1995; COHEN, 1997). Esta família de enzimas PPs possui um sítio regulatório, localizado fora do domínio catalítico, que serve como sítio de ligação para proteínas regulatórias. A estrutura de raio-X de diversas PPs revela uma região central comum a estas proteínas, de conformação de  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ , a qual contém dois centros de metais, localizados no sítio ativo (Figura 4). Os íons metálicos são coordenados por três histidinas (em verde), dois ácidos aspárticos (em amarelo) e uma asparagina (em vinho), os quais são os

principais formadores dos “loops” entre os elementos estruturais do motivo  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ . Estes “loops” contêm importantes resíduos catalíticos, ainda não bem estudados. A conformação destes “loops” e a integridade estrutural da proteína, de uma forma geral, são mantidas pelos metais, que também desempenham papel fundamental na atividade catalítica. Este fato é observado para diferentes metais, como ferro, zinco e manganês, que se acomodam no sítio catalítico (GRIFFIT *et al.*, 1995; EGLOFF *et al.*, 1995; KISSINGER *et al.*, 1995).

O mecanismo de catálise empregado pelos membros desta família se processa por ataque direto de uma molécula de água ao centro possuidor do substrato fosforilado, sem transferência de fosfato para a enzima (Figura 5; EGLOFF *et al.*, 1995). O ataque nucleofílico da água ao átomo de fósforo do substrato fosforilado só ocorre porque a molécula é ativada ao formar pontes com os dois íons metálicos. A exclusão do resíduo de substrato é acelerada pela protonação proveniente de uma histidina adjacente (em azul, Figura 4).



Figura 4: Representação do sítio ativo de uma PP. A estrutura da fosfatase está representada na forma de “cartoons” em cinza, com as setas indicando folhas  $\beta$  e as espirais,  $\alpha$  hélices. Os demais resíduos estão representados em formato de balões e bastões. Os dois metais alinhados estão em vermelho. Os aminoácidos envolvidos na catálise promovida pelo metal são: histidinas, em verde, e ácidos aspárticos, em amarelo. A histidina, vista em azul, e o ácido aspártico, em laranja, são fundamentais para a catálise. A histidina é a principal doadora de prótons para o resíduo do substrato. (Retirado de: Denu *et al.*, 1996a).

Um ácido aspártico (em amarelo, Figura 4) interage com uma histidina, ajudando a mesma a se orientar para uma melhor transferência de prótons. Embora muitos aminoácidos estejam envolvidos na ligação dos íons metálicos na enzima e também na catálise (Figura 4), mais estudos devem ser feitos para elucidar este mecanismo.

Evidências experimentais têm demonstrado que PP1 está preferencialmente associada ao metabolismo de glicogênio, contração muscular, e progressão do ciclo celular (BARFORD, 1998), e que PP2A é uma das principais proteínas fosfatases envolvidas na modulação de vias de transdução de sinais, incluindo moléculas de superfície que funcionam como receptores, proteínas cinases citossólicas e fatores de transcrição. Estas moléculas participam ainda da regulação do ciclo celular, crescimento e divisão celular, e

organização dos filamentos de actina do citoesqueleto (LIN *et al.*,1998; MILLWARD *et al.*, 1999; KEYSE, 2000).

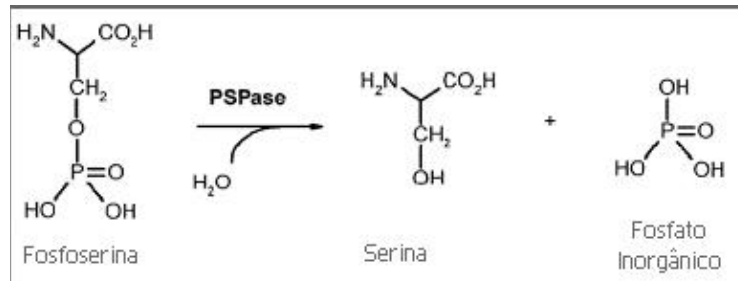


Figura 5: Hidrólise de ésteres de fosfato por Serina/Treonina fosfatases.

#### b) Proteínas Fosfotirosina Fosfatases (PTPs)

Quanto às proteínas tirosina fosfatases (PTPs), estas consistem em uma coleção superior a 40 enzimas, e podem ser classificadas como proteínas-receptores, não-receptores (intracelulares), e de especificidade dupla (VH1 e CDC25), como citado anteriormente (STONE & DIXON, 1994; BARFORD *et al.*, 1998).

As PTPs transmembranares ou do tipo receptoras (R-PTPs) são proteínas com a capacidade de iniciar um processo de transdução de sinal em resposta a um ligante externo (FISCHER *et al.*, 1991). Em geral, possuem dois domínios, um intra e outro extracelular, separados por um motivo conservado de 58 aminoácidos, inserido na membrana. O domínio intracelular é altamente conservado, possuindo estrutura e atividade típica de uma PTP clássica, como a PTP1B. Já o domínio extracelular é altamente variável, originando cinco tipos de proteínas fosfotirosina fosfatases transmembranares. O tipo I ou CD45 é uma proteína rica em glicosilações e em resíduos de cisteína. É detectada somente em linhagem de células hematopoiéticas, onde estão relacionadas com a maturação celular (TROWBRIDGE *et al.*, 1992); O tipo II ou LAR (do inglês “Leukocyte common Antigen

Related”) assemelham-se com moléculas de adesão, como as NCAMs (do inglês “neural cell adhesion molecules”), possuindo domínios imunoglobulina-G-“like”, ligados a nove domínios de fibronectina do tipo III. São moléculas envolvidas com a adesão célula-célula e também com regulação do ciclo celular (EDELMAN, 1985); O tipo III possui um segmento externo rico em moléculas de fibronectina do tipo III, e são capazes de mediar a adesão heterofílica célula-célula, ou seja, em um ligante que esteja em outro tipo celular ou em um componente da matriz extracelular (SPRINGER, 1990); O tipo IV que são receptores de fatores externos, possuindo um pequeno domínio extracelular em relação aos demais membros desta classe (FISCHER *et al.*, 1991); e o tipo V que são PTPs que possuem padrões estruturais variados, com função fisiológica ainda não determinada (BELTRAN e BIXBY, 2003).

A resolução, por cristalografia de raio-X, da estrutura de diversos tipos de PTPs (BRADFORD *et al.*, 1998), demonstrou que a especificidade das proteínas fosfotirosina fosfatases intracelulares é conferida pela conformação da cadeia lateral ao sítio catalítico. O sítio ativo é formado por domínios simples, do tipo  $\alpha + \beta$ , sendo eles, em geral, formados de quatro folhas  $\beta$  paralelas e uma  $\alpha$  –hélice central. A seqüência de aminoácidos do padrão catalítico conservado HCxxGxxRs(T) (pode ser observado na Figura 7, em vermelho) está localizada entre as folhas  $\beta$  que terminam em HC, e a  $\alpha$ -hélice que começa em RS do motivo conservado. No fundo da fenda catalítica encontra-se a cisteína responsável pela catálise (em verde na Figura 7). Aminoácidos, como arginina (em azul na Figura 7), ajudam a estabilizar a ligação do fosfato ao sítio ativo. Já o ácido aspártico (em dourado na Figura 7), localizado no “loop” flexível, sobre a fenda, sofre uma dramática

mudança conformacional quando o substrato se liga à enzima, gerando um deslocamento transitório do “loop” (DENU *et al.*, 1996a).

A estratégia catalítica utilizada pelas PTPs é extremamente diferente das PPs, porque possuem a formação de um intermediário enzimático fosforilado e não requerem íons metálicos para sua atividade catalítica. A reação enzimática envolve a formação de um intermediário fosforilado de cisteína, gerado pelo ataque nucleofílico do tiol desta ao átomo de fósforo do substrato fosforilado (DENU *et al.*, 1996a, b).

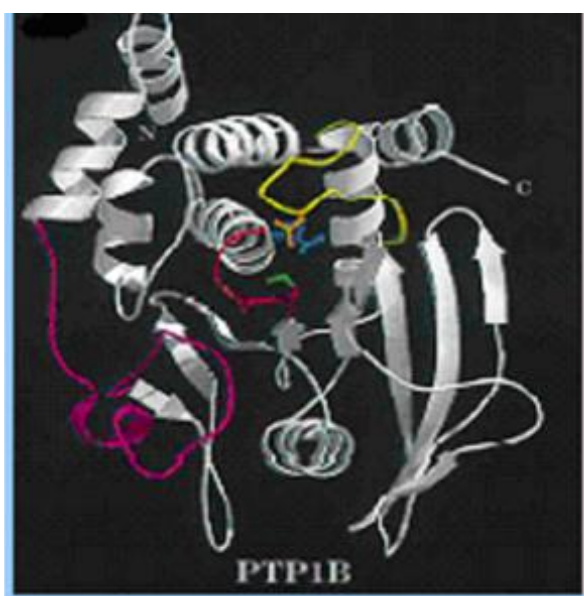


Figura 6: Representação esquemática de uma fosfotirosina fosfatase 1B. A estrutura é observada na representação de “cartoons” em cinza, onde as setas representam as folha  $\beta$ , e as espirais, as  $\alpha$  hélices. A cisteína responsável pela catálise pode ser observada em verde, a arginina em azul e as regiões que limitam o sítio ativo em vermelho. O ácido aspártico em laranja se apresenta alinhado com o “loop” visto em amarelo. A região que reconhece o substrato envolve uma série de “loops”, em vinho. (Retirado de DENU *et al.*, 1996b).

A reação pode ser representada por dois passos: a transferência do fosfato para a enzima, acompanhada de uma rápida liberação do produto defosforilado (indicado

através da constante  $K_{(\text{formação})}$ , da Figura 8), e a hidrólise do intermediário tiol-fosfato (indicado pela constante  $K_{(\text{hidrólise})}$ , da Figura 8).

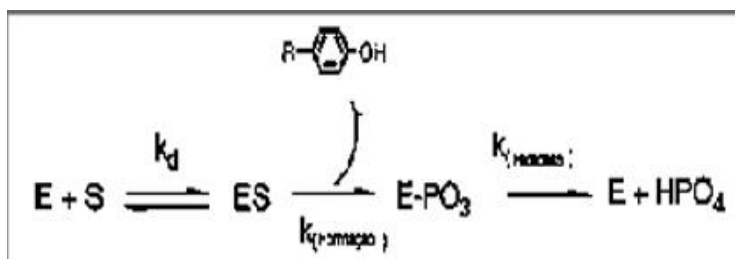


Figura 7: Ilustração dos passos de defosforilação catalisada por PP de um substrato fosforilado em resíduo de tirosina. (Retirado de: DENU *et al.*, 1996a).

Para que o complexo ES se forme, é necessário que algumas condições sejam satisfeitas, a saber: a enzima precisa se ligar e reagir com o grupamento fosfato do substrato (Figura 8); o ácido aspártico precisa estar protonado; a cisteína nucleofílica deve estar desprotonada (com ânions tiol;  $\text{S}^-$ ) para receber o átomo de fósforo (DENU *et al.*, 1996b). Satisfeitas estas condições, o primeiro passo para a catálise é a estabilização da molécula do substrato dentro do sítio, pela ligação a hidrogênios da guanidina e da arginina (Figura 9, A), e o seu correto posicionamento dentro do sítio. No sítio, o grupamento fosfato deve estar direcionado para o resíduo de cisteína nucleofílica e o resíduo de tirosina para o de ácido aspártico presente no “loop” acima do sítio (JIA *et al.*, 1995). Neste momento, com o substrato estabilizado e corretamente posicionado, o “loop” contendo o ácido aspártico (representado em laranja na Figura 7) se desloca para longe do sítio. Este deslocamento leva o ácido aspártico a uma posição na qual age como um ácido sobre o resíduo de tirosina, protonando-a, e permitindo que ocorra a sua dissociação do sítio (STUCKEY *et al.*, 1994).

Com a saída do resíduo de tirosina do sítio, o grupamento fosfato (rico em cargas negativas) é avidamente atraído pelo grupamento tiol nucleofílico da cisteína, produzindo-se, assim, o intermediário fosforilado da enzima. Para que este intermediário seja desfeito, é necessário que este sofra hidrólise. Esta molécula deve ser previamente ativada, tendo um de seus prótons removidos pelo resíduo de ácido aspártico, aumentando desta forma a velocidade de hidrólise. Quando já ativada, é quebrada a ligação entre fosfato e enzima, restaurando o estado inicial ou nativo da mesma (Figura 9, B) (DENU *et al.*, 1996b).

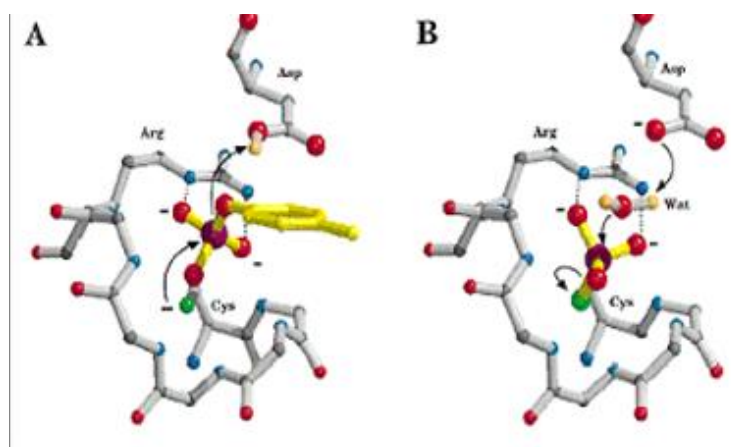


Figura 8: Mecanismo de catálise de PTPases: complexo enzima-substrato e intermediário enzimático fosforilado. (A) Um modelo esquemático do complexo enzima-substrato derivado de cristalografia de raio-X. A configuração espacial dos átomos do sítio ativo está representada pelo modelo de bolas e bastões. Os átomos individuais são representados por diferentes cores: C $\alpha$ , em verde; oxigênio, vermelho; nitrogênio, azul; fósforo, vinho; enxofre, verde; e hidrogênio, laranja. As linhas tracejadas representam pontes de hidrogênio. (B) Modelo do intermediário fosforilado da enzima, esquematizado da mesma forma que em (A), utilizando as mesmas cores. (Retirado de: DENU *et al.*, 1996b).

### c) Proteínas Fosfohistidina Fosfatases (PHPs)

Recentemente, foi descrita uma nova família de enzimas, conhecida como PHP (proteína histidina fosfatase). Essas enzimas não apresentaram homologia significativa com proteínas fosfatases conhecidas, e são insensíveis a inibidores clássicos de fosfatases,



porém sendo inibidas por fosfato inorgânico (Pi) (ZOLNIEROWICZ & BOLLEN, 2000). Em protozoários tripanosomatídeos, uma família de PHP tem sido conservada evolutivamente entre as espécies, sugerindo que estas enzimas participem efetivamente no crescimento, desenvolvimento e sobrevivência deste importante grupo de parasitas (SHAKARIAN *et al.*, 2003).

#### d) As Fosfatases Alcalinas

As fosfatases alcalinas ou fosfomonoesterases I (ativas em uma faixa de pH de 7,0 até 9,0) são enzimas não-específicas, ricamente glicosiladas, solúveis ou ligadas à membrana por âncoras de GPI, com capacidade de hidrolisar todos os monoésteres de ácido fosfórico, com a liberação de uma molécula de ortofosfato. Estas enzimas podem apresentar uma atividade dependente de metal, como o zinco, no caso das fosfatases de leucócitos humanos (DECHATELET *et al.*, 1971), ou ainda apresentam atividade independente de metal, como as encontradas em células de epitélio vascular neuronal P19 e HL-60 (SCHEIBE *et al.*, 2000).

Em sua maioria, as fosfatases alcalinas são enzimas diméricas que catalisam a hidrólise e a transfosforilação de uma ampla variedade de monoésteres de fosfato. A reação procede através de um intermediário serina-fosfato covalente para produzir fosfato inorgânico e um álcool (SCHWARTZ & LIPMANN, 1961). Cada sítio ativo da enzima dimérica contém três sítios de ligação a metal (M1, M2 e M3). Os sítios M1 e M2 são ocupados por íons zinco (também referidos como Zn1 e Zn2), enquanto o sítio M3 é ocupado por um íon magnésio. Os três íons metálicos em cada sítio ativo formam uma

tríade metálica catalítica (HOUGH *et al.*, 1989). Ao contrário dos dois íons zinco, não foi mostrado um papel direto na catálise para o íon magnésio no sítio M3, embora tenha sido demonstrada sua importância para a completa atividade enzimática (ANDERSON *et al.*, 1975; XU e KANTROWITZ, 1993; TIBBITTS *et al.*, 1996). O mecanismo catalítico assistido por dois íons metálicos especifica os papéis diretos e importantes de Zn1 e de Zn2 na ligação do substrato/produto e na formação de nucleófilos. Zn2, além da ligação do substrato/produto, coordena o grupo hidroxila de um resíduo de serina (Ser102), ativando-o para o ataque nucleofílico ao monoéster de fosfato na primeira etapa. Zn1 facilita a partida do grupo de saída alcoólico na primeira etapa e, assim, ativa uma molécula de água para o segundo ataque nucleofílico ao intermediário serina-fosfato covalente (STEC *et al.*, 2000).

Estas enzimas apresentam diversos papéis fisiológicos. Por exemplo, em *E. coli*, as fosfatases alcalinas têm como substratos a glicogênio sintase D, a fosforilase cinase e as fosfohistonas. Contudo, a necessidade de uma alta concentração de substrato indica que a atividade desta enzima deve ser pouco importante do ponto de vista fisiológico. Em contrapartida, as fosfatases alcalinas de placenta humana defosforilam, em baixas concentrações, histonas, protamina, glicogênio sintase, caseína e avidina fosforilados (HUANG *et al.*, 1976). Em *Salmo gairdneri* (truta), estas enzimas estão envolvidas com a osmorregulação dos tecidos (GASSER e KIRSCHNER, 1987).

#### e) As fosfatases ácidas

As fosfatases ácidas, também chamadas de fosfomonoesterases II (ativas em uma faixa de pH de 4,5 até 6,5), consistem em um grupo de enzimas não-específicas que hidrolisam uma variedade de substratos, tais como frutose 1,6-bisfosfato e *p*-nitrofenilfosfato, com a liberação do íon fosfato. Amplamente distribuídas na natureza,

podem ser encontradas em formas solúveis ou de membrana, que diferem entre si quanto ao peso molecular. As de baixo peso molecular são relativamente seletivas ao substrato, preferindo o *p*-NPP e a riboflavina fosfato, e são insensíveis à inibição por tartarato de sódio ou fluoreto de sódio (CAMICI *et al.*, 1989). Entretanto, são fortemente inibidas por agentes que interagem com grupamentos sulfidríla, como o mercúrio e o iodoacetato (LAIDLER *et al.*, 1982). Já as enzimas de alto peso molecular são pouco seletivas para o substrato e mostram-se sensíveis ao tartarato de sódio e ao fluoreto de sódio (CAMICI *et al.*, 1989), apresentando um mecanismo de catálise dependente de metal (is). Exemplos são a fosfatase ácida de osso (KATO *et al.*, 1986), as que contêm ferro ou magnésio (UEHARA *et al.*, 1974a, b) e as que têm sua atividade relacionada ao estado oxidativo do grupamento tiol (LAIDLER *et al.*, 1982).

As proteínas fosfatases ácidas também estão presentes em parasitos, como demonstrado em alguns membros da família dos tripanossomatídeos (EECKHOUT, 1970; VENKATESAN *et al.*, 1977). *Leishmania donovani*, por exemplo, possui três tipos distintos de fosfatases ácidas: as de membrana ou ACPs, que são divididas em ACP-1,2 e 3, resistentes à inibição por tartarato de sódio (REMALEY *et al.*, 1985); as secretadas, sensíveis à inibição por tartarato de sódio; e as intracelulares (GOTTLIEB & DWYER, 1981).

#### 1.4. Ecto-Fosfatases

As fosfatases podem ser classificadas segundo a sua localização celular, que pode variar entre enzimas intracelulares (ZHAN *et al.*, 2000; ANDREWS & STARK, 2000); extracelulares ou secretadas (JOLIVIET *et al.*, 1998; JUSTINO *et al.*, 2001; DUTRA *et al.*, 2001); ou ainda de superfície celular, na forma ou não de receptor (MILDNER *et al.*, 1975;

ARNOLD *et al.*, 1986; AASEN & ALBORNOZ, 1994). Ecto-fosfatases são fosfatases de superfície cujo sítio ativo está voltado para o meio extracelular (FURUYA *et al.*, 1998). Estas ecto-enzimas foram detectadas em vários microrganismos, incluindo protozoários (GOTTLIEB & DWYER, 1981; FERNANDES *et al.*, 1997; MEYER-FERNANDES *et al.*, 1999, DOS PASSOS LEMOS *et al.*, 2002, DE ALMEIDA-AMARAL *et al.*, 2006, FONSECA-DE-SOUZA *et al.*, 2008) bactérias (BLISKA *et al.*, 1991; BRAIBANT & CONTENT, 2001) e fungos (MAHVI *et al.*, 1974; MILDNER *et al.*, 1975; ARNOLD *et al.*, 1986; AASEN & ALBORNOZ, 1994; YODA *et al.*, 2000; BERNARD *et al.*, 2002; KNEIPP *et al.*, 2003, 2004; COLLOPY-Jr. *et al.*, 2006, KIFFER-MOREIRA *et al.*, 2007a, b), sendo presentes, também, na superfície de órgãos de insetos triatomíneos (FERRARO *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2008).

Embora o papel fisiológico de ecto-fosfatases expressas em diferentes microrganismos não esteja bem estabelecido, evidências experimentais mostram que tais moléculas desempenham diferentes funções. Em tripanossomatídeos, ecto-fosfatases foram relacionadas à diferenciação celular. Em *T. cruzi*, observou-se o aumento da atividade ecto-fosfatásica durante a transformação *in vitro* de formas epimastigotas para amastigotas (NAKAGURA *et al.*, 1985). Em fungos, foi observada ainda a participação destas enzimas como participantes do processo de infecção, já que para *Fonsecaea pedrosoi*, células recém-isoladas de um caso de cromoblastomicose demonstraram uma atividade ecto-fosfatásica maior quando comparada a outros isolados (KNEIPP *et al.*, 2003). Na bactéria *Yersinia pseudotuberculosis* o envolvimento de proteína fosfotirosina fosfatase na virulência também foi proposto, uma vez que células deficientes nessa atividade catalítica eram avirulentas (BLISKA *et al.*, 1991). Além da participação destas enzimas na proteção contra o “burst” oxidativo de neutrófilos (SAHA *et al.*, 1985; BACA *et al.*, 1993), alguns

trabalhos demonstraram o envolvimento de fosfatases em processos fundamentais para o estabelecimento de algumas patogenicias, como a interação parasito-célula hospedeira (ZHONG *et al.*, 1998; FURUYA *et al.*, 1998; BLISKA *et al.*, 1991). Em *Candida parapsilosis* foi demonstrada a associação da atividade ecto-fosfatásica com adesão de diferentes isolados deste fungo a células epiteliais bucais (FERNANDO *et al.*, 1999). Recentemente, está se correlacionando o papel das ecto-fosfatases e outras ecto-enzimas, como as ecto-ATPases, no fenômeno de múltipla resistência a drogas em células fúngicas e de plantas (THOMAS *et al.*, 2000). Em *Cryptococcus neoformans* observou-se este tipo de fenômeno, onde células crescidas na presença de ATP (substrato natural para ectoATPases) necessitavam de uma maior dose mínima inibitória de droga para induzir a morte celular (JUNIOR *et al.*, 2005).

Muitos estudos têm demonstrado o papel de ecto-fosfatases na aquisição de fosfato inorgânico para utilização no crescimento de diversos tipos celulares (GOTTLIEB & DWYER, 1981; FERNANDES *et al.*, 1997; KNEIPP *et al.*, 2004, FONSECA-DE-SOUZA, 2008). KNEIPP *et al.* (2004) demonstraram, pela primeira vez, que as ecto-fosfatases podem ser moduladas pela concentração de fosfato inorgânico exógena. Além disso, mostraram também que o fosfato exógeno é capaz de levar à expressão diferenciada de enzimas, com características bioquímicas significativamente diferentes entre as células que são mantidas em meio com fosfato e aquelas mantidas em meio depletado de fosfato (KNEIPP *et al.*, 2004). Em *T. rangeli*, a depleção de fosfato inorgânico do meio de cultura leva a um crescimento prejudicado das formas epimastigotas. Também foi demonstrado que a atividade ecto-fosfatásica é modulada pela concentração de fosfato exógeno, ocorrendo um aumento de cinco vezes da atividade ecto-fosfatásica do meio com fosfato (FONSECA-DE-SOUZA *et al.*, 2009).

### 1.5. Fosfato Inorgânico Exógeno

O fósforo (P) é um macronutriente e constituinte estrutural essencial para diversos organismos vivos. Ele está presente em diversas biomoléculas e tem papel fundamental na conservação de energia e regulação metabólica. Contudo, plantas e microorganismos não são capazes de absorver fósforo, sendo apenas capazes de assimilar o fosfato inorgânico (Pi). Entretanto, o Pi está distribuído de forma irregular, e nos organismos, boa parte do fosfato inorgânico não está prontamente disponível (TICCONI *et al.*, 2001; TASAKI *et al.*, 2002; STENZEL *et al.*, 2003; GONZÁLEZ *et al.*, 2005; BALDWIN *et al.*, 2008). O fosfato inorgânico está envolvido em muitas reações bioquímicas relacionadas com a transferência do grupamento fosforil (TORRIANI, 1990; AUESUKAREE *et al.*, 2004; LAMARCHE *et al.*, 2008). Devido à baixa disponibilidade deste nutriente no ecossistema, o Pi caracteriza-se por ser um composto limitante do crescimento de vários organismos (TASAKI *et al.*, 2002). Em frente a condições com baixo Pi, a maior parte de plantas e microorganismos tem desenvolvido mecanismos adaptativos. Em *Saccharomyces cerevisiae*, o mecanismo adaptativo foi denominado de sistema *PHO*, que constitui uma família de genes e reguladores (OSHIMA, 1997). A via de transdução de sinal do Pi regula a expressão de diversos genes responsivos ao fosfato (Psi), que estão envolvidos no *scavenging* e captação específica do Pi de fontes extracelulares (AUESUKAREE *et al.*, 2004). Esta via de transdução de sinal do Pi (sistema *PHO*) tem sido descrita em diferentes organismos, tais como plantas (CIERESZKO *et al.*, 2000; TICCONI *et al.*, 2001; STENZEL *et al.*, 2003; GONZÁLEZ *et al.*, 2005; SHIMANO e ASHIHARA, 2006; BALDWIN *et al.*, 2008), bactérias (TORRIANI, 1990; MONDS *et al.*, 2006; VON

KRÜGER *et al.*, 2006; LAMARCHE *et al.*, 2008) e fungos (OSHIMA, 1997; TASAKI *et al.*, 2001; AUESUKAREE *et al.*, 2004; DE GOUVÊA *et al.*, 2008). Em tripanossomatídeos, esse sistema *PHO*, ainda não foi determinado.

#### a) Sistema *PHO*

O sistema *PHO* foi descrito em leveduras por Oshima (1982). Inicialmente, observou-se que uma série de genes de fosfatases era modulada pela concentração de Pi do meio de cultura, desta forma, ficou caracterizado inicialmente o sistema *PHO* como fosfatases diferencialmente expressas (OSHIMA, 1997). Estudos posteriores demonstraram que essa via de sinalização regula a expressão de genes *PHO*, que codificam proteínas envolvidas com a disponibilização e captação específica de Pi extracelular, e não somente fosfatases (DE GOUVÊA *et al.*, 2008). A aquisição celular, estocagem, liberação e integração metabólica de Pi necessita da participação essencial de numerosas enzimas, tais como fosfatases ácidas exocelulares (APases), fosfodiesterases, transportadores de Pi, polifosfato quinases, fosfatases alcalinas (ALPases), e endopolifosfatases (KANEKO *et al.*, 1985; OSHIMA *et al.*, 1996). A atividade destas enzimas é intrinsecamente ligada à um homeostase de Pi. Sendo assim, estas enzimas sofrem regulação em resposta a níveis variados de Pi, numa via de transdução de sinal de Pi, chamada sistema *PHO* (OSHIMA 1997; PERSSON *et al.*, 2003).

A resposta ao Pi, mediada pelo sistema *PHO*, é determinada pela atividade e localização do fator transcricional Pho4, mediado por fosforilação pelo complexo quinase dependente de ciclina (CDK) Pho80-Pho85. Quando as células estão submetidas à depleção de Pi, o inibidor de CDK, Pho81, inativa Pho80-Pho85, permitindo que Pho84 ativo, isto é, defosforilado, se associe ao receptor nuclear Pse1 e induza a expressão de vários genes

(KAFFMAN *et al.*, 1994). Estes genes irão codificar transportadores de alta afinidade (*PHO84*, *PHO89*), fosfatases ácidas secretadas (*PHO5*, *PHO11*, *PHO12*), e outras proteínas correspondentes que irão aumentar o resgate de Pi de fontes extracelulares (OSHIMA, 1997; MOUILLON *et al.*, 2006).

*S. cerevisiae* tem, pelo menos, dois sistemas de captação de Pi: um com baixo  $K_m$  e outro com alto  $K_m$  para o Pi externo (OSHIMA, 1997). O sistema com baixa afinidade tem um  $K_m$  de 1 mM para o Pi extracelular, e é proposto que este sistema seja expresso constitutivamente. Contudo, uma crescente família de transportadores responsivos ao Pi, com alta afinidade, tem sido descrito, incluindo Pho84p, Pho89p, e outros (PERSSON *et al.*, 2003). Desses, Pho84p é a proteína responsável pela maior parte da captação de Pi para as células submetidas à depleção de Pi. Este transportador foi caracterizado por Bun-ya *et al.* (1991), e cataliza a captação de Pi acoplado a  $H^+$ , com um  $K_m$  para o Pi extracelular de 1-15  $\mu M$  e uma estequiometria sugerida de 2-3  $H^+$  por ânion de Pi monovalente (PERSSON *et al.*, 2003). Pho84p pertence à família de transportadores simporte Pi: $H^+$  (TC 2.A.1.9) e é um membro da superfamília MFS. O co-transporte de Pi com  $H^+$  resulta numa acidificação do meio intracelular, fato este que aumenta a captação do cátion (ROOMANS *et al.*, 1997).

Como já mencionado anteriormente, Pho84p é o responsável majoritário da captação de Pi em condições com baixo Pi, enquanto que Pho89p e os recentemente caracterizados Pho87p, Pho90p, e Pho91p, apresentam papel menos significativo (MARTINEZ e PERSSON, 1998; GIOTS *et al.*, 2003).

Um outro transportador de Pi com alta afinidade, responsivo à concentração de Pi extracelular, com um  $K_m$  para Pi externo de 0,5  $\mu M$ , é codificado pelo gene *PHO89* e é



mediado por um transporte de Pi acoplado a cátions, com forte preferência por Na<sup>+</sup> (MARTINEZ e PERSSON, 1998). As razões de captação de Pi catalisada por estes dois transportadores de alta afinidade exibem alta dependência a pH. O transportador Pho84p tem atividade máxima em pH próximo a 5,0, pH este no qual o transportador Pho89p é inativo. Em contraste, o transportador Pho89p é ativo na faixa alcalina de pH, com atividade máxima em pH 9,5 (MARTINEZ e PERSSON, 1998; PERSSON *et al.*, 2003). A atividade máxima de Pho89p é 100 vezes menor do que o transportador Pho84p.

Como uma estratégia adicional de sobrevivência, polifosfato (poliP) é sintetizado e acumulado no vacúolo e em outros compartimentos celulares, e representa uma reserva de Pi utilizável durante períodos de depleção de Pi (PERSSON *et al.*, 2003). PoliP é um polímero linear de resíduos de ortofosfato, unidos por ligações fosfoanidrido de alta energia. Em tripanossomatídeos, vacúolos chamados acidocalcisomas, são as organelas responsáveis pelo estoque celular de poliP (De SOUZA, 2002). Durante a transferência da célula para um meio deficiente de Pi, ocorre um rápido decréscimo do conteúdo de poliP, indicando que o estoque de poliP é usado para necessidades celulares sob essas condições de crescimento. Esta mobilização do conteúdo de poliP é acompanhada pela ação de várias diferentes fosfatases (OSHIMA, 1997). Enzimas envolvidas na quebra de resíduos de Pi terminal da cadeia de poliP são chamadas exopolifosfatases: Pho5p, Pho11p e Pho12p (localizadas no espaço periplasmático), Ppx1p (citossólica) e Pho8p (vacuolar). A endopolifosfatase Ppn1p, contendo um domínio transmembranar e localizada na membrana vacuolar, quebra cadeias longas de poliP em cadeias menores com resíduos de 3 Pi (P<sub>3</sub>) e 60 Pi (P<sub>60</sub>) (PERSSON *et al.*, 2003).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, foi observado que aproximadamente 550 genes são regulados positivamente sob depleção de Pi. Apenas uma pequena fração desses genes está

relacionada com fosfatases. REDDY *et al* (2008) demonstraram o papel de fosfatases no metabolismo de fosfolipídios sob depleção de Pi em *S. cerevisiae*. Eles demonstraram que os níveis de ácido lisofosfatídico (LPA) estavam reduzidos com a depleção de Pi, uma vez que LPA é um importante intermediário na biossíntese de fosfolipídios e lipídios neutros. Eles demonstraram, também, que a hidrólise de LPA era mediada por uma fosfatase, codificada pelo gene *PHM8* (do inglês, *phosphate metabolism gene 8*), e esta hidrólise é dependente do íon magnésio.

b) Via regulatória do sistema *PHO*

Em meio com alto Pi, um complexo de reguladores negativos, Pho80p (ciclina) e Pho85p (proteína quinase dependente de ciclina), fosforila cinco resíduos de serina de Pho4p (KAFFMAN *et al.*, 1994). Esse complexo, então, impede a transcrição de genes *PHO* por reduzir a localização nuclear de Pho4p (OSHIMA, 1997). Quando a concentração de Pi é suficiente baixa, Pho86p e Pho88p (transportadores de Pi) podem estimular a atividade de Pho81p. Logo, Pho81p ativado inibe o complexo Pho80p/Pho85p (OGAWA *et al.*, 1995), permitindo que Pho4p, em associação com Pho2p, ativem a transcrição de genes *PHO* (Figura 9; OSHIMA, 1997).

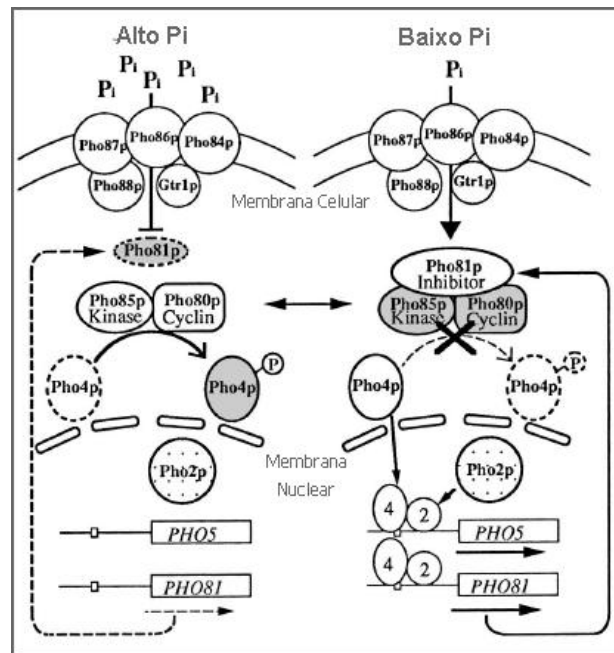


Figura 9. Mecanismo molecular de transdução do sinal de fosfato inorgânico extracelular para os genes estruturais PHO no núcleo. Nas formas sombreadas estão representadas proteínas regulatórias nas formas inativas. As setas mostradas abaixo das caixas indicam a transcrição de genes *PHO5* e *PHO81*. As setas pontilhadas indicam expressão basal de *PHO81*. Outros genes estruturais da via *PHO* foram omitidos para simplificar o esquema (Adaptado de OSHIMA, 1997).

Pho85p é uma das cinco CDKs encontradas em *S. cerevisiae*. Em geral, CDKs são inativas como monômeros e necessitam de ciclinas para tornarem-se ativas; e pelo menos dez diferentes ciclinas são conhecidas por se associar com Pho85p (PERSSON *et al.*, 2003). Essas ciclinas estão envolvidas no ciclo celular e/ou regulação metabólica. Por exemplo, Pc15p é necessário para a função de Pho85p de fosforilar Gcn4p, um ativador transcricional de genes da biossíntese de aminoácidos (SHEMER *et al.*, 2002). Na regulação do ciclo celular, Pho85p interage com ciclinas de G1, Pc11p e Pc12p (ESPINOZA *et al.*, 1994).

No processo de assimilação de Pi, a função quinase de Pho85p é ativada pela interação com Pho80p, e a atividade quinase do complexo ciclina-CDK Pho85p/Pho80p regula o estado do sistema *PHO* pela fosforilação de Pho4p e outros possíveis elementos regulatórios. Pho4p está concentrado no núcleo quando as células crescem em meio depletado de Pi, e sua localização é citoplasmática quando as células crescem em meio rico de Pi (KAFFMAN *et al.*, 1994; PERSSON *et al.*, 2003).

c) Membrana Plasmática: Adaptação dos componentes da superfície celular à depleção de Pi

Todas as células necessitam monitorar o ambiente externo, para responder a estímulos indutores de proliferação, diferenciação e morte celular (DICKMAN & YARDEN, 1999). Principalmente os parasitos intracelulares, tais como espécies de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos, que durante seu ciclo de vida precisam perceber o meio em que se encontram para que possam se adaptar e sobreviver. Entretanto, nem todos os parasitos se estabelecem em um ambiente intracelular, e para estes a membrana plasmática é um elemento diretamente envolvido na troca de informações com o meio, incluindo transporte de nutrientes, íons, e ainda a proteção do parasito contra a resposta imune do hospedeiro (ZILBERSTEIN & SHAPIRA, 1994; MEYER-FERNANDES *et al.*, 1997).

Algumas bactérias mudam sua forma para aumentar a razão entre superfície e volume, tendo então maior contato com o ambiente externo e aumentando as chances de captar nutrientes essenciais, dentre eles, o Pi. Durante a depleção de Pi, muitas bactérias modificam seus componentes da superfície celular (LAMARCHE *et al.*, 2008), incluindo os lipídios, componentes integrais de membrana e fundamentais para sua integridade

estrutural e funcional (RUSSO *et al.*, 2007). Fosfolipídios e glicolipídios representam os principais constituintes das membranas biológicas e, com base na estrutura da parte hidrofóbica, diferentes classes de lipídios de membrana podem ser distinguidos: glicerolipídios, esfingolipídios, e lipídios esteróides, com os fosfoglicerolipídios constituindo o grupo mais abundante. Em animais e leveduras, bem como em membranas extraplastídicas de plantas, fosfoglicerolipídios são as classes de lipídios predominantes. Em contraste, plastos são caracterizados pela ocorrência de altas proporções de galactolipídios (HÖLZL & DÖRMANN, 2007). Monogalactosildiacylglicerol (MGDG) e digalactosildiacylglicerol (DGDG) são componentes predominantes de membranas tilacóides, que constituem por volta de 50 e 30%, respectivamente, dos lipídios totais de membrana de cloroplastos em plantas superiores (KOBAYASHI *et al.*, 2006). Em *Arabidopsis*, por volta de um terço do fosfato associado organicamente, está nos fosfolipídios (POIRIER *et al.*, 1991). E, como em muitos solos, a deficiência de Pi é um fator limitante de crescimento para plantas e microorganismos, as primeiras aumentam sua capacidade de captar Pi alterando a arquitetura da raiz, e são capazes de substituir parte dos seus fosfolipídios de membrana por lipídios não-fosfatados, como DGDG e sulfoquinovosildiacylglicerol (SQDG). O DGDG acumula nas plantas sob depleção de Pi, substituindo fosfolipídios das membranas plastidial e extraplastidial (HÖLZL & DÖRMANN, 2007). Acredita-se que o DGDG, como é neutro, pode substituir diversos fosfolipídios de membrana, incluindo fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE). Entretanto, MGDG e SQDG não são detectados fora dos plastos (ANDERSSON *et al.*, 2003).

Por outro lado, uma diminuição do conteúdo de fosfolipídios de membrana é uma resposta comum de plantas à depleção de Pi, mobilizando a reserva de Pi dessas moléculas.

Sob essas condições, a hidrólise de fosfolipídios, ao contrário de representar um evento negativo na atividade celular, está envolvida em muitos processos celulares vitais e age na formação de mensageiros de sinalização (RUSSO *et al.*, 2007). A fosfolipase D (PLD) hidrolisa fosfolipídios na ligação fosfoester terminal, gerando ácido fosfatídico (PA) e um grupo livre como a colina, enquanto fosfolipase C (PLC) hidrolisa o fosfolipídio fosfatidilinositol-4,5-bifosfato em inositol-1,4,5-trifosfato e diacilglicerol (DAG). Isso pode representar uma sinalização para síntese de galactolipídio e/ou podem ser rapidamente fosforilados na membrana por PA ou DAG quinase. Desta forma, um dos papéis das fosfolipases pode ser a sinalização intracelular, pela ativação de PA (TESTERIN & MUNNIK, 2005). Logo, lipídios mensageiros, quando produzidos imediatamente após o estresse e somente por um período curto, têm efeitos positivos mediando e/ou ativando respostas de defesa (RUSSO *et al.*, 2007).

## 2. OBJETIVOS

Recentemente, nosso grupo demonstrou que células de *T. rangeli* (cepa Macias) submetidas a meio com baixa concentração de Pi (2 mM de Pi) apresentam uma atividade ecto-fosfatásica cerca de 3 vezes maior quando comparada àquela atividade das células crescidas em meio padrão (50 mM de Pi) (FONSECA-DE-SOUZA *et al.*, 2009). Assim, como objetivo desta dissertação temos:

- ∅ Determinar se as atividades encontradas nas células de *T. rangeli* crescidas em meios LIT padrão ou com baixo Pi, correspondem à mesma enzima ou a enzimas distintas, utilizando, para tanto, os seguintes parâmetros bioquímicos para caracterizar estas atividades ecto-fosfatásicas:
  1. Influência do pH nas atividades ecto-fosfatásicas;
  2. Dependência de cátions divalentes dessas atividades como indicativo de diferentes sítios de ligação a metais;
  3. Hidrólise diferenciada de aminoácidos fosforilados;
  4. Sensibilidade destas atividades ecto-fosfatásicas frente a inibidores específicos de fosfatases;
- ∅ Estudar outras alterações decorrentes da depleção de Pi em *T. rangeli*, tais como:
  1. Observar alterações morfológicas em resposta à privação de Pi;
  2. Verificar a influência da depleção de Pi na ultraestrutura das principais organelas;
  3. Avaliar se há comprometimento na capacidade de consumo de oxigênio;
  4. Investigar se há alterações da composição fosfolipídica da membrana plasmática.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. *Microrganismos e condições de cultivo*

O microorganismo *Trypanosoma rangeli*, cepa Macias, foi gentilmente cedida pela Dra. Maria Auxiliadora de Sousa do Departamento de Parasitologia da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. A cultura foi mantida no meio LIT (“Liver Infusion Triptose”) (Tabela 1), ajustado para pH 7,2 com HCl, e suplementado com 20% de soro fetal bovino (SEROMED – Campo Grande, MS), a 28°C. Os repiques foram realizados a cada cinco dias.

#### 3.2. *Obtenção da massa celular*

Para obtenção de massa celular, os parasitos intactos e viáveis foram coletados por centrifugação a 1500x g a 4°C, lavados três vezes em uma solução-tampão contendo 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 100mM de sacarose e 20mM de KCl. As células foram imediatamente utilizadas, sendo armazenadas a temperatura ambiente até o momento da contagem e da realização dos experimentos.

#### 3.3. *Teste da viabilidade celular*

A viabilidade celular das células epimastigotas de *T. rangeli* foi garantida com a utilização do teste de exclusão do corante azul de Trypan, sendo verificada a viabilidade destas células antes e após cada experimento, conforme descrito por DUTRA *et al.* (1999). Além disso, também foi verificada a mobilidade celular, em microscópio óptico.



### 3.4. Avaliação da proliferação celular de *T. rangeli* submetidos à depleção de Fosfato Inorgânico

Para avaliar qual seria a influência do fosfato inorgânico exógeno na proliferação de *T. rangeli*, foram preparados dois tipos de meios de cultura: meio LIT padrão, conforme descrito na Tabela 1, apresentando uma concentração de fosfato inorgânico de 50 mM, e o meio LIT sem a adição do suplemento de fosfato, o qual foi denominado como meio LIT com baixo Pi, uma vez que este apresenta uma concentração de Pi de 2 mM (Tabela 2). O meio com baixo Pi foi ajustado em um osmômetro, para garantir que sua osmolaridade fosse próxima à do meio controle. As células de sexto dia de cultura (cepa Macias) foram coletadas em frascos estéreis, lavadas três vezes com a mesma solução-tampão estéril, conforme descrito acima, contadas, e usadas para inóculo de curvas de crescimento, com concentração inicial de células de  $1,0 \times 10^6$  células/mL, nos meios padrão ou baixo Pi. A densidade celular foi estimada diariamente através da contagem de alíquotas em câmaras hemocitométricas de Neubauer, por meio de microscopia óptica (Microscópio Optitech).

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO	
	Meio padrão	Meio com baixo Pi
NaCl	4.0 g/L	6.32 g/L
KCl	0.4 g/L	0.4 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.9 g/L	-
Glicose	2.0 g/L	2.0 g/L
Triptose	5.0 g/L	5.0 g/L
Infusão de fígado (“Liver Infusion”)	5.0 g/L	5.0 g/L
Hemina	20 µg/L	20 µg/L
Ácido fólico	30 µg/L	30 µg/L

Tabela 1. Composição do meio LIT padrão e meio com baixo Pi. Ambos os meios de cultura foram preparados com os mesmos reagentes. No caso do meio com baixo Pi, foi adicionado NaCl a mais até que a osmolaridade do meio se tornasse igual aquela do meio controle. Vale ressaltar que, mesmo sem a adição de Pi, os componentes da parte complexa do meio LIT totalizam 2mM de Pi, como dosado pelo método de Fiske e Subbarow (FISKE & SUBBAROW, 1925).

### 3.5. Determinação da Atividade Ecto-ATPásica de Trypanosoma rangeli

Parasitas intactos ( $1 \times 10^7$  células/ml) foram incubados em meio de reação contendo Hepes-Tris 50mM (pH 7,2), NaCl 116mM, KCl 5,4mM, glicose 5,5mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, ATP 5mM;  $1,25 \times 10^6$  [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP, durante uma hora, a temperatura ambiente.

A reação foi disparada pela adição das células, e parada pela adição de 1 ml de uma solução de carvão vegetal 25% em HCl 1M. Os tubos de reação foram então centrifugados a 1500g durante 10 minutos, a 4°C, e alíquotas de 0,5 ml do sobrenadante foram retiradas e aplicadas em papel de filtro. Os papéis foram deixados à temperatura ambiente para evaporação do conteúdo aquoso, e em seguida

transferidos para frascos contendo 10ml de líquido de cintilação (2 g de POPOP em 1 L de tolueno), e contados em cintilador líquido (Packard Tri-carb 2100 TR).

### 3.6. Determinação da atividade ecto-fosfatásica em *Trypanosoma rangeli*

a) Dosagem de *p*-nitrofenol (*p*-NP) – (Método 1, FERNANDES *et al.*, 1997)

Para a determinação da hidrólise de *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP), uma suspensão celular ( $10^7$  células de *Trypanosoma rangeli*) foi adicionada a um volume de reação de 0,5 ml contendo uma solução-tampão (pH 7,2), composta de 100 mM de sacarose, 20 mM de KCl, 50 mM de Tris-HCl e 5 mM de *p*-nitrofenol (*p*-NPP) como substrato para a reação. Após o tempo de 60 minutos, foi adicionado 1ml de NaOH à mistura para o término da reação. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 1500x g por 15 minutos (25°C), e o sobrenadante foi submetido à leitura espectrofotométrica a 405 nm (Figura 10). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e avaliou-se a hidrólise não-específica do *p*-NPP (tubo branco) não se colocando a suspensão celular em contato com o substrato antes da adição do NaOH. A concentração de *p*-NP liberada foi calculada através de uma curva-padrão de *p*-NP, e as atividades foram expressas em nmol de *p*-NP liberados  $\times h^{-1} \times 10^{-7}$  células. As modificações realizadas para a caracterização das ecto-fosfatases estão detalhadas nos próximos itens e na legenda das figuras.

b) Dosagem de Fosfato Inorgânico (Pi) (Método 2, FISKE & SUBBAROW, 1925)

Esse método foi utilizado quando a atividade ecto-fosfatásica de *T. rangeli* foi ensaiada frente a *p*-NPP e outros substratos fosforilados, como fosfotirosina (P-Tir), fosfotreonina (P-Tre), ou fosfoserina (P-Ser). As condições experimentais e a taxa de

hidrólise de *p*-NPP foram idênticas às descritas anteriormente para ambos os métodos, exceto que após 60 minutos de incubação das células na presença do substrato fosforilado, o meio de reação foi centrifugado e 0,1 ml do sobrenadante foi adicionado a 0,1 ml do reativo de Fiske-Subbarow (FeSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>). Nesta reação, ocorre a reação do fosfato inorgânico liberado com o molibdato de amônio, catalisada por íons ferrosos e ácido sulfúrico, com formação do complexo fosfomolibdato de amônio, que tem seu pico de absorção em torno de 650nm. Após 20 minutos de incubação, as atividades enzimáticas foram determinadas através de uma curva-padrão de Pi, e expressas em nmol de Pi liberados x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Um sistema de branco, no qual a suspensão celular foi adicionada ao meio de reação apenas imediatamente antes do término da reação, foi realizado para a exclusão da hidrólise inespecífica do substrato.

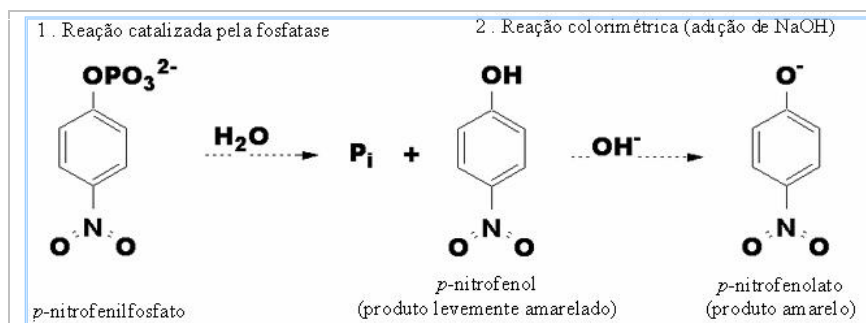


Figura 10. Hidrólise do substrato artificial *p*-NPP. Após a hidrólise do *p*-NPP, são produzidos, de maneira equimolar, Pi e *p*-nitrofenol. A dosagem da atividade fosfatásica pode ser feita pela medida da liberação tanto de um quanto de outro produto. A dosagem do fosfato se dá pela quantificação do complexo fosfomolibdato de amônio com o reagente de Fiske e Subbarow. Por outro lado, a dosagem do *p*-NP se dá quando, após a adição de NaOH, a base forte OH<sup>-</sup> abstrai totalmente o próton fenólico, deslocando o equilíbrio da transformação do *p*-nitrofenol (que não tem cor) em *p*-nitrofenolato (de cor amarela) para a formação deste último, favorecendo a observação da cor amarela, com pico de absorção em torno de 405 nm.

Vale ressaltar que os níveis das atividades fosfatásicas, dosadas pelos Métodos 1 e 2 (Material e Métodos), foram idênticos, uma vez que a concentração de *p*-NP liberada é

equivalente à concentração de Pi liberado. Nas caracterizações bioquímicas, a atividade ecto-fosfatásica em *T. rangeli* foi expressa em função do número de células (nmol *p*-NP ou Pi x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células). Dessa forma, podemos correlacionar as atividades ecto-ATPásicas e ecto-3'-nucleotidásicas, uma vez que nos métodos para dosagem destas atividades há liberação de Pi.

### 3.7. Teste para fosfohidrolases secretadas

Para garantir que se trata de ecto-enzimas, excluindo a possibilidade da interferência de outras possíveis enzimas secretadas nos ensaios, as células foram incubadas em 0,5 ml da mesma solução-tampão descrita acima (pH 7,2) durante 60 minutos, à temperatura ambiente. Após o término da incubação, as células foram removidas por centrifugação, conforme especificações anteriormente exemplificadas, e o sobrenadante foi submetido a dosagem da atividade fosfatásica, demonstrando não haver atividade neste sobrenadante (Método 1).

### 3.8. Modulação das Atividades ecto-fosfatásicas de *T. rangeli* pelo conteúdo de fosfato inorgânico do meio de cultura.

As atividades ecto-fosfatásicas de *T. rangeli* (cepa Macias) foram avaliadas em células crescidas em meio padrão ou com baixo Pi, em fase estacionária, como descrito pelo método 1.

### 3.9. Caracterização Bioquímica

Para caracterização enzimática das ecto-fosfatases de *T. rangeli* vários parâmetros bioquímicos foram analisados através da dosagem dos produtos da hidrólise enzimática, *p*-

NP (Método 1) ou Pi (Método 2), com as devidas modificações, como descrito nos próximos itens.

a) Efeito do pH nas atividades ecto-fosfatásicas

Para a determinação da influência do pH sobre a atividade ecto-fosfatásica, os ensaios foram realizados substituindo a solução-tampão anteriormente descrita por uma outra composta de MES-HEPES-Citrato, todos na concentração de 116 mM. Os experimentos foram realizados em diferentes valores de pH, variando na faixa de 6,0 - 8,5. As condições experimentais foram como descritas no método 1.

b) Efeito de diferentes cátions nas atividades ecto-fosfatásicas

As atividades fosfatásicas foram ensaiadas segundo o método 1, na presença dos cátions  $\text{Ca}^{2+}$  (5 mM),  $\text{Sr}^{2+}$  (5 mM),  $\text{Mn}^{2+}$  (5 mM),  $\text{Mg}^{2+}$  (5 mM),  $\text{Ni}^{2+}$  (1 mM) e  $\text{Co}^{2+}$  (5 mM), todos na forma de sais de cloreto solúveis. Para exclusão da participação de cátions contaminantes nas dosagens, foi adicionado EDTA ou EGTA ao sistema.

c) Influência da concentração de *p*-NPP nas atividades ecto-fosfatásicas: determinação dos parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{max}$ )

As células foram incubadas com concentrações crescentes de *p*-NPP (0-20 mM) e as atividades fosfatásicas foram determinadas conforme descrito no Método 1. O  $K_m$  para *p*-NPP e a  $V_{max}$  foram calculados através do programa “Sigma Plot for Windows” (Jandel Scientific Software, San Diego, CA) por análise de regressão não linear, utilizando a equação de Michaelis-Menten.

d) Efeito de diferentes inibidores e substratos fosforilados nas atividades ecto-fosfatásicas

Diferentes inibidores específicos de fosfatases, como levamizol (1 mM), ortovanadato de sódio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM), molibdato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ , 1 mM), tartarato de sódio (10 mM), fluoreto de sódio (NaF, 10 mM) e ácido okadáico (1  $\mu\text{M}$ ) foram testados. Foi ainda avaliado o efeito de um dos produtos da hidrólise de substratos fosforilados, o  $\text{P}_i$ , na concentração de 10 mM. As respectivas atividades fosfatásicas foram determinadas como descrito no Método 1.

e) Atividades ecto-fosfatásicas frente a diferentes substratos fosforilados

A hidrólise, pelas células, de diferentes substratos fosforilados também foi determinada. Substratos na concentração de 5 mM, como *p*-NPP, P-Tir, P-Tre ou P-Ser foram adicionados ao meio de reação e as respectivas atividades fosfatásicas foram determinadas através do método 2. A atividade 3'-nucleotidásica também foi mensurada pelo método 2, utilizando-se como substrato 3'-AMP.

### 3.10. Composição Fosfolipídica

A extração de lipídios foi realizada conforme o método descrito por DE AZEVEDO-MARTINS *et al.* (2007). Parasitos provenientes de culturas nas duas condições de crescimento ( $1,0 \times 10^7$  células), foram solubilizados com 4 mL de  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCl}$  (200:100:0,75 v/v) em tubos cônicos de vidro, agitados, e adicionados a 0,8 mL de HCl 0,6N. Após vigorosa agitação, as fases foram separadas por centrifugação a 800g, por 10 min, a temperatura ambiente. A fase orgânica (fase inferior) foi transferida para um novo tubo e lavada duas vezes com 2,0 mL da mistura contendo  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCl}$  0,6N

(3:48:47 v/v). Ao fim deste procedimento, a fase orgânica foi ajustada ao pH 7,0 com 0,2 N NH<sub>4</sub>OH em metanol. O solvente foi evaporado sob N<sub>2</sub>, e os lipídios estocados a -20°C até o uso.

As amostras de lipídios foram solubilizadas numa mistura com CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (75:25:0,2 v/v) e aplicadas em placas de sílica gel junto com fosfolipídios padrão para cromatografia em camada fina (TLC). As placas foram ativadas a 110°C por 10 min, antes da aplicação das amostras. O cromatograma foi desenvolvido em CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O (120:45:39:36:24 v/v) por 80 min. Os fosfolipídios foram visualizados por exposição a vapores de I<sub>2</sub>.

### 3.11. Microscopia ótica de contraste diferencial interferência

Epimastigotas de *T. rangeli* mantidos em meio LIT padrão ou meio com baixo Pi foram lavados 2x em PBS-v (NaCl 137 mM + KCl 3 mM + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 mM +KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mM + sacarose 46 mM + glicose 10 mM) (FIELD et al, 2004) pH 7,3 e fixados em formaldeído 3,7% em PBS-v por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 2x em PBS-v para remoção do fixador e aderidas em lamínulas revestidas com poli- L-lisina 0,1% em PBS por 15 minutos. As células não aderidas foram removidas após lavagem com PBS.

Os parasitos foram observados no microscópio Axioplan (Zeiss) acoplado a uma câmera digital Hamamatsu color chilled 3000 (C5810).



### 3.12. Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET

As formas epimastigotas de *T. rangeli* foram lavados como descrito acima e ressuspensos e fixados em glutaraldeído 2,5% em solução-tampão contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,2) 100 mM de sacarose e 20 mM de KCl por 1h à temperatura ambiente. Os parasitos foram lavados duas vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,3) para remoção do fixador e pós-fixados numa solução de tetróxido de ósmio 1% com ferrocianeto de potássio 0,8% e CaCl<sub>2</sub> 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,3) por 50 min na ausência de luz. Ao término, o material foi lavado três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,3) e desidratado a temperatura ambiente em séries crescentes de acetona (30, 50, 70, 90, 100%) por 10 min cada. Finalmente, o material foi incluído numa mistura de acetona 100%: epon (1:1) por 48 h e, em seguida, incluído em epon puro por 9 h. Frações do material foram transferidas para formas próprias de inclusão e deixadas numa estufa a 60°C por 48 h para polimerizar.

Os blocos foram então ultramicrotomados e os cortes obtidos foram contrastados numa solução de acetato de uranila 5% em água por 50 min na ausência da luz, lavados em água corrente e contrastados em citrato de chumbo por 5 min. Os cortes foram examinados ao microscópio eletrônico Zeiss 900 operando a 80 kV.

### 3.13. Consumo de oxigênio

Para verificar o consumo de oxigênio por células intactas de *T. rangeli*, utilizamos o método descrito por PEREIRA DA SILVA *et al.* (2008). A taxa de consumo de oxigênio foi mensurada polarograficamente em um oxímetro usando um respirômetro de alta

resolução (OROBOROS Oxygraph-O2K). O eletrodo foi calibrado entre 0 a 100% de saturação com o O<sub>2</sub> atmosférico a 37°C. O meio LIT padrão ou com baixo Pi foi adicionado à câmara, onde ficou por 3-4 min para estabelecer o equilíbrio entre o O<sub>2</sub> dissolvido e o presente na fase gasosa. Logo, foram adicionadas 1,0 x 10<sup>7</sup> células que foram mantidas em meio padrão ou com baixo Pi, previamente lavadas, seguido da adição sequencial de 11 µg oligomicina e 1 µM FCCP para avaliar tanto o estado da fosforilação quanto o acoplamento entre fluxo de elétrons e fosforilação oxidativa.

### 3.14. Análise estatística

Após a fotodocumentação dos géis, as imagens foram digitalizadas e a densitometria das bandas foi realizada através do programa *Scion Image for® Windows*.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e utilizando, pelo menos, três diferentes suspensões celulares. O nível de significância das diferenças entre as médias foi avaliado pelo método de análise estatística do teste t de Student, não pareado. O nível de significância das diferenças entre as duas diferentes condições de crescimento foi avaliado pelo método de análise estatística t de Student pareado.

## 4. RESULTADOS

Em todos os ensaios, foram utilizadas células intactas de *T. rangeli*. Nas condições utilizadas, mais de 95% das células mantiveram sua viabilidade preservada, conforme determinado pelo método de exclusão do azul de Trypan. Além disso, nos testes para fosfohidrolases secretadas, os sobrenadantes (meio de reação sem o substrato) nos quais as células permaneceram durante 60 minutos, não apresentaram atividade fosfatásica (dado não mostrado).

### 4.1. Modulação de atividades ecto-enzimáticas de *T. rangeli* pelo Fosfato Inorgânico Exógeno

As atividades ecto-fosfatásica, ecto-ATPásica e ecto-3'-nucleotidásica do parasito crescido em meios padrão ou com baixo Pi foram determinadas. Verificamos que essas três atividades foram moduladas pela concentração de Pi exógeno. As atividades Ecto-ATPásica e Ecto-3'-nucleotidásica das células mantidas em meio padrão exibiram uma atividade de hidrólise de  $17,63 \pm 4,3$  nmols Pi x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células e de  $9,54 \pm 1,37$  nmols Pi x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células, respectivamente, enquanto as atividades Ecto-ATPásica e Ecto-3'-nucleotidásica das células mantidas em meio com baixo Pi exibiram uma atividade de hidrólise de  $49,53 \pm 3,5$  nmols Pi x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células e de  $17,35 \pm 1,78$  nmols Pi x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células, respectivamente. Entretanto, as células mantidas em meio padrão exibiram uma atividade de hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) de  $5,90 \pm 0,33$  nmols Pi x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células, enquanto esta atividade, nas células mantidas em meio com baixo Pi apresentou uma atividade de hidrólise de  $24,08 \pm 1,27$  nmols Pi x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células (Figura 11).

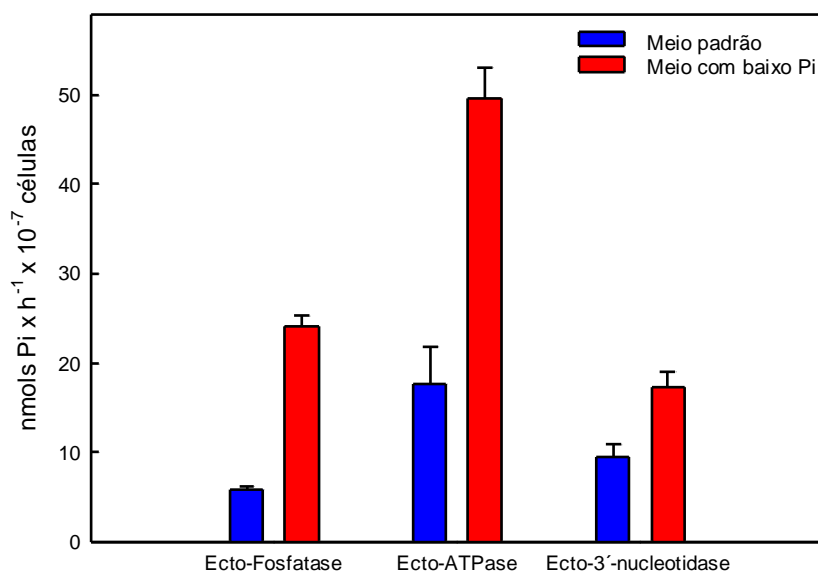


Figura 11. O conteúdo de Pi do meio de cultura pode modular a atividade de ectoenzimas de *T. rangeli*. Parasitas intactos ( $1,0 \times 10^7$  células/mL) mantidos em meio padrão (6 dias de crescimento, barra azul) e em meio com baixo Pi (4 dias de crescimento, barra vermelha) foram incubados no meio de reação contendo 50 mM de tampão Tris (pH 7,2), 20 mM de KCl, 100 mM de sacarose e 5 mM de *p*-NPP (para Ecto-fosfatase), traços de  $[\gamma^{32}\text{P}]$  ATP, 5 mM de  $\text{MgCl}_2$  e 5 mM de ATP (para Ecto-ATPase) ou 5 mM de 3'-AMP (para Ecto-3'-nucleotidase). Os dados representam a média e o erro-padrão obtidos. Meio padrão (50 mM de Pi - barra azul) e meio com baixo Pi (2 mM de Pi - barra vermelha), dosado pelo método de Fiske e Subbarow (FISKE & SUBBAROW, 1925).

#### 4.2. Comparação da atividade ecto-fosfatásica de *T. rangeli* nos meios padrão e com baixo Pi.

O efeito do pH nas atividades ecto-fosfatásicas de *T. rangeli* foi avaliado (Figura 12). Como pode ser observado, o pH foi incapaz de modular a atividade ecto-fosfatásica quando os parasitos foram crescidos no meio padrão. Entretanto, a atividade ecto-fosfatásica das células mantidas em meio com baixo Pi apresentou uma atividade de hidrólise do substrato maior quando em pH ácido. Em pH 6,0, a atividade foi de  $27,89 \pm$

1,93 nmols  $\rho$ -NP x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células, enquanto a pH alcalino, essa atividade caiu para 16,43 ± 1,36 nmols  $\rho$ -NP x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células.

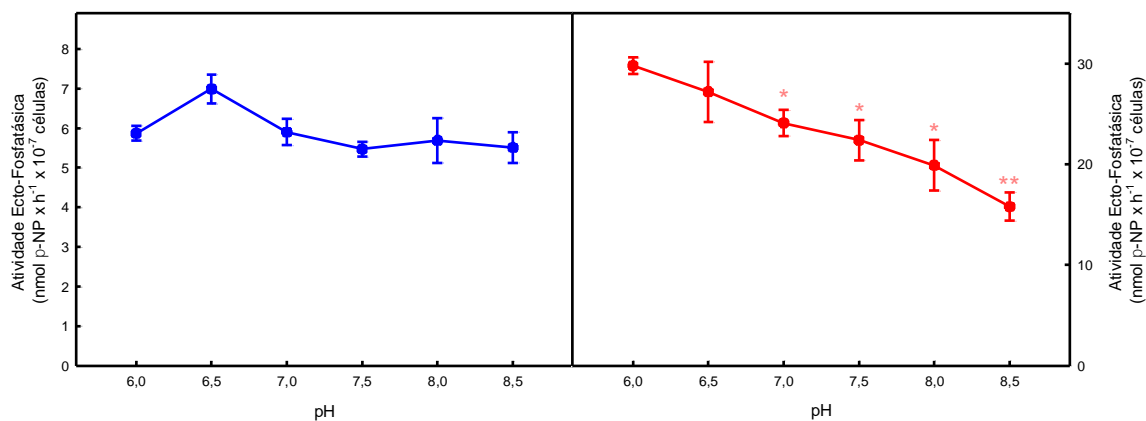


Figura 12. Efeitos de diferentes faixas de pH na atividade Ecto-Fosfatásica de *T. rangelli*. Epimastigotas intactos mantidos em meios padrão (símbolo azul) ou baixo Pi (símbolo vermelho) foram usados para determinar a atividade ecto-fosfatásica como descrito anteriormente, com pH variando de 6,0 a 8,0, ajustado com HCl 1,0 N. (\* = p < 0,05; \*\* = p < 0,001 em relação ao controle).

A atividade ecto-fosfatásica, em ambas as condições de crescimento, mostrou-se insensível à adição de EDTA e EGTA. Os íons metálicos divalentes Mn<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup> e Cu<sup>+2</sup> também não foram capazes de modular as atividades nas duas condições de crescimento. A atividade ecto-fosfatásica das células mantidas em meio padrão se mostrou estimulada pelo íon Mg<sup>+2</sup> e não foi modulada pelo íon Zn<sup>+2</sup>. A atividade ecto-fosfatásica das células mantidas em meio com baixo Pi mostrou-se insensível ao íon Mg<sup>+2</sup>, e inibida pelo íon Zn<sup>+2</sup> (Figura 13).

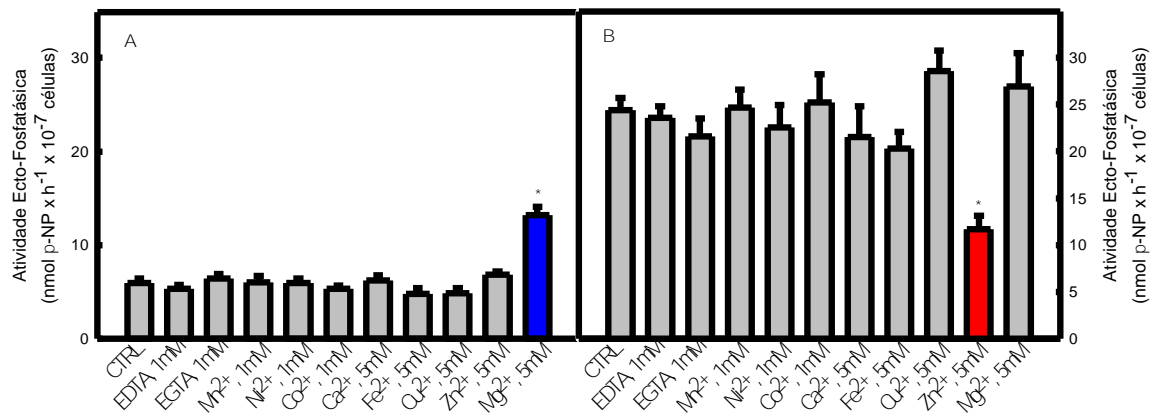


Figura 13. Efeito dos íons metálicos na atividade ecto-fosfatásica de *T. rangeli*. Epimastigotas intactos mantidos nos meios padrão (painel A) ou baixo Pi (painel B) foram usados para determinar as atividades ecto-fosfatásicas como descrito anteriormente. Sais metálicos foram adicionados, com concentração final de 5 mM ou 1 mM (de acordo com as legendas abaixo das barras) ou EDTA e EGTA (como mostram as barras) com concentração final de 1 mM. As barras representam a atividade ecto-fosfatásica medida na presença de cada metal, de EDTA ou de EGTA (\* =  $p < 0,05$  em relação ao controle).

Em relação à cinética de hidrólise do substrato, a atividade ecto-fosfatásica das células crescidas em meio padrão apresentou um  $K_m$  para  $\rho$ -NPP igual a  $2,00 \pm 0,16$  mM  $\rho$ -NPP, e um  $V_{max}$  igual a  $9,93 \pm 0,23$  nmol  $\rho$ -NP x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células (Figura 14). Entretanto, a atividade ecto-fosfatásica das formas epimastigotas de *T. rangeli* crescidas em meio com baixo Pi apresentaram duas afinidade aparente: a primeira com um  $K_m$  para  $\rho$ -NPP igual a  $0,016 \pm 0,0095$  mM  $\rho$ -NPP e  $V_{max}$  igual a  $9,75 \pm 1,43$  nmol  $\rho$ -NP x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células, e a segunda com um  $K_m$  para  $\rho$ -NPP igual a  $1,86 \pm 0,57$  mM  $\rho$ -NPP e  $V_{max}$  igual a  $17,49 \pm 1,19$  nmol  $\rho$ -NP x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células (Figura 15).

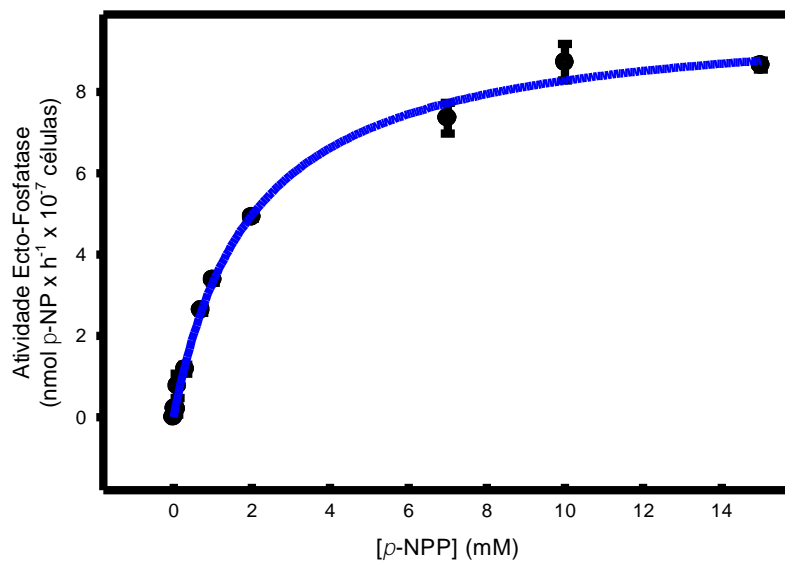


Figura 14. Dependência da concentração de *p*-NPP para a atividade Ecto-Fosfatásica de *T. rangeli* mantidos em meio padrão. Epimastigotas intactos mantidos em meio padrão foram usados para determinar a atividade ecto-fosfatásica como descrito anteriormente, com concentrações de substrato variando de 0,05 a 20 mM. Foi verificado um valor de  $K_m$  para *p*-NPP igual a  $2,00 \pm 0,16$  mM *p*-NPP e um valor de  $V_{max}$  igual a  $9,93 \pm 0,23$  nmol *p*-NP x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células.

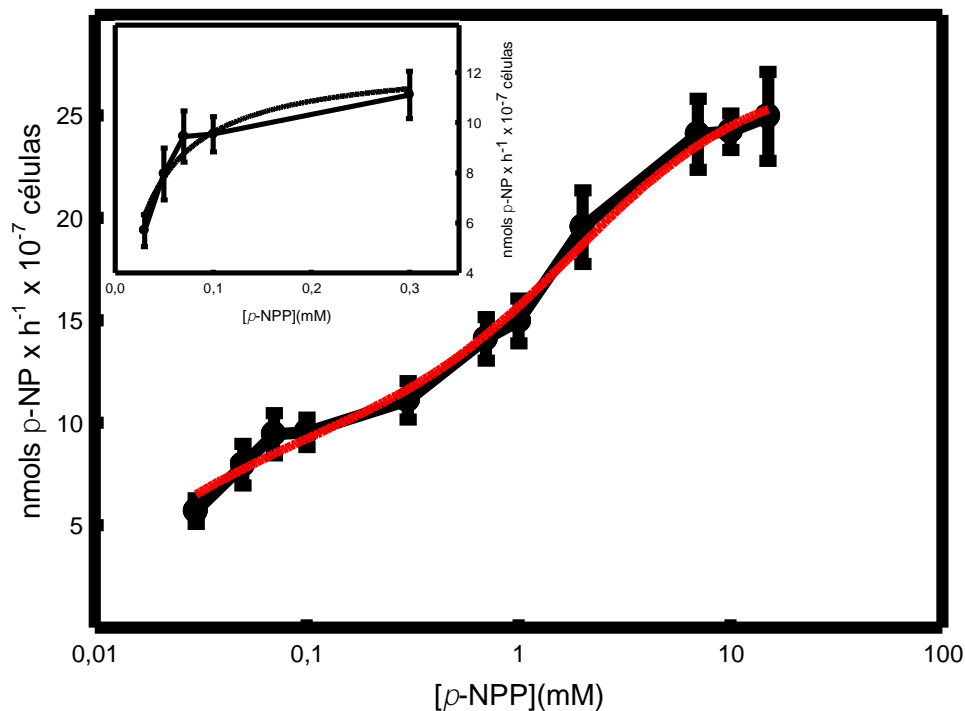


Figura 15. Dependência da concentração de  $p$ -NPP para a atividade Ecto-Fosfatásica de *T. rangeli* mantidos em meio com baixo Pi. Epimastigotas intactos mantidos em meio com baixo Pi foram usados para determinar a atividade ecto-fosfatásica, como descrito anteriormente, com concentrações de substrato variando de 0,05 a 20 mM. Na primeira afinidade foi verificado um valor de  $K_m$  para  $p$ -NPP igual a  $0,016 \pm 0,0095$  mM  $p$ -NPP e  $V_{max}$  igual a  $9,75 \pm 1,43$  nmol  $p$ -NP  $\times h^{-1} \times 10^{-7}$  células. Já a segunda afinidade, apresenta um  $K_m$  para  $p$ -NPP igual a  $1,86 \pm 0,57$  mM  $p$ -NPP e  $V_{max}$  igual a  $17,49 \pm 1,19$  nmol  $p$ -NP  $\times h^{-1} \times 10^{-7}$  células. Inset: Primeiro sítio ampliado.

As atividades ecto-fosfatásicas foram ensaiadas utilizando diferentes inibidores de fosfatasas (Tabela 3). As atividades ecto-fosfatásicas das células crescidas em meio padrão e baixo Pi, mostraram-se insensíveis à adição de levamisol e de tartarato de sódio. A adição de fluoreto de sódio inibiu ambas atividades, sendo que a atividade ecto-fosfatásica das células crescidas no meio com baixo Pi mostrou maior sensibilidade à inibição (74,9% de inibição em relação ao controle) do que a atividade das células mantidas em meio padrão (44,2% de inibição em relação ao controle). A adição de ortovanadato de sódio também inibiu ambas atividades, sendo que a atividade ecto-fosfatásica das células crescidas no



meio padrão mostrou maior sensibilidade à inibição (83,1% de inibição em relação ao controle) que a atividade das células mantidas em meio com baixo Pi (75,7% de inibição em relação ao controle). A adição de ácido okadáico foi capaz de inibir a atividade ecto-fosfatásica do meio com baixo Pi (36,6% de inibição para ácido okadáico).

[Inibidor] (mM)	Atividade Ecto-Fosfatásica (% do controle)	
	Meio padrão	Meio com baixo Pi
Controle	100,0 ± 8,0	100,0 ± 8,0
Levamisol, 1 mM	100,7 ± 3,9	94,6 ± 4,9
Tartarato, 10 mM	91,5 ± 5,8	96,8 ± 9,4
Vanadato, 1 mM	**16,9 ± 2,9#	**24,3 ± 2,6#
Fluoreto de Sódio, 10 mM	**55,8 ± 5,3##	**25,1 ± 3,3##
Molibdato, 1 mM	**23,6 ± 2,3#	**44,6 ± 3,5#
Pi, 10 mM	*51,7 ± 3,2	**37,4 ± 6,1
Ácido Okadáico, 1 µM	117,2 ± 4,1#	*63,4 ± 7,1#

Tabela 2. Efeito de inibidores de fosfatases na atividade ecto-fosfatásica de *T. rangeli*. Epimastigotas intactos mantidos nos meios padrão ou com baixo Pi foram usados para determinar as atividades ecto-fosfatásicas, como descrito anteriormente, com a adição de inibidores de fosfatases nas concentrações indicadas na tabela. \* =  $p < 0,05$  e \*\* =  $p < 0,001$  em relação ao controle; # =  $p < 0,05$  e ## =  $p < 0,001$  comparando as duas atividades.

A atividade ecto-fosfatásica das células crescidas em meio padrão foi capaz de hidrolisar fosfoserina, fosfotreonina e fosfotirosina praticamente na mesma velocidade. A atividade ecto-fosfatásica das células crescidas em meio com baixo Pi, no entanto, mostrou uma hidrólise preferencial de fosfotreonina e fosfoserina, apresentando valores de hidrólise de  $9,10 \pm 0,60$  nmoles Pi x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células e de  $12,20 \pm 0,90$  nmoles Pi x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células, respectivamente (Figura 16).

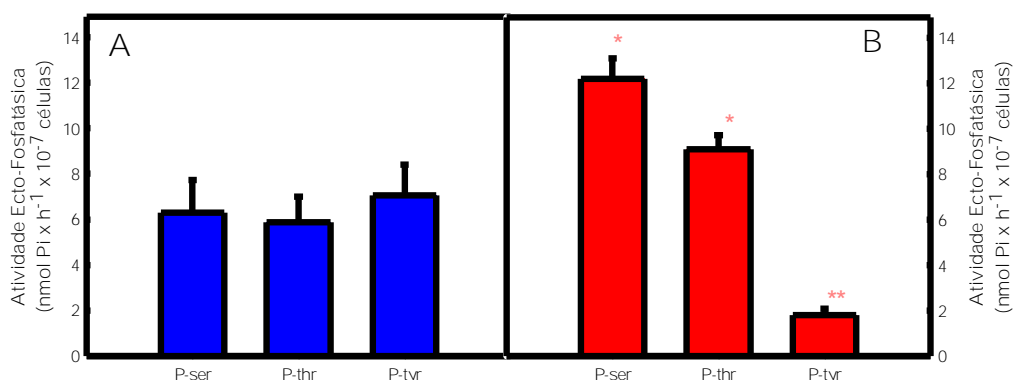


Figura 16. Hidrólise de Fosfoaminoácidos pela Ecto-fosfatase de *T. rangeli*. Epimastigotas intactos, mantidos em meios padrão (painel A, barras azuis) ou baixo Pi (painel B, barras vermelhas), foram usados para determinar a atividade ecto-fosfatásica como descrito anteriormente, utilizando como substrato 5 mM de Fosfoserina (P-ser), Fosfotreonina (P-thr) ou Fosfotirosina (P-tyr).

O curso temporal das atividades ecto-fosfatásicas ao longo dos dias de crescimento mostrou que tais atividades das células crescidas em meio padrão se apresentaram maiores nas primeiras horas de crescimento do parasito, com atividade de hidrólise do substrato de  $64,38 \pm 9,68$  nmoles  $\rho$ -NP x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células, e decresceram a partir de então, alcançando a atividade de  $3,60 \pm 0,62$  nmoles  $\rho$ -NP x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células no sexto dia de cultura (Figura 17). Já na atividade ecto-fosfatásica das células crescidas em meio com baixo Pi, encontrou-se um aumento da atividade ecto-fosfatásica, onde no primeiro dia de cultura apresenta-se o valor de hidrólise do substrato de  $17,97 \pm 0,27$  nmoles  $\rho$ -NP x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células, havendo posteriormente um aumento da capacidade de hidrólise, onde se observou uma hidrólise do substrato de  $38,60 \pm 1,20$  nmoles  $\rho$ -NP x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células no terceiro dia de proliferação celular, e a partir daí passamos a se observar uma diminuição da atividade ecto-fosfatásica (Figura 18).

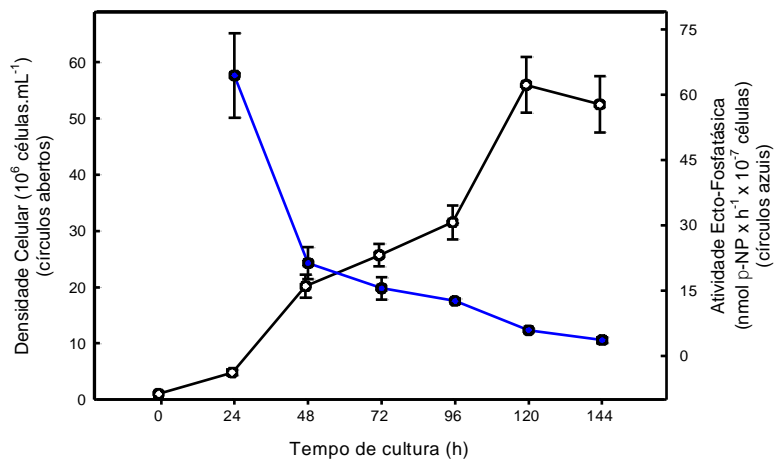


Figura 17. Atividades Ecto-Fosfatásicas de *T. rangeli* medidas ao longo do crescimento do parasito em meio padrão. Círculos abertos: a curva de crescimento foi iniciada com  $1 \times 10^6$  células/mL e a densidade celular foi estimada a cada 24 h durante 5 dias em um hemocitômetro. Somente células viáveis foram quantificadas. Círculos azuis: As atividades ecto-fosfatásicas de células coletadas ao longo dos dias de crescimento foram medidas incubando-se as células nas mesmas condições descritas na legenda da figura 12. Em ambos ensaios, as reações a cada dia foram disparadas com concentrações de células iguais às do primeiro dia de cultivo.

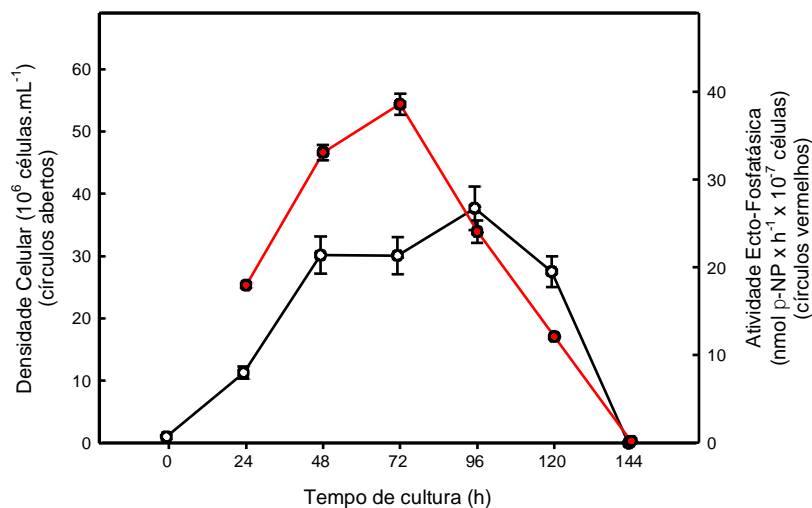


Figura 18. Atividades Ecto-Fosfatásicas de *T. rangeli* medidas ao longo do crescimento do parasito em meio com baixo Pi. Círculos abertos: a curva de crescimento foi iniciada com  $1 \times 10^6$  células/mL e a densidade celular foi estimada a cada 24h durante 5 dias em um hemocitômetro. Somente células viáveis foram quantificadas. Círculos vermelhos: As atividades ecto-fosfatásicas de células coletadas ao longo dos dias de crescimento foram medidas incubando-se as células nas mesmas condições descritas na legenda da figura 12.

#### 4.3. A depleção de Pi do meio de cultura inibe a proliferação celular

As células crescidas em meio padrão exibiram uma curva de crescimento bastante característica, alcançando sua fase estacionária por volta do sexto dia de cultura. Todavia, no meio com baixo Pi, a curva de crescimento mostrou-se idêntica àquela no meio padrão até o quarto dia de cultura, iniciando-se o processo de morte celular até que, no sexto dia, não havia mais células viáveis. A adição de Pi exógeno no quarto dia de proliferação das células crescidas em meio com baixo Pi levou a uma proliferação destas células comparável à proliferação das células crescidas em meio com alto Pi (Figura 19).

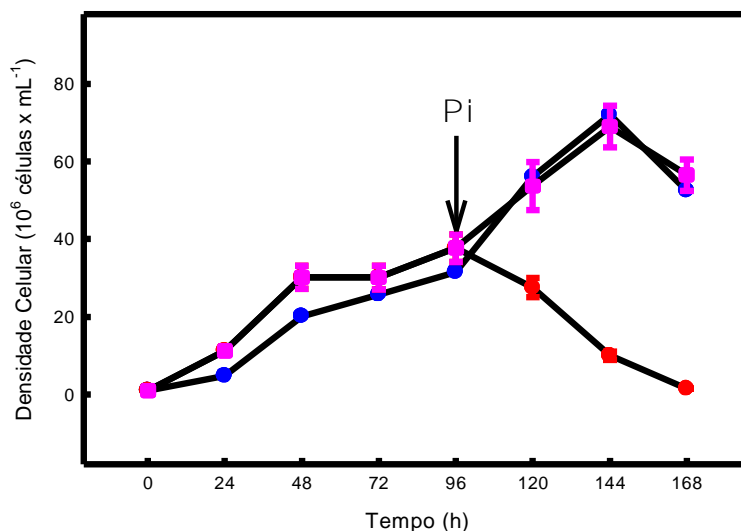


Figura 19. Influência do conteúdo de Pi na proliferação de *T. rangeli*. A curva de crescimento foi iniciada com  $1 \times 10^6$  células/mL e a densidade celular foi estimada a cada 24 h durante 7 dias em um hemocitômetro. Somente células viáveis foram quantificadas. Os parasitos foram crescidos em meio padrão (símbolos azuis) ou baixo Pi (símbolos vermelhos), e ainda em meio com baixo Pi que recebeu uma adição de Pi (50 mM) no quarto dia de proliferação (símbolos rosa). Os dados representam a média e o erro-padrão obtidos de quatro experimentos realizados em triplicata com diferentes suspensões celulares.

As células crescidas em meio padrão apresentaram-se sob forma epimastigota característica de células de *T. rangeli*, apresentando corpo celular alongado, com um flagelo emergindo da bolsa flagelar, localizada na porção apical do parasito. As células crescidas em meio com baixo Pi apresentavam-se sob forma esférica, podendo apresentar mais de um flagelo, e com baixa motilidade (Figura 20). Testes de viabilidade demonstram que as células em questão estavam viáveis.

Os parasitos mantidos em meio padrão de crescimento (Figura 21) ou em meio com baixo Pi (Figura 22) apresentaram ultraestrutura semelhante. As principais organelas apresentam-se íntegras.

Figura 20. Microscopia ótica de contraste diferencial interferencial de epimastigotas de *T. rangeli*. (A-D) Células em fase estacionária (144h) crescidas em meio LIT padrão apresentando seu aspecto piriforme característico. (E-H) Células em fase estacionária (96h) cultivadas em meio com baixa concentração de Pi. Note o arredondamento dos parasitos em todos os exemplos mostrados (seta), assim como a presença de 1 a 3 flagelos (cabeça de seta) representado na figura H.

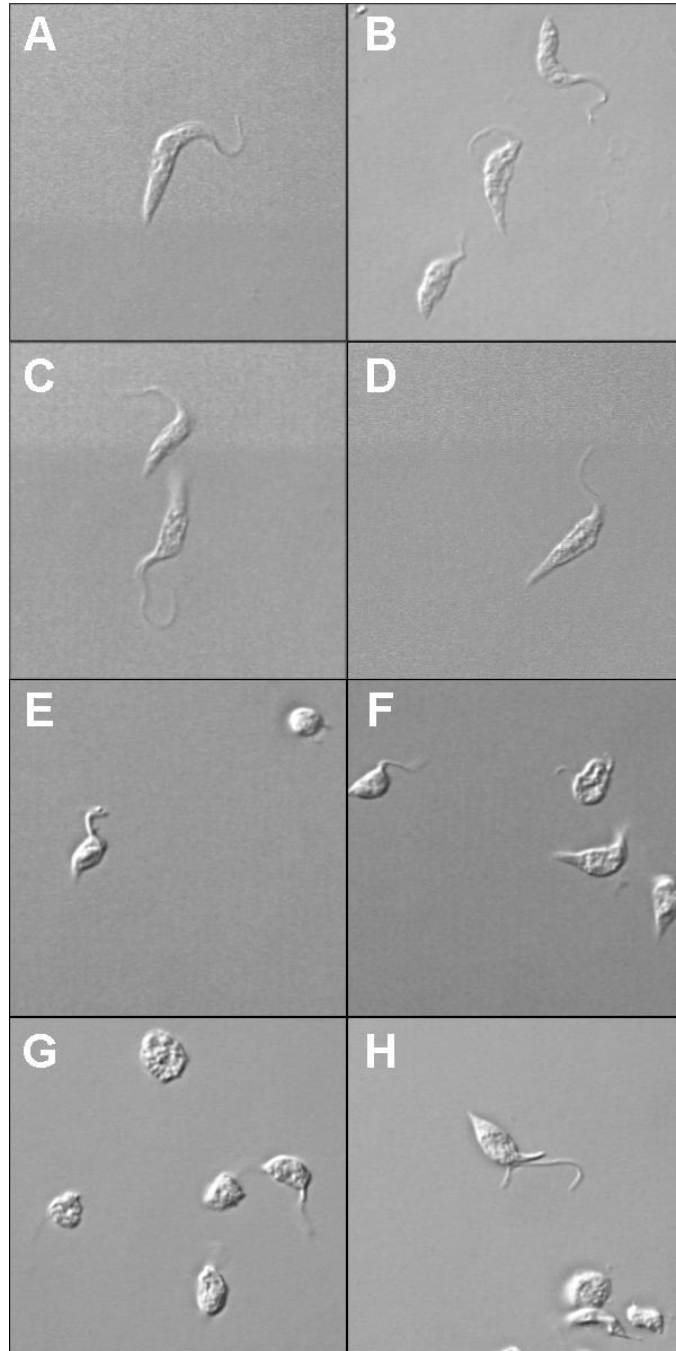


Figura 21. Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* cultivados em meio LIT padrão. (A, B) Corte longitudinal de uma forma epimastigota apresentando núcleo (N), cinetoplasto (K) e acidocalcisoma (A) na região anterior do parasito, mitocôndria (M) e porções do retículo endoplásmico (R). Em (C), o parasito aparece com dois núcleos, provavelmente num processo de divisão celular. A seta aponta para uma crista mitocondrial. Barras: 1  $\mu$ m.



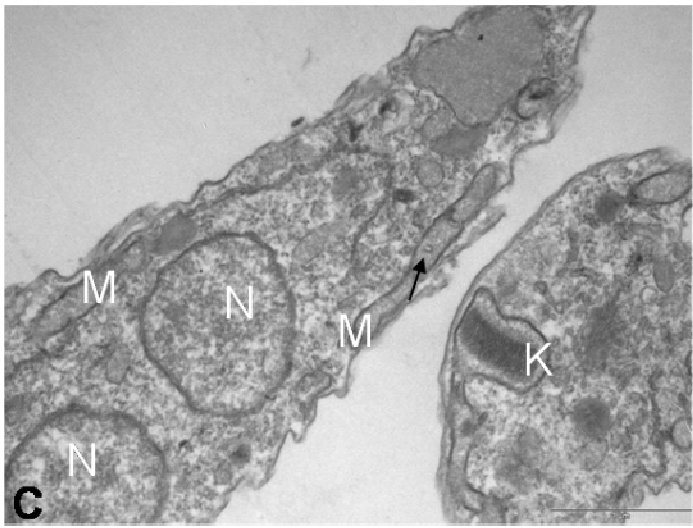
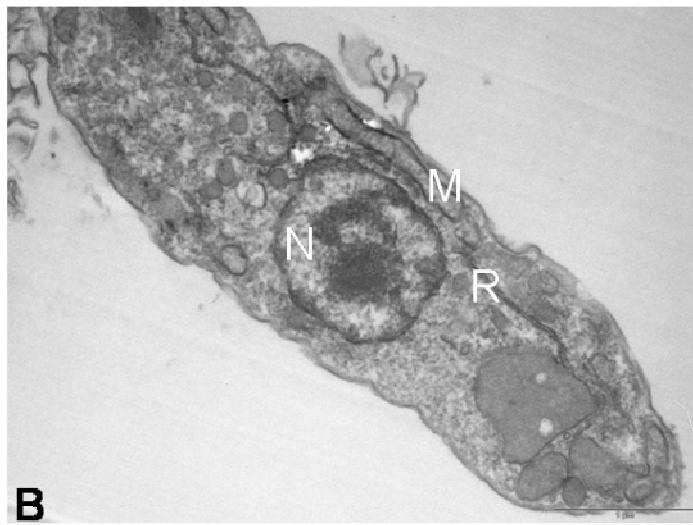
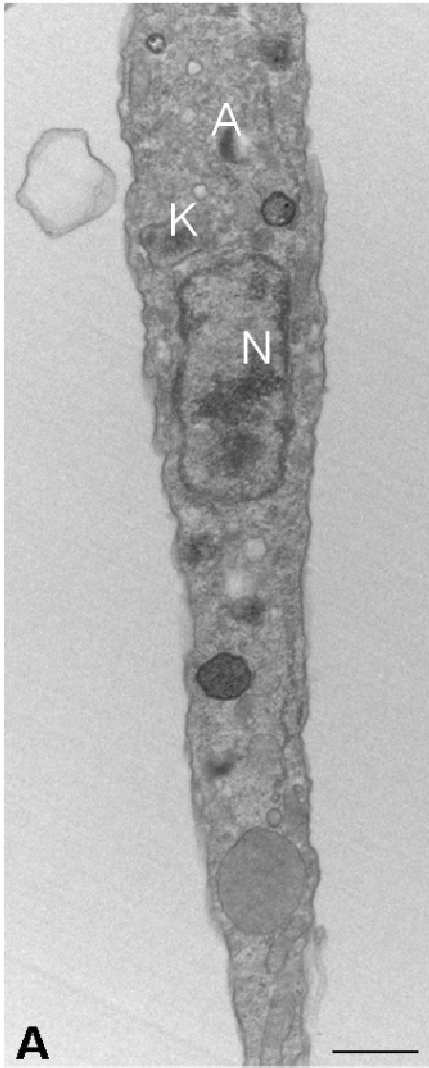
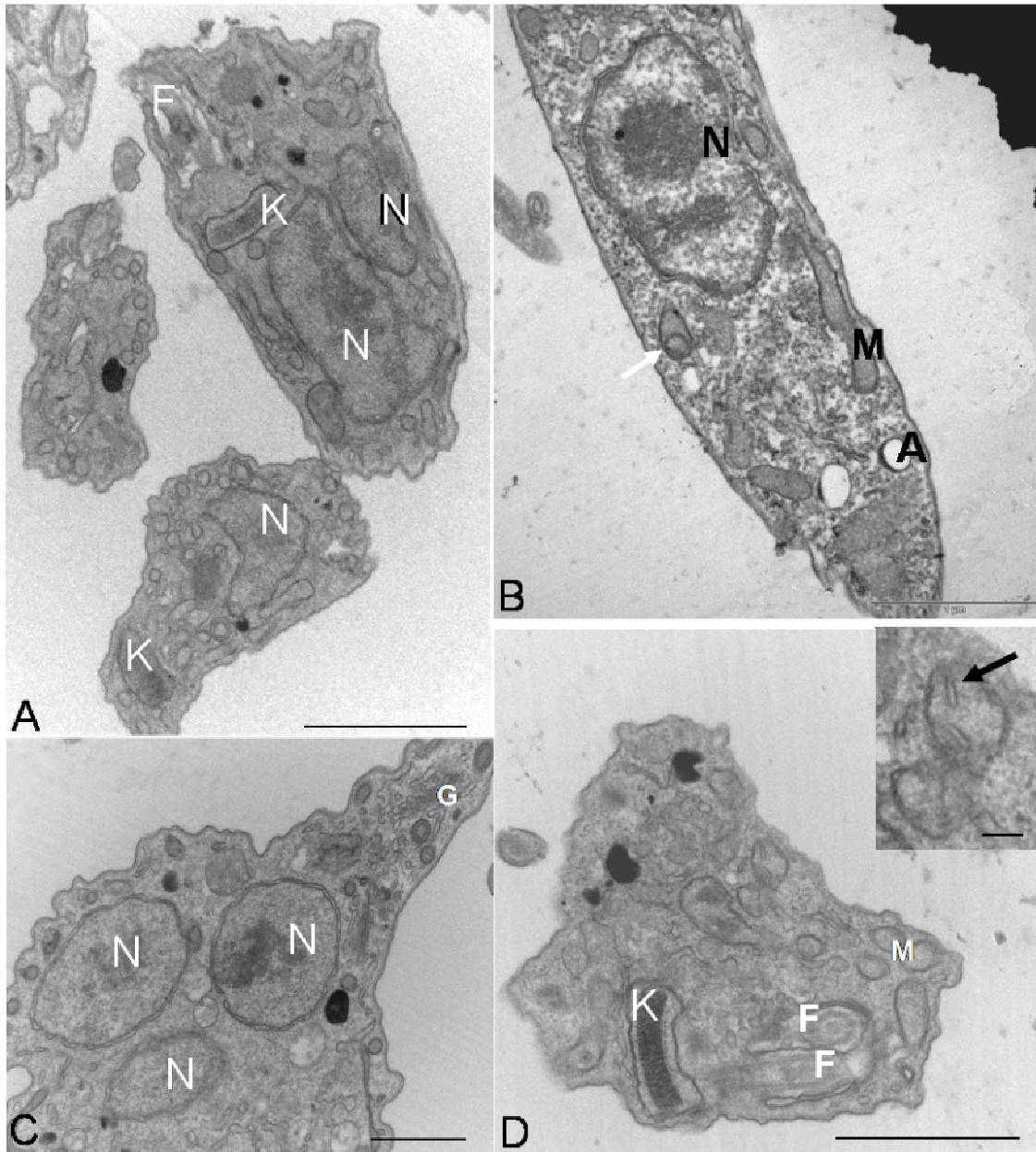


Figura 22. Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* cultivados em meio LIT com baixo Pi. (A) Corte transversal de um epimastigota mostrando o parasito, com 2 núcleos. Em (B) e (D), é possível observar os aspectos ultra-estruturais da mitocôndria (M) preservados, assim como a presença de dois flagelos (F). *Inset*: imagem em grande aumento de uma mitocôndria onde as cristas são evidentes (seta). (C) Corte transversal do epimastigota apresentando 3 núcleos (N). (K) cinetoplasto, (G) Complexo de Golgi e (A) acidocalcisoma. Barras: 1µm.



Quanto ao consumo de oxigênio, as epimastigotas de *T. rangeli* mantidos em meios padrão ou com baixo Pi apresentaram capacidade respiratória semelhante, com resposta à oligomicina e FCCP de forma semelhante (Figura 23).

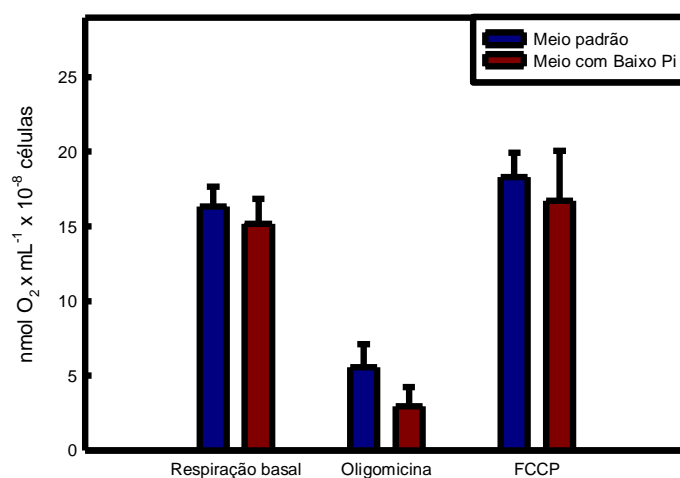


Figura 23: Taxas de consumo de oxigênio de *T. rangeli* mantidos em meios padrão (barras azuis) ou baixo Pi (barras vermelhas). As células foram cultivadas em meios padrão (barras azuis) ou com baixo Pi (barras vermelhas). Respiração basal é o consumo de oxigênio basal de células intactas, mostrando não haver diferenças significativas entre as duas condições de cultivo. Na presença de 12 µg/mL de oligomicina, existe uma inibição do consumo de oxigênio. O último grupo de barras representa a uma adição do desacoplador da cadeia de elétrons, 0,5 uM de FCCP. n = 3.

Quando analisamos o perfil da composição lipídica das células de *T. rangeli*, há uma diminuição de três principais fosfolipídios, fosfatidiletalona (PE), fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilinositol (PI) nas células crescidas em meio com baixo Pi, quando comparadas àquelas células crescidas em meio com alto Pi (Figura 24).

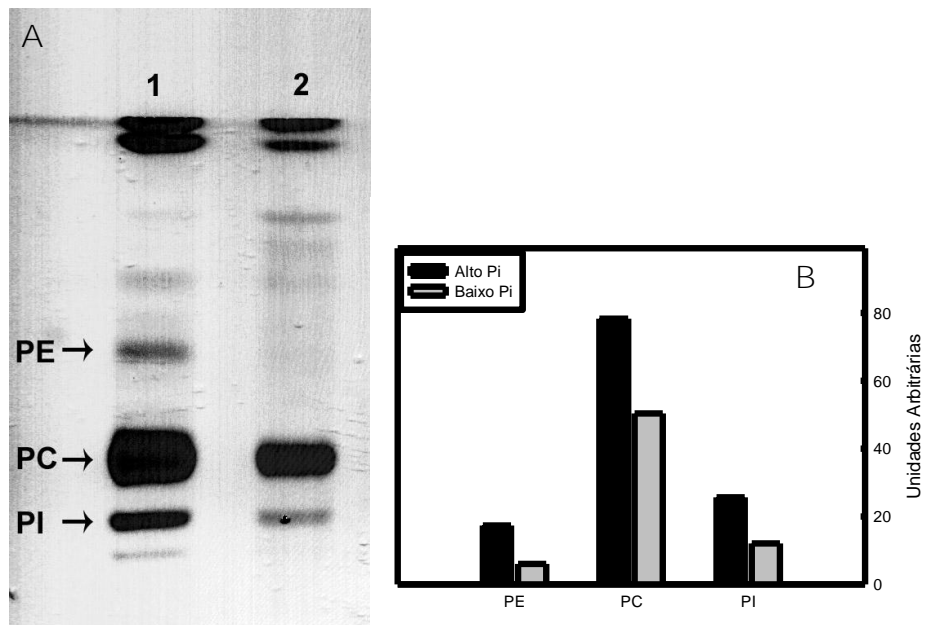


Figura 24: Composição fosfolipídica total de *T. rangeli* mantidos em meios padrão (lane 1) ou baixo Pi (lane 2). Células epimastigostas de *T. rangeli* ( $1,0 \times 10^7$  células) foram submetidas à extração de fosfolipídios, conforme descrito no item 3.11 do Material e Métodos. Após, os fosfolipídios e padrões foram aplicados em placa de cromatografia fina (TLC) e revelados em vapor de  $I_2$  (painel A). Painel B: Densitometria das bandas de fosfolipídios obtidas. PE – fosfatidiletanolamina; PC – fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol.

## 5. DISCUSSÃO

O fosfato inorgânico (Pi) é um nutriente essencial para um grande número de funções celulares e, em consequência, para a vida. Este nutriente constitui parte de diferentes biomoléculas, tais como lipídios, ácidos nucléicos, proteínas e açúcares, e ainda está envolvido em muitas reações bioquímicas relacionadas com a transferência do grupamento fosforil (TORRIANI, 1990; AUESUKAREE *et al.*, 2004; LAMARCHE *et al.*, 2008). Devido à baixa disponibilidade deste nutriente em diversos ecossistemas, o Pi caracteriza-se por ser um composto limitante do crescimento de vários organismos (TASAKI *et al.*, 2002).

Nós demonstramos que o *T. rangeli* apresenta uma alta dependência pelo Pi do meio de cultura para a proliferação celular, visto que as células crescidas em meio com baixa concentração de Pi apresentaram uma proliferação bastante comprometida, não sustentando o crescimento após o quarto dia de proliferação e, a partir desse momento, ocorrendo o processo de morte celular. Além disso, verificamos que o Pi adicionado depois de certo tempo ao meio de cultura depletado de Pi, foi capaz de reverter o processo de morte celular ocasionado pela falta desse nutriente, reforçando a idéia da dependência do Pi para a proliferação celular do *T. rangeli*. Dessa forma, seria importante que estes parasitos fossem capazes de responder à depleção de Pi exógeno, expressando proteínas fosfatases e transportadores de fosfato, a fim de aumentar o Pi disponível e internalizá-lo para utilização dessas células. Frente a condições com baixo Pi, a maior parte de plantas e microorganismos desenvolveram mecanismos adaptativos. Em *Saccharomyces cerevisiae*, o mecanismo adaptativo foi denominado de sistema *PHO*, que constitui uma família de

genes e reguladores, incluindo genes que codificam proteínas fosfatases e transportadores de Pi com alta afinidade (OSHIMA, 1997).

Uma vez demonstrada a dependência ao Pi para a proliferação celular de *T. rangeli*, nos preocupamos em verificar quais alterações enzimáticas estariam relacionadas com esse processo, visto que mesmo com a depleção de Pi levando à morte celular, até o quarto dia de cultura o parasito conseguia sustentar uma proliferação bastante semelhante àquelas células crescidas em meio LIT padrão.

No organismo do hospedeiro, é de suma importância que o parasita perceba estímulos ambientais e seja capaz de responder aos mesmos, sendo portanto a superfície celular um elemento diretamente envolvido em trocar informações com o meio. Neste contexto, proteínas inseridas na membrana celular, e com o sítio catalítico voltado para o meio externo à célula, como as ecto-fosfatases, as quais apresentam capacidade de hidrolisar fosfomonoésteres e fosfoproteínas (BERNARD *et al.*, 2002), poderiam desempenhar vários papéis. As ecto-fosfatases têm sido caracterizadas em diversos protozoários como *Leishmania sp.* (GOTTLIEB & DWYER, 1981; DE ALMEIDA-AMARAL *et al.*, 2006), *T. cruzi* (FURUYA *et al.*, 1998; MEYER-FERNANDES *et al.*, 1999), *T. brucei* (FERNANDES *et al.*, 1997), *T. rangeli* (GOMES *et al.*, 2006; FONSECA-DE-SOUZA *et al.*, 2008), *Crithidia deanei* (DOS PASSOS LEMOS *et al.*, 2002), *Entamoeba histolytica* (DE SÁ PINHEIRO *et al.*, 2007), *Trichomonas vaginalis* (DE JESUS *et al.*, 2002) e *Tritrichomonas foetus* (DE JESUS *et al.*, 2006). Quanto à função, as ecto-fosfatases podem desempenhar diversos papéis, tais como nutrição, capacitando a célula a obter nutrientes de que necessita, a partir do fosfato inorgânico, e adesão do parasita à célula hospedeira, conforme já descrito em *Leishmania donovani* (KATAKURA & KOBAYASHI, 1988; SINGLA *et al.*, 1992).

Neste trabalho, nós verificamos que a depleção de Pi do meio de cultura levou a uma modulação da atividade de três ecto-enzimas de superfície de *T. rangeli*: ecto-ATPase (FONSECA *et al.*, 2006), ecto-fosfatase (GOMES *et al.*, 2006; FONSECA-DE-SOUZA *et al.*, 2008) e ecto-3'-nucleotidase. Para mensurar as atividades ecto-enzimáticas de *T. rangeli*, utilizamos células do sexto dia de proliferação daquelas epimastigotas crescidas em meio padrão, e células do quarto dia de proliferação daquelas epimastigotas crescidas em meio com baixo Pi, garantindo desta forma que fossem utilizadas células da fase estacionária de crescimento. Verificamos, assim, que a depleção de Pi levou a um aumento de duas, três e cinco vezes das atividades ecto-3'-nucleotidásica, ecto-ATPásica e ecto-fosfatásica, respectivamente (Figura 11).

A atividade ecto-fosfatásica se mostrou mais responsiva à depleção de Pi e, em virtude disto, no presente trabalho nós enfocamos o estudo desta atividade enzimática em células crescidas com alto ou baixo Pi no meio de cultura. Assim, observamos que houve uma expressão diferenciada da atividade ecto-fosfatase de *T. rangeli* frente à depleção de Pi, utilizando a comparação de parâmetros bioquímicos dessas atividades nas células crescidas em meio padrão ou baixo Pi.

Em células de tomate, foi verificado que a depleção de Pi leva a indução da expressão do gene *LePS2;1*, que codifica uma proteína fosfatase sensível ao ácido okadáico. Esta fosfatase, expressa apenas em meio depletado de Pi exógeno, é pertencente à super família das halodesidrogenases ácidas (HAD, do inglês *halo acid dehydrogenase*), capaz de hidrolisar ligações C-Cl, C-OP e C-P de uma ampla gama de substratos (BALDWIN *et al.*, 2008).

Verificamos que, em ambas as condições de crescimento, o sobrenadante das células de *T. rangeli* não foi capaz de hidrolisar o *p*-NPP (dado não mostrado). Esses



resultados excluíram a possibilidade da contribuição de enzimas intracelulares e/ou secretadas nas atividades enzimáticas encontradas, indicando que os resultados obtidos corresponderam a fosfatases localizadas na superfície externa de *T. rangeli*. Entretanto, nossos experimentos não descartaram a possibilidade de que a secreção de fosfatase (s) seja, *in vivo*, modulada por contato com células hospedeiras, como foi sugerido para *Yersinia sp.* (BLISKA *et al.*, 1993), ou que ocorra durante o crescimento celular conforme descrito para outros organismos (VÖGEL & HINNEN, 1990; HAN *et al.*, 1992; JOLIVIET *et al.*, 1998).

Células epimastigotas intactas crescidas em meio padrão foram capazes de hidrolisar o substrato artificial para fosfatases *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) ( $5,90 \pm 0,33$  nmol *p*-NP x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células). Já as células epimastigotas intactas crescidas em meio com baixo Pi apresentaram um aumento na capacidade de hidrolisar o *p*-NPP, sendo este aumento de quase cinco vezes em relação à primeira condição de crescimento ( $24,08 \pm 1,27$  nmol *p*-NP x h<sup>-1</sup> x 10<sup>-7</sup> células). Assim, nos propusemos a avaliar se essa modulação da atividade ecto-fosfatásica de *T. rangeli* seria devido apenas a um aumento da atividade da enzima já presente na membrana, ou se a depleção de Pi levaria a uma expressão diferenciada da atividade ecto-fosfatase do parasito. Para tanto, comparamos parâmetros bioquímicos das atividades ecto-fosfatásicas das células crescidas em meio padrão ou baixo Pi.

A atividade ecto-fosfatásica de *T. rangeli* mantido em meio padrão se mostrou estimulada por MgCl<sub>2</sub>, como já caracterizado por nós para este parasito (FONSECA-DE-SOUZA *et al.*, 2008). Outros metais não surtiram qualquer efeito nesta atividade, e a adição de EDTA ou EGTA, quelantes de metais divalentes, também não alterou a atividade

fosfatásica, indicando que o meio de reação utilizado estava livre de contaminantes metálicos (Figura 13). A estimulação de atividade fosfatásica por metais tem sido bem documentada (SINGH, 1990; CAI *et al.*, 1995; WERA e HEMMINGS, 1995; FJELD e DENU, 1999; PEERAER *et al.*, 2004). Entretanto, quando os parasitos foram mantidos em meio com baixo Pi, a atividade ecto-fosfatásica mostrou-se insensível ao íon  $Mg^{+2}$ , indicando que essa atividade perdeu sua estimulação pelo íon  $Mg^{+2}$ . Essa atividade, entretanto, se mostrou inibida pelo íon  $Zn^{+2}$ , reforçando a idéia de que essas duas atividades ecto-fosfatásicas poderiam apresentar sítios de ligação a metais distintos.

A dependência da concentração de  $p$ -NPP mostrou uma cinética de Michaelis-Menten normal para a atividade ecto-fosfatásica daquelas células crescidas em meio padrão, sendo os valores de  $V_{máx}$  e  $K_m$  para o  $p$ -NPP de  $9,93 \pm 0,25 \text{ nmol } p\text{-NPP} \times \text{h}^{-1} \times 10^{-7}$  células e  $2,00 \pm 0,16 \text{ mM } p\text{-NP}$ , respectivamente (Figura 14). Entretanto, a dependência da concentração de  $p$ -NPP para a atividade ecto-fosfatásica das células crescidas em meio com baixo Pi mostrou uma cinética bifásica, apresentando dois valores de  $V_{máx}$  e  $K_m$  para o  $p$ -NPP, com um primeiro sítio com altíssima afinidade pelo substrato, apresentando os valores de  $V_{máx}$  e  $K_m$  para o  $p$ -NPP de  $0,016 \pm 0,0095 \text{ mM } p\text{-NPP}$  e  $9,75 \pm 1,43 \text{ nmol } p\text{-NP} \times \text{h}^{-1} \times 10^{-7}$  células, respectivamente, enquanto o segundo sítio apresentou os valores de  $V_{máx}$  e  $K_m$  para o  $p$ -NPP de  $1,86 \pm 0,57 \text{ mM } p\text{-NPP}$  e  $17,49 \pm 1,19 \text{ nmol } p\text{-NP} \times \text{h}^{-1} \times 10^{-7}$  células, respectivamente (Figura 15). O fato da dependência da concentração do substrato na atividade ecto-fosfatásica das células crescidas em meio com baixo Pi mostrar-se como uma curva cinética com dois sítios catalíticos, sugeriu que pode se tratar de uma enzima alostérica presente nestas células, com a presença de pelo menos dois centros catalíticos, ou

então, a presença de pelo menos duas enzimas que utilizam o  $\rho$ -NPP como substrato, uma com alta afinidade e outra com menor afinidade por este substrato.

Diferentes inibidores de fosfatases foram testados, e os resultados estão mostrados na tabela 3. Levamizol, um inibidor clássico de fosfatase alcalina (VAN BELLE, 1972), não foi capaz de inibir as atividades ecto-fosfatásicas, excluindo assim a possibilidade de haver a contribuição de alguma atividade fosfatásica alcalina na hidrólise do substrato  $\rho$ -NPP. Da mesma forma, tartarato de sódio, um inibidor de atividade fosfatase secretada, não alterou as atividades ecto-fosfatásicas, confirmando a ectolocalização, ou seja, a hidrólise de  $\rho$ -NPP não foi resultado de enzimas solúveis secretadas ou de células lisadas pelas condições utilizadas.

Frente ao pH do meio de reação, a atividade ecto-fosfatásica do parasito mantido em meio padrão mostrou-se insensível à variação do pH do meio de reação. Em contrapartida, os parasitos mantidos em cultura com baixo Pi apresentaram uma atividade ecto-fosfatásica estimulada pela faixa ácida de pH, sugerindo a predominância de uma atividade fosfatásica ácida (Figura 12). Fluoreto de sódio, conhecido inibidor de fosfatases ácidas (FERNANDES *et al.*, 1997; DUTRA *et al.*, 2001; MEYER-FERNANDES *et al.*, 1999; DOS PASSOS LEMOS *et al.*, 2002), inibiu tanto as atividades das células crescidas em meios padrão como aquelas crescidas com baixo Pi. Entretanto, na última condição, a atividade mostrou-se mais sensível à inibição pelo fluoreto (75% de inibição) do que a atividade das células crescidas em meio padrão (44% de inibição). Este dado corrobora o resultado obtido com a influência do pH no meio de reação, onde a atividade ecto-fosfatásica das células crescidas em meio com baixo Pi mostra-se predominantemente uma atividade fosfatásica ácida.

A atividade ecto-fosfatásica das células crescidas em meio padrão foi capaz de hidrolisar fosfoserina, fosfotreonina e fosfotirosina na mesma proporção, sugerindo para nós se tratar de uma atividade ecto-fosfatásica com características semelhantes às fosfatases duplo-específicas (FONSECA-DE-SOUZA *et al.*, 2008). Já as células crescidas em meio com baixo Pi apresentaram uma hidrólise preferencial de fosfoserina e fosfotreonina, em detrimento de fosfotirosina (Figura 16). A hidrólise de fosfoaminoácidos, bem como de peptídeos fosforilados em resíduos de aminoácidos específicos, vem sendo utilizada como uma forma de tentar desvendar especificidades de fosfatases (SINGH, 1990; FJELD e DENU, 1999).

Ortovanadato de sódio, conhecido inibidor de PTPs, inibiu ambas as atividades das células crescidas em meios padrão e baixo Pi. Entretanto, na primeira condição, a atividade mostrou-se significativamente mais sensível à inibição pelo ortovanadato (83% de inibição) do que a atividade das células crescidas em meio com baixo Pi (76% de inibição). O ortovanadato de sódio é um conhecido inibidor de PTPs, uma vez que essas enzimas passam por um intermediário fosforilado durante o seu ciclo catalítico (FERNANDES *et al.*, 1997; DUTRA *et al.*, 2001; MEYER-FERNANDES *et al.*, 1999; DOS PASSOS LEMOS *et al.*, 2002). Embora as duas atividades tenham sido sensíveis à inibição por ortovanadato, apenas a atividade ecto-fosfatásica das células crescidas em meio com baixo Pi foi sensível à inibição por ácido okadáico, um inibidor específico de PPs (GULLEDGE *et al.*, 2003; MORIMOTO *et al.*, 2004; GEHRINGER, 2004; HASTIE *et al.*, 2005; ONISCHENKO *et al.*, 2005; AZAD *et al.*, 2006; SWINGLE *et al.*, 2006). Esses dados do efeito de ortovanadato de sódio e ácido okadáico corroboraram os dados obtidos na hidrólise de fosfoaminoácidos, indicando que a depleção de Pi levou à expressão diferencial de fosfatases, onde houve uma prevalência de proteínas fosfoserina/treonina

fosfatases nas células crescidas em meio com baixo Pi. Mesmo assim, não há como afirmar qual a classe exata da fosfatase de *T. rangeli*. A atividade ecto-fosfatásica das células crescidas em meio com baixo Pi poderia ser proveniente de uma PP ou de uma fosfatase duplo-específica, ou seja, que é capaz de reconhecer como substratos tanto fosfoserina como fosfotirosina (EBLAGHIE *et al.*, 2002; LAI e LE MOUAL, 2005; BYRUM *et al.*, 2006; JEONG *et al.*, 2007). Apenas uma investigação em nível molecular tornaria possível a correta classificação desta enzima.

O fato de haver a predominância de fosfoserina/treonina fosfatases em células crescidas em meio com baixo Pi poderia ser uma estratégia da célula para disponibilizar mais Pi, visto que a fosforilação em resíduos de serina ou treonina compreende uma grande fração em relação a todas as proteínas fosforiladas, quando comparada com a fosforilação em resíduos de tirosina (ANDREEVA e KUTUZOV, 2008).

O papel fisiológico para a atividade ecto-fosfatásica de *T. rangeli* está sob investigação. A possibilidade das fosfatases serem reguladas pela concentração de Pi no meio de cultura já foi descrita para diversos organismos procariotos (HULETT, 1996; BRAIBANT e CONTENT, 2001), em fungos (MacRAE *et al.*, 1988; OGAWA *et al.*, 2000), em plantas (BOZZO *et al.*, 2004) e em células de mamíferos (ZOIDIS *et al.*, 2004). Proteínas envolvidas na captação de Pi são geralmente codificadas por genes pertencentes à família chamada *pho* e têm sua transcrição ativada em resposta à depleção de Pi extracelular. O transporte de Pi pela membrana plasmática é realizado por transportadores específicos de Pi (*Pst*, do inglês *phosphate specific transporter*; SURIN *et al.*, 1985; TAKEMARU *et al.*, 1996). Esta permease pertence à superfamília de transportadores ABC que apresentam a hidrólise de ATP acoplada ao processo de transporte, permitindo o bombeamento de nutrientes limitantes essenciais à célula contra o gradiente de

concentração (BRAIBANT e CONTENT, 2001). Em *S. cerevisiae*, a transcrição de genes que codificam proteínas fosfatases ácidas e alcalinas e transportadores de Pi são reprimidos ou desreprimidos dependendo da concentração de Pi no meio de cultura (OSHIMA *et al.*, 1996). A regulação desta resposta adaptativa é muito complexa, envolvendo vários genes que sinalizam a depleção de Pi (OGAWA *et al.*, 2000). A maioria das fosfatases sintetizadas sob condições limitantes de Pi são localizadas no meio extracelular ou são associadas com a membrana plasmática ou parede celular (METZENBERG, 1979).

Oh e colaboradores, em 2007, demonstraram que a bactéria *Vibrio vulnificus* apresenta um padrão diferencial da expressão de uma fosfatase alcalina dependendo da concentração de Pi exógeno em que a célula foi mantida. Dessa forma, células que foram mantidas em meio sem Pi apresentaram um aumento da atividade fosfatásica ao longo dos dias de proliferação e as células mantidas com Pi apresentaram uma repressão dessa atividade, sendo que esta mostrou-se diminuída conforme os dias de proliferação. Neste contexto, as atividades ecto-fosfatásicas de *T. rangeli* apresentaram um perfil bastante semelhante, onde houve uma redução da atividade ecto-fosfatásica das células crescidas em meio padrão (Figura 17), quando comparada a atividade observada no primeiro dia de proliferação. Em contrapartida, as células que foram mantidas em meio com baixo Pi apresentaram um perfil distinto, apresentando um aumento da atividade ecto-fosfatásica ao longo dos dias de proliferação, quando comparado ao primeiro dia de proliferação (Figura 18). Esse fato demonstra que, assim como em *V. vulnificus*, o Pi exógeno poderia estar atuando como um fator de regulação da atividade ecto-fosfatásica (OH *et al.* 2007).

A modulação da atividade ecto-fosfatásica pela concentração de Pi do meio de cultura nos permite sugerir um papel desta enzima no ciclo de vida do parasito, uma vez que estas células têm que se adaptar a diversos ambientes, onde as condições não são tão

favoráveis para o seu desenvolvimento e, assim, este poderia utilizar diversas estratégias pra adquirir substâncias essenciais para uma proliferação e fisiologia normais.

Alguns organismos, quando submetidos à depleção de Pi, são capazes de alterar sua morfologia, a fim de aumentar a razão entre superfície e volume, tendo então maior contato com o ambiente externo e aumentando as chances de captar nutrientes essenciais, dentre eles, o Pi. Dessa forma, bactérias (LAMARCHE *et al.*, 2008) e plantas (HÖLZL & DÖRMANN, 2007) são capazes de alterar componentes da superfície celular para este fim, por exemplo. Em *Arabidopsis thaliana*, duas principais alterações morfológicas decorrentes da depleção de Pi são a redução do crescimento da raiz principal e o concomitante crescimento de raízes laterais, a fim de aumentar a superfície de absorção da raiz (CAMACHO-CRISTÓBAL *et al.*, 2008). Nós observamos que o Pi é um nutriente importante para manutenção da morfologia de *T. rangeli* (Figura 20). Células mantidas no meio com baixo Pi apresentam-se como formas esféricas, mostrando baixa motilidade, ineficiente proliferação celular, e mesmo morte celular. Embora a depleção de Pi leve a uma notável modificação da morfologia de *T. rangeli*, nós verificamos que a depleção de Pi não altera a ultraestrutura de *T. rangeli*, uma vez que células mantidas em meio depletado de Pi apresentam suas principais organelas integras (Figura 22). Além disso, a depleção de Pi do meio de cultura não leva a alterações funcionais da mitocôndria, quanto ao consumo de oxigênio (Figura 23), indicando não haver comprometimento do metabolismo energético dos parasitos frente à depleção de Pi.

No intuito de verificar que causas estariam levando às alterações morfológicas observadas em *T. rangeli* submetidos à privação de Pi, avaliamos a composição fosfolipídica das células crescidas em meios padrão e com baixo Pi. Como resultado, observamos que em homogenatos totais de *T. rangeli*, há uma diminuição de três principais

fosfolipídios, fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilinositol (PI) nas células crescidas em meio com baixo Pi, quando comparadas àquelas células crescidas em meio com alto Pi, indicando assim, que a depleção de Pi levaria a uma modificação de fosfolipídios estruturais, justificando as alterações morfológicas observadas (Figura 21). Em plantas, alterações da composição fosfolipídica em decorrência da depleção de Pi do meio de cultura levam a modificações morfológicas (KHOZIN-GOLDBERG e COHEN, 2006; KOBAYASHI *et al.*, 2006; RUSSO *et al.*, 2007). Além disso, a alteração da composição fosfolipídica também poderia justificar alterações do tipo de isoforma da ecto-fosfatase presente na membrana, uma vez que poderia levar a mudanças conformacionais da proteína, dependendo do tipo de lipídios presentes na membrana onde estas proteínas estariam inseridas. Esse fato culminaria na exposição ou não de outros sítios regulatórios e/ou catalíticos.

Os papéis sugeridos para as fosfatases são os mais variados, indo desde a aquisição de nutrientes (principalmente, o Pi) (KNEIPP *et al.*, 2004, 2006; FONSECA-DE-SOUZA *et al.*, 2008) até a supressão da resposta imune do hospedeiro via defosforilação de componentes importantes para a produção de toxinas antimicrobianas como o óxido nítrico (VANNIER-SANTOS *et al.*, 1996). Embora já tenham sido caracterizadas inúmeras atividades ecto-fosfatásicas dos mais diversos parasitos pelo nosso grupo, este foi o primeiro estudo sobre a expressão diferenciada de enzimas frente à depleção de Pi. O papel desempenhado para as atividades ecto-fosfatásicas permanece necessitando de um estudo posterior. Técnicas de biologia estrutural, como a eletroforese bidimensional e estudos proteômicos deverão revelar modificações importantes induzidas em *T. rangeli* pela depleção de Pi bem como o entendimento de alterações superficiais observadas com as células inteiras.



## 6. CONCLUSÕES

5. O estímulo da atividade ecto-fosfatásicas, permitiria aumentar a oferta de Pi para *T. rangeli* crescido em meio com baixo Pi;
6. A indução de uma atividade ecto-fosfatásica, com Km para *p*-NPP muito baixo (0,016 mM), asseguraria um fornecimento de Pi com traços de substrato;
7. A sensibilidade ao ácido okadáico (contrariamente ao observado com alto Pi) revela seletividade para resíduos fosforilados de serina e treonina da atividade ecto-fosfatásicas das células crescidas em meio com baixo Pi. Esse dado é confirmado quando se testam a hidrólise de fosfoserina, fosfotreonina e fosfotirosina;
8. A depleção de Pi do meio de cultura leva a alterações da morfologia dos parasitos, sem prejudicar a ultraestrutura, bem como a funcionalidade mitocondrial, sugerindo que possivelmente a depleção de Pi não compromete o metabolismo energético destas células;
9. A notável alteração da morfologia de *T. rangeli* crescido em meio com baixo Pi pode estar relacionada com alterações da composição de fosfolipídeos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASEN, C. & ALBORNOZ, M.C. 1994. Alkaline phosphatase at the cell wall of the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*, 127: 69-71.
- ANDERSON, R. A., BOSRON, W. F., KENNEDY, F. S., VALLEE, B. L. 1975. Role of magnesium in *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 72: 2989-2993.
- ANDERSSON, M. X., STRIDH, M. H., LARSSON, K. E., LILJENBERG, C., SANDELIUS, A. S. 2003. Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett.* 537: 128-132.
- ANDREEVA, A. V., KUTUZOV, M. A. 2008. Protozoan protein tyrosine phosphatases. *Int. J. Parasitol.* 38: 1279-1295.
- ANDREWS, P.D. & STARK, M.J.R. 2000. Type 1 protein phosphatase is required for maintenance of cell wall integrity, morphogenesis and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.*, 113: 507-520.
- AÑEZ, N., 1983. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920: VI. Developmental pattern in the haemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 78 (4): 413-9.
- ARNOLD, W.N., MANN, L.C., SAKAI, K.H., GARRISON, R.G., COLEMAN, P.D. 1986. The acid phosphatases of *Sporothrix schenckii*. *J. Gen. Microbiol.*, 132: 3421-3432.

- AUESUKAREE, C., HOMMA, T., TOCHIO, H., SHIRAKAWA, M., KANEKO, Y., HARASHIMA, S. 2004. Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 279: 17289-17294.
- AZAD, M.A., SAWA, Y., ISHIKAWA, T., SHIBATA, H., 2006. Purification and characterization of protein phosphatase 2A from petals of the tulip *Tulipa gesnerina*. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 39 (6): 671-6.
- BACA, O.G., ROMAN, M.J., GLEW, R.H., CHRISTNER, R.F., BUHLER, J.E., ARAGON, A.S. 1993. Acid phosphatase activity in *Coxiella burnetii*: a possible virulence factor. *Infect. Immun.*, 61: 4232-4239.
- BAKALARA, N., SANTARELLI, X., DAVIS, C., BALTZ, T. 2000. Purification, cloning and characterization of an acidic ectoprotein phosphatase differentially expressed in the infectious bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.*, 275: 8863-8871.
- BALDWIN, J. C., KARTHIKEYAN, A. S., CAO, A., RAGHOTHAMA, K. G. 2008. Biochemical and molecular analysis of LePS2;1: a phosphate starvation induced protein phosphatase gene from tomato. *Planta.* 228: 273-80.
- BARFORD, D., DAS, A.K., EGLOFF, M.P., 1998. The structure and mechanism of protein phosphatase: insights into catalysis and regulation. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 27: 133-164.
- BARRET, T.V., SILVA, D.E., OLIVEIRA, T., 1977. A trypanosome, indistinguishable from *Trypanosoma rangeli*, in the haemolymph of *Rhodnius domesticus* from Brazil. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71: 445-6.
- BASSERI, H.R., TEW, I.F., RATCLIFFE, N.A., 2002. Identification and distribution of carbohydrate moieties on the salivary glands of *Rhodnius prolixus* and their possible

- involvement in attachment/invasion by *Trypanosoma rangeli*. *Exp. Parasitol.*, 100: 226-34.
- BELTRAN, P.J. & BIXBY, J.L., 2003. Receptor protein tyrosine phosphatases as mediators of cellular adhesion. *Front Biosci.*, 8:d87-99.
- BERNARD, M., MOUYNA, I., DUBREUCQ, G., DEBEAUPUIS, J-P., FONTAINE, T., VORGIAS, C., FUGLSANG, C., LATGÉ, J-P. 2002. Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*, 148: 2819-2829.
- BLISKA, J.B., GALAN, J.E., FALKOW, S., 1993. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell*, 73(5):903-20.
- BLISKA, J.B., GUAN, K.L., DIXON, J.E., FALKOW, S. 1991. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 15: 1187-1191
- BOZZO, G. G., SINGH, V. K., PLAXTON, W. C. 2004. Phosphate or phosphite addition promotes the proteolytic turnover of phosphate-starvation inducible tomato purple acid phosphatase isozymes. *FEBS Lett.* 573: 51-54.
- BRAIBANT, M & CONTENT, J. 2001. The cell surface associated phosphatase activity of *Mycobacterium bovis* BCG is not regulated by environmental inorganic phosphate. *FEMS Microbiol. Lett.*, 195: 121-126.
- BUN-YA, M., NISHIMURA, M., HARASHIMA, S., OSHIMA, Y. 1991. The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol Cell Biol.* 11: 3229-3238.
- BYRUM, C.A., WALTON, K.D., ROBERTSON, A.J., CARBONNEAU, S., THOMASON, R.T., COFFMAN, J.A., McCLAY, D.R., 2006. Protein tyrosine and serine-

- threonine phosphatases in the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*: identification and potential functions. *Dev. Biol.*, 300 (1): 194-218.
- CAI, L., CHU, Y., WILSON, S.E., SCHLENDER, K.K., 1995. A metal-dependent form of protein phosphatase 2A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 208 (1):274-9.
- CAMACHO-CRISTÓBAL, J. J., REXACH, J., CONÉJÉRO, G., AL-GHAZI, Y., NACRY, P., DOUMAS, P. 2008. PRD, an Arabidopsis AINTEGUMENTA-like gene, is involved in root architectural changes in response to phosphate starvation. *Planta*. 228: 511-522.
- CAMICI, G., MANAO, G., CAPPUGI, G., MODESTI, A., STEFANI, M., RAMPONI, G., 1989. The complete amino acid sequence of the low molecular weight cytosolic acid phosphatase. *J Biol Chem.*, 264(5):2560-7.
- CIERESZKO, I., JOHANSSON, H., HURRY, V., KLECZKOWSKI, L. A. 2001. Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and pho mutants of *Arabidopsis*. *Planta* 212: 598-605.
- COHEN, P. 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Ann. Rev. Biochem.*, 58: 453-508.
- COHEN, P. 1997. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem. Sci.*, 22: 245-51.
- COLLOPY-JUNIOR, I., ESTEVES, F.F., NIMRITCHER, L., RODRIGUES, M.L., ALVIANO, C.S., MEYER-FERNANDES, J.R., 2006. An ecto-phosphatase activity in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.*, 6 (7): 1010-7.

- COURA, J.R., FERNANDES, O., ARBOLEDA, M., BARRET, T.V., CARRARA, N., DEGRAVE, W., CAMPBELL, D., 1996. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the brazilian Amazon. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 90: 278-9.
- COUTINHO, J.O. & NUSSENZWEIG, V., 1952. Infecção experimental de triatomíneos pelo *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. *Folia Clin. Biol.*, 18 (3): 181-8.
- CUBA, C.A., 1975. Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli*. XI. Observações sobre a sua evolução e morfogênese na hemocele e nas glândulas salivares de *Rhodnius ecuadoriensis*. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 17: 283-97.
- CUBA-CUBA, A., 1998. Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 31 (2): 207-20. Review.
- D’ALESSANDRO, A. & HINCAPIE, O., 1986. *Rhodnius neivai*: a new experimental vector of *Trypanosoma rangeli*. *Am. Trop. Med. Hyg.*, 35 (3): 512-4.
- D’ALESSANDRO, A. & SARAVIA, N.G., 1992. *Trypanosoma rangeli*. P. 1-54 (2). In *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York.
- D’ALESSANDRO, A. & SARAVIA, N.G., 1999. *Trypanosoma rangeli*. In Gilles, H. M. (ed.) *Protozoal Diseases*, Arnold, London.
- D’ALESSANDRO, A., 1963. The life cycle of *Trypanosoma rangeli* in triatomid bugs as it occurs in nature. *Bull. Tulane Univ. Med. Fac.*, 23: 21-30.
- D’ALESSANDRO, A., 1976. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. p.327-404. In Lumsden, W. H. & Evans, D. A. (eds.) *Biology of the kinetoplastida*. Academic Press, London.
- DE ALMEIRA-AMARAL, E.E., BELMONT-FIRPO, R., VANNIER-SANTOS, M.A., MEYER-FERNANDES, J.R. 2006. *Leishmania amazonensis*: characterization of an ecto-phosphatase activity. *Exp. Parasitol.* 114: 334-340.

- DE AZEVEDO-MARTINS, A. C., FROSSARD, M. L., DE SOUZA, W., EINICKER-LAMAS, M., MOTTA, M. C. 2007. Phosphatidylcholine synthesis in *Crithidia deanei*: the influence of the endosymbiont. *FEMS Microbiol. Lett.* 275: 229-236.
- DE GOUVÊA, P. F., SORIANI, F. M., MALAVAZI, I., SAVOLDI, M., GOLDMAN, M. H., LOSS, O., BIGNELL, E., DA SILVA FERREIRA, M. E., GOLDMAN, G. H. 2008. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* *PHO80* homologue. *Fungal Genet Biol.* 45: 1135-46.
- DE JESUS, J. B., DE SÁ PINHEIRO, A. A., LOPES, A. H., MEYER-FERNANDES, J. R. 2002. An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. *Z. Naturforsch.* 57: 890-896.
- DE JESUS, J. B., FERREIRA, M. A., CUERVO, P., BRITTO, C. E., SILVA-FILHO, F. C., MEYER-FERNANDES, J. R. 2006. Iron modulates ecto-phosphohydrolase activities in pathogenic trichomonads. *Parasitol. Int.* 55: 285-290.
- DE LEON, J.R., 1949. El *Trypanosoma rangeli* observado en seres humanos en Guatemala. *Publicaciones del Instituto de Investigaciones Cientificas em Guatemala*, 4.
- DE OLIVEIRA, M.A. & DE SOUZA, W., 2001. An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 77: 22-6.
- DE SÁ PINHEIRO, A. A., AMAZONAS, J. N., DE SOUZA BARROS, F., DE MENEZES, L. F., BATISTA, E. J., SILVA, E. F., DE SOUZA, W., MEYER-FERNANDES, J. R. 2007. *Entamoeba histolytica*: an ecto-phosphatase activity regulated by oxidation-reduction reactions. *Exp. Parasitol.* 115: 352-358.

- DE SOUZA, W. 2002. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res.* 88: 1013–1025. Review.
- DEANE, L.M., 1958. Encontro de tripanossomo do tipo rangeli em gambás da espécie *Didelphis marsupialis* no Estado do Pará. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.*, 10: 451-8.
- DEANE, L.M., ALMEIDA, F.B., FERREIRA-NETO, J.A., SILVA, J.E., 1972. *Trypanosoma cruzi* e outros tripanossomas em primatas brasileiros. *Rev. Soc. Bras. De Med. Tropical*, 6: 361.
- DECHATELET, L.R., COOPER, M.R. & McCALL, C.E., 1971. Studies on leukocyte phosphatases. 3. Inhibition of leukocyte acid phosphatase by zinc. *Clin Chem.*, 17(12):1176-9.
- DENU, J.M., LOHSE, D.L., VIJAYALAKSHMI, J., SAPER, M.A., DIXON, J.E., 1996b. Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93(6):2493-8.
- DENU, J.M., STUCKEY, J.A., SAPER, M.A., DIXON, J.E., 1996a. Form and function in protein dephosphorylation. *Cell*, 87: 361-364.
- DICKMAN, M.B. & YARDEN, O. 1999. Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 26: 99-117.
- DIOTAIUTI, L., SILVEIRA, A.C., ELIAS, M., STEINDEL, M., 1992. The possibility of occurrence of *Trypanosoma rangeli* in the state of Tocantins, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87: 451.
- DOCAMPO, R. & MORENO, S.N., 1996. The role of  $Ca^{2+}$  in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitol. Today*, 12 (2):61-5.



- DOS PASSOS LEMOS, A., FONSECA DE SOUZA, A.L., DE SÁ PINHEIRO, A.A., DE BERREDO-PINHO, M., MEYER-FERNANDES, J.R., 2002. Ecto-phosphatase activity on the cell surface of *Crithidia deanei*. *Z. Naturforsch. [C]*, 57(5-6):500-5.
- DUCRUET, P.A., VOGT, A., WIPF, P., LAZO, L.S., 2005. Dual specificity protein phosphatase: therapeutic targets for cancer and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 725-750.
- DUTRA, P.M., RODRIGUES, C.O., JESUS, J.B., LOPES, A.H., SOUTO-PADRÓN, T., MEYER-FERNANDES, J.R., 1999. A novel ecto-phosphatase activity of *Herpetomonas muscarum muscarum* inhibited by platelet-activating factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253(1):164-9.
- DUTRA, P.M.L., DIAS, F.A., SANTOS, M.A.A., RODRIGUES, C.O., ROMEIRO, A., ATTIAS, M., DE SOUZA, W., LOPES, A.H.C.S., MEYER-FERNANDES, J.R. 2001. Secreted phosphatase activities in *Trypanosomatid* parasites of plants modulated by platelet-activating factor. *Phytopathol.* 91: 408-414.
- EBLAGHIE, M., SANZ-EZQUERRO, J., DICKINSON, R., MUNSTENBERG, A., KEYSE, S., TICKLE, C., 2002. Pyst1/MKP3, a novel dual-specificity phosphatase, and FGF signaling in chick limb development. *J. Anat.*, 201 (5): 418.
- EDELMAN, G.M., 1985. Cell adhesion molecule expression and the regulation of morphogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 50:877-89.
- EECKHOUT, Y., 1970. [Properties and location of the Trypanosomide "Crithidia luciliae" acid hydrolases]. *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 78(5):993-4.
- EGLOFF, M.P., COHEN, P.T., REINEMER, P., BARFORD, D., 1995. Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol.*, 254(5):942-59.

- EICHLER, S. & SCHAUB, G.A., 2002. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp. Parasitol.*, 100 (1): 17-27.
- ELLIS, D.S., EVANS, D.A., STAMFORD, S., 1980. The penetration of the salivary glands of *Rhodnius prolixus* by *Trypanosoma rangeli*. *Z. Parasit.*, 62: 63-74.
- ESPINOZA, F. H., OGAS, J., HERSKOWITZ, I., MORGAN, D. O. 1994. Cell cycle control by a complex of the cyclin HCS26 (PCL1) and the kinase PHO85. *Science*. 266: 1388-1391.
- FERNANDES, E.C, MEYER-FERNANDES, J.R., SILVA-NETO, M.A.C., VERCESI, A.E. 1997. *Trypanosoma brucei*: ecto-phosphatase activity on the surface of intact procyclic forms. *Z. Naturforsch.*, 52: 351-358.
- FERNANDO, P.H.P, PANAGODA, G.J., SAMARANAYARE, L.P. 1999. The relation between the acid and alkaline phosphatase activity and the adherence of clinical isolates of *Candida parapsilosis* to human epithelial cell. *APMIS*, 107: 1034-1042.
- FERRARO, R. B., SOUSA, J. L., CUNHA, R. D., MEYER-FERNANDES, J. R. 2004. Characterization of an ecto-phosphatase activity in malpighian tubules of hematophagous bug *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 57:40-9.
- FISCHER, E.H., CHARBONNEAU, H., TONKS, N.K., 1991. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science*, 253(5018):401-6.
- FISKE, C.H. AND SUBBAROW, J.W. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375–392.
- FJELD, C.C. & DENU, J.M., 1999. Kinetic analysis of human serine/threonine protein phosphatase 2 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*, 274(29):20336-43.

- FONSECA, F. V., FONSECA DE SOUZA, A. L., MARIANO, A. C., ENTRINGER, P. F., GONDIM, K. C., MEYER-FERNANDES, J. R. 2006 *Trypanosoma rangeli*: characterization of a Mg-dependent ecto ATP-diphosphohydrolase activity. *Exp. Parasitol.* 112: 76-84.
- FONSECA-DE-SOUZA, A. L., DICK, C. F., DOS-SANTOS, A. L., FONSECA, F. V., MEYER-FERNANDES, J. R. 2009. *Trypanosoma rangeli*: A possible role for ecto-phosphatase activity on cell proliferation. *Exp Parasitol.*
- FONSECA-DE-SOUZA, A. L., DICK, C. F., SANTOS, A. L., MEYER-FERNANDES, J. R. 2008. A Mg(2+)-dependent ecto-phosphatase activity on the external surface of *Trypanosoma rangeli* modulated by exogenous inorganic phosphate. *Acta Trop.* 29.
- FURUYA, T. ZHONG, L., MEYER-FERNANDES, J.R., LU, H.G., MORENO, S.N.J., DOCAMPO, R. 1998. Ecto-protein tyrosine phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* infective stages. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 92: 339-348.
- GARCIA, E.S., MELLO, C.B., AZAMBUJA, P., RIBEIRO, J.M.C., 1994. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. *Exp. Parasitol.*, 78: 287-93.
- GASSER, K.W. & KIRSCHNER, L.B., 1987. The response of alkaline phosphatase to osmoregulatory changes in the trout, *Salmo gairdneri*. *J. Comp. Physiol. [B]*, 157 (4): 469-75.
- GEHRINGER, M.M., 2004. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett.*, 557 (1-3): 1-8. Review.
- GIOTS, F., DONATON, M. C., THEVELEIN, J. M. 2003. Inorganic phosphate is sensed by specific phosphate carriers and acts in concert with glucose as a nutrient signal for

- activation of the protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Mol Microbiol.* 47: 1163-1181.
- GOMES, S. A., FONSECA DE SOUZA, A. L., SILVA, B. A., KIFFER-MOREIRA, T., SANTOS-MALLET, J. R., SANTOS, A. L., MEYER-FERNANDES, J. R. 2006. *Trypanosoma rangeli*: Differential expression of cell surface polypeptides and ecto-phosphatase activity in short and long epimastigote forms. *Exp. Parasitol.* 112: 253-62
- GOMES, S. A., FONSECA-DE-SOUZA, A. L., KIFFER-MOREIRA, T., DICK, C. F., DOS SANTOS, A. L., MEYER-FERNANDES, J. R. 2008. Ecto-phosphatase activity on the external surface of *Rhodnius prolixus* salivary glands: modulation by carbohydrates and *Trypanosoma rangeli*. *Acta Trop.* 106:137-42.
- GÓMEZ, I., 1967. Nuevas observaciones acerca de la acción patógena del *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, sobre *Rhodnius prolixus* Stal, 1859. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 9 (1): 5-10.
- GONZÁLEZ, E., SOLANO, R., RUBIO, V., LEYVA, A., PAZ-ARES, J. 2005. PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR1 is a plant-specific SEC12-related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 17: 3500-3512.
- GONZÁLEZ, J.C., 2000. Fosforilación en células eucarióticas. Papel de fosfatases y quinasas en la biología, patogenia y control de protozoosis tisulares y sanguíneas. *Rev. Méd. Chile*, 128.
- GOTTLIEB, M & DWYER, D.M., 1981. Protozoan parasites of humans: Surface membrane with externally disposed acid phosphatase. *Science*, 212: 939-941.

- GREWAL, M.S., 1956. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in its vertebrate and invertebrate host. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 50: 301-2.
- GREWAL, M.S., 1957. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in the invertebrate host. *Exp. Parasitol.*, 6: 123-30.
- GRIFFITH, J.P., KIN, E.E., SINTCHAK, M.D., THOMSON, J.A., FITZBIBBON, M.J., FLEMING, M.A., CARON, P.R., NAVIA, M.A. 1995. A x-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell.*, 82: 507-522.
- GRISARD, E.C., 2002. Salivaria or Stercoraria? The *Trypanosoma rangeli* dilemma. *Kinetoplast. Biol. And Disease*, 1:5.
- GRISARD, E.C., CAMPBELL, D.A., ROMANHA, A.J., 1999b. Mini-exon gene polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology*, 118: 375-82.
- GRISARD, E.C., STEINDEL, M., GARNIERI, A.A., EGER-MAGRICH, I., CAMPBELL, D.A., ROMANHA, A.J., 1999a. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 203-9.
- GROOT, H., 1954. Estudios sobre los trypanosomas humanos clasificados como *Trypanosoma rangeli* con especial referencia a su evolución em *Rhodnius prolixus* y a su comparación con *T. ariari*. *Ann. Soc. Biol. Bogotá*, 6: 109-26.
- GUHL, F., VALLEJO, G. A. 2003. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98: 435-442.

- GUIMARÃES, L.H.S., TERENCE, H.F., JOREG, J.A., POLIZELLI, M.L.T.M. 2001. Thermostable conidial and mycelial alkaline phosphatases from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 265-270.
- GULEEDGE, B.M., AGGEN, J.B., ENG, H., SWEIMEH, K., CHAMBERLIN, A. R., 2003. Microcystin analogues comprised only of Adda and a single additional amino acid retain moderate activity as PP1/PP2A inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13 (17): 2907-11.
- HAN, S.W., MACCHERONI, W.Jr., ROSSI, A., 1992. The *pho-2A* mutant of *Neurospora crassa* which is deficient in Pi-repressible alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) is also defective in Pi-repressible acid phosphatase (EC 3.1.3.2). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 25(5):441-7.
- HANKS, S.K., QUINN, A.M., HUNTER, T., 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241:42-52.
- HASTIE, C.J., BORTHWICK, E.B., MORRISON, L.F., CODD, G.A., COHEN, P.T., 2005. Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1726 (2): 187-93.
- HECKER, H., SCHWARZENBACH, M., RUDIN, W., 1990. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. *Parasitol. Res.*, 76: 311-8.
- HENRIKSON, J., SOLARI, A., RYD-AKER, M., SOUSA, O. I., PETERSON, U., 1996. Karyotype variability in *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology*, 112: 385-91.
- HOARE, A., 1972. The Trypanosomes of mammals. "A zoological monograph". 1<sup>a</sup> ed. (Blackwell Scientific Publications), Oxford and Edinburgh, UK.

- HÖLZL, G. & DÖRMANN, P. 2007. Structure and function of glycoacyl lipids in plants and bacteria. *Progress in Lipid Research* 46: 225-243.
- HOUGH, E., HANSEN, L.K., BIRKNES, B., JYNGE, K., HANSEN, S., HORDVIK, A., LITTLE, C., DODSON, E.J., DEREWENDA, Z., 1989. High-resolution (1.5 Å) crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Nature*, 38: 357-60.
- HUANG, K.P., ROBINSON, J.C., CHOU, J.Y., 1976. Phosphoprotein-phosphatase activity associated with human placental alkaline phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun.*, 70(1):186-92.
- HULETT, F. M. 1996. The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 19: 933-939. Review.
- HUNTER, T., 1995. Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80: 225-236.
- JEONG, D.G., CHO, Y.H., YOON, T.S., KIM, J.H., RYU, S.E., KIM, S.J., 2007. Crystal structure of the catalytic domain of human DUSP5, a dual specificity MAP kinase protein phosphatase. *Proteins*, 66 (1): 253-8.
- JIA, Z., BARFORD, D., FLINT, A.J., TONKS, N.K., 1995. Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science*, 268(5218):1754-8.
- JOHNSON, L. N., BARFORD, D. 1993. The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22: 199-232. Review.
- JOLIVIET, P., QUEIROZ-CLARET, C., BERGERON, E., MEUNIER, J.C., 1998. Characterization of an exocellular protein phosphatase with dual substrate specificity from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 30: 783-796.

- JUNIOR, I. C., RODRIGUES, M. L., ALVIANO, C. S., TRAVASSOS, L. R., MEYER-FERNANDES, J. R. 2005. Characterization of an ecto-ATPase activity in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 5: 899-907.
- JUSTINO, A., NOSAWA, S.R., MACCHERONI, W., MAY, G.S., MARTINEZ-ROSSI, N.M., ROSSI, A. 2001. The *Aspergillus nidulans* pyrG89 mutation alters glycosylation of secreted acid phosphatase. *Fungal Genet. Biol.*, 32: 113-120.
- KAFFMAN, A., HERSKOWITZ, I., TJIAN, R., O'SHEA, E. K. 1994. Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85. *Science*. 263: 1153-6.
- KANEKO, Y., TAMAI, Y., TOH-E, A., OSHIMA, Y. 1985. Transcriptional and post-transcriptional control of PHO84 expression by PHO regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 5: 248-252.
- KATAKURA, K. & KOBAYASHI, A., 1988. Acid phosphatase activity of virulent and avirulent clones of *Leishmania donovani* promastigotes. *Infect. Immun.*, 56(11):2856-60.
- KATO, T., HARA, A., NAKAYAMA, T., SAWADA, H., HAMATAKE, M., MATSUMOTO, Y., 1986. Purification and characterization of purple acid phosphatase from rat bone. *Comp Biochem Physiol B.*, 83(4):813-7.
- KEYSE, S.M. 2000. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12: 186-192.
- KHOZIN-GOLDBERG, I., COHEN, Z. 2006. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*. 67: 696-701.



- KIFFER-MOREIRA, T., DE SÁ PINHEIRO, A.A., ALVIANO, W.S., BARBOSA, F.M., SOUTO-PADRÓN, T., NIMRICHTER, L., RODRIGUES, M.L., ALVIANO, C.S., MEYER-FERNANDES, J.R. 2007. An ectophosphatase activity in *Candida parapsilosis* influences the interaction of fungi with epithelial cells. *FEMS Yeast Res.* 7: 621-628.
- KIFFER-MOREIRA, T., PINHEIRO, A.A., PINTO, M.R., ESTEVES, F.F., SOUTO-PADRÓN, T., BARRETO-BERGTER, E., MEYER-FERNANDES, J.R. 2007. Mycelial forms of *Pseudallescheria boydii* present ectophosphatase activities. *Arch. Microbiol.* 188:159-166.
- KISSINGER, C.R., PARGE, H.E., KNIGHTON, D.R., LEWIS, C.T., PELLETIER, L.A., TEMPCZYK, A., KALISH, V.J., TUCKER, K.D., SHOWALTER, R.E., MOOMAW, E.W., GASTINEL, L.N., HABUKA, N., CHEN, X., MALDONADO, F., BARKER, J.E., BACQUET, R., VILLAFRANCA, J.E., 1995. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506 – calcineurin complex. *Nature*, 378: 641-4.
- KNEIPP, L.F., PALMEIRA, V.F., PINHEIRO, A.A.S, ALVIANO, C.S., ROZENTAL, S., TRAVASSOS, L.R., MEYER-FERNANDES, J.R. 2003. Phosphatase activity on the cell wall of *Fonsecaea pedrosoi*. *Med. Mycol.*, 41: 469-477.
- KNEIPP, L.F., RODRIGUES, L.M., HOLANDINO, C., ESTEVES, F.M., SOUTO-PADRÓN, T., ALVIANO, C.S., TRAVASSOS, L.R., MEYER-FERNANDES, J.R. 2004. Ecto-phosphatase activity in conidial forms of *Fonsecaea pedrosoi* is

- modulated by exogenous phosphate and influence fungal adhesion to mammalian cells. *Microbiology*, 150: 3352-3362.
- KOBAYASHI, K., MASUDA, T., TAKAMIYA, K., OHTA, H. 2006. Membrane lipid alteration during phosphate starvation is regulated by phosphate signaling and auxin/cytokinin cross-talk. *Plant J.* 47: 238-248.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LAI, S. M., LE MOUAL, H. 2005. PrpZ, a *Salmonella enterica* serovar Typhi serine/threonine protein phosphatase 2C with dual substrate specificity. *Microbiology*. 15: 1159-1167.
- LAI, S.M. & LE MOUAL, H., 2005. PrpZ, a *Salmonella enterica* serovar Typhi serine/threonine protein phosphatase 2C with dual substrate specificity. *Microbiol.*, 151 (Pt 4): 1159-67.
- LAILER, P.M., TAGA, E.M., VAN ETTEN, R.L., 1982. Human liver acid phosphatases: cysteine residues of the low-molecular-weight enzyme. *Arch Biochem Biophys.*, 216(2):512-21.
- LAMARCHE, M. G., WANNER, B. L., CRÉPIN, S., HAREL, J. 2008. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev.* 1-13. Review.
- LIN, X.H., WALTER, J., SCHEIDTMANN, K., OHST, K., NEWPORT, J., WALTER, G. 1998. Protein phosphatase 2A is required for the initiation of chromosomal DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 14693-14698.

- LUCENA, D.T. & MARQUES, M.J., 1954. Primeiro caso de infecção humana por *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920, no Brasil. *Rev. Bras. De Medicina*, 11 (8): 535-40.
- LYNN, D.H. & SMALL, E.B., 1988. An update on the systematics of the phylum *Ciliophora doflein*, 1901: the implications of kinetid diversity. *Biosystems*, 21 (3-4): 317-22.
- MACRAE, W. D., BUXTON, F. P., SIBLEY, S., GARVEN, S., GWYNNE, D. I., DAVIES, R. W., ARST HN, J. R. 1988. A phosphate-repressible acid phosphatase gene from *Aspergillus niger*: its cloning, sequencing and transcriptional analysis. *Gene* 71: 339-348.
- MACHADO, E.M.M., ALVARENGA, N.J., ROMANHA, A.J., GRISARD, E.C., 2000. A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95 (6): 863-6.
- MACHADO, P.E., EGER-MANGRICH, I., ROSA, G., KOERICH, L.B., GRISARD, E.C., STEINDEL, M., 2001. Differential susceptibility of triatomies of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. *Int. J. Parasitol.*, 31: 632-4.
- MAHVI, T.A., SPICER, S.S., WRIGHT, N.J. 1974. Cytochemistry of acid mucosubstance and acid phosphatase in *Cryptococcus neoformans*. *Can. J. Microbiol.*, 20: 833-838.
- MAIA DA SILVA, F, NOYES, H., CAMPANER, M., JUNQUEIRA, A.C.V., COURA, J.R., AÑEZ, N., SHAW, J.J., STEVENS, J.R., TEIXEIRA, M.M.G. 2004. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man,

- triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitol.*, 129: 549-561.
- MARTINEZ, P., PERSSON, B. L. 1998. Identification, cloning and characterization of a derepressible Na<sup>+</sup>-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 258: 628-638.
- McCLUSKEY, A. & SAKOFF, J.A., 2001. Small molecule inhibitors of serine/threonine protein phosphatase. *Mini Rev. Med. Chem.*, 1: 43-55.
- MEDINA-ACOSTA, E., FRANCO, A.M., JANSEN, A.M., SAMPOL, M., NEVES, N., PONTES DE CARVALHO, L., GRIMALDI JUNIOR, G., NUSSENZWEIG, V., 1994. Transialidase and sialidase activities discriminate between morphologically indistinguishable *Trypanosomatids*. *Eur. J. Biochem.*, 225: 333-9.
- MEYER-FERNANDES, J.R., DUTRA, P.M., RODRIGUES, C.O., SAAD-NEHME, J., LOPES, A.H., 1997. Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 341(1):40-6.
- MEYER-FERNANDES, J.R., SILVA-NETO, M.A.C., SOARES, M.S., FERNANDES, E., VERCESI, A.E., OLIVEIRA, M.M. 1999. Ecto-phosphatase activities on the cell surface of the amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Z. Naturforsch.*, 54c: 977-984.
- MILDNER, P., RIES, B., BARBARIC, S. 1975. Acid phosphatase and adenosine triphosphatase activities in the cell wall of baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta.*, 391: 67-74.
- MILLWARD, T.A., ZOLNIERO, S., HEMMINGS, B.A. 1999. Regulation of a protein kinase cascade by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci.*, 24: 186-191.

- MONDS, R. D., NEWELL, P. D., SCHWARTZMAN, J. A., O'TOOLE, G. A. 2006. Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Appl Environ Microbiol.* 72: 1910-1924.
- MORIMOTO, H., OKAMURA, H., YOSHIDA, K., KITAMURA, S., HANEJI, T., 2004. Okadaic acid induces apoptosis through double-stranded RNA-dependent protein kinase/eukaryotic initiation factor-2alpha pathway in human osteoblastic MG63 cells. *J. Biochem. (Tokyo)*, 136 (4): 433-8.
- MOUILLON, J. M., PERSSON, B. L. 2006. New aspects on phosphate sensing and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 6: 171-6. Review.
- NAKAGURA, K.H., TACHIBANA, H., KANEDA, Y. 1985. Alteration of the cell surface acid phosphatase concomitant with morphological transformation in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 81B: 815-817.
- OGAWA, N., DERISI, J., BROWN, P. O. 2000. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell.* 11: 4309-4321.
- OGAWA, N., SAITOH, H., MIURA, K., MAGBANUA, J. P., BUN-YA, M., HARASHIMA, S., OSHIMA, Y. 1995. Structure and distribution of specific cis-elements for transcriptional regulation of PHO84 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 249: 406-416.
- OH, W. S., IM, Y. S., YEON, K. Y., YOON, Y. J., KIM, J. W. 2007. Phosphate and carbon source regulation of alkaline phosphatase and phospholipase in *Vibrio vulnificus*. *J Microbiol.* 45: 311-317.

- ONISCHENKO, E.A., GUBANOVA, N.V., KISELEVA, E.V., HALLBERG, E., 2005. Cdk1 and okadaic acid-sensitive phosphatase control assembly of nuclear pore complexes in *Drosophila* embryos. *Mol. Biol. Cell.*, 16 (11): 5152-62.
- OSHIMA, Y. 1997. The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet Syst.* 72: 323-334.
- OSHIMA, Y., OGAWA, N., HARASHIMA, S. 1996. Regulation of phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*--a review. *Gene.* 179: 171-177. Review.
- PEERAER, Y., RABIJNS, A., COLLET, J.F., VAN SCHAFTINGEN, E., DE RANTER, C., 2004. How calcium inhibits the magnesium-dependent enzyme human phosphoserine phosphatase. *Eur. J. Biochem.*, 271(16):3421-7.
- PEREIRA DA SILVA, A. P., EL-BACHA, T., KYAW, N., DOS SANTOS, R. S., DA SILVA, W. S., ALMEIDA, F. C., DA POIAN, A. T., GALINA, A. 2008. Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. *Biochem J.*
- PERSSON, B. L., LAGERSTEDT, J. O., PRATT, J. R., PATTISON-GRANBERG, J., LUNDH, K., SHOKROLLAHZADEH, S., LUNDH, F. 2003. Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 43: 225-244.
- PESSOA, S.P. & FREITAS, S.P., 1952. Aspectos morfológicos do *Trypanosoma cruzi* e de outros parasitos de importância no diagnóstico de moléstia de Chagas. *IX Cong. Bras. Hig.*, pp.448-91.
- PIFANO, C.F. & MAYER, M. 1949. Hallazgo de formas evolutivas del *Trypanosoma rangeli* em jugo de la trompa de *Rhodnius prolixus* de Venezuela. *Arch. Venez. Pathol. Trop. Parasit. Med.*, 1: 153-8.

- POIRIER, Y., THOMA, S., SOMERVILLE, C., SCHIEFELBEIN, J. 1991. Mutant of *Arabidopsis* Deficient in Xylem Loading of Phosphate. *Plant Physiol.* 97: 1087-1093.
- REDDY, V. S., SINGH, A. K., RAJASEKHARAN, R. 2008. The *Saccharomyces cerevisiae* *PHM8* gene encodes a soluble magnesium-dependent lisophosphatidic acid phosphatase. *J Biol Chem.* 283: 8846-8854.
- REMALEY, A.T., DAS, S., CAMPBELL, P.I., LA ROCCA, G.M., POPE, M.T. & GLEW, R.H., 1985. Characterization of *Leishmania donovani* acid phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 260 (2): 880-6.
- ROOMANS, G. M., BLASCO, F., BORST-PAUWELS, G.W. 1997. Cotransport of phosphate and sodium by yeast. *Biochim Biophys Acta.* 467: 65-71.
- RUSSO, M. A., QUARTACCI, M. F., IZZO, R., BELLIGNO, A., NAVARI-IZZO, F. 2007. Long- and short-term phosphate deprivation in bean roots: plasma membrane lipid alterations and transient stimulation of phospholipases. *Phytochemistry.* 68: 1564-1571.
- SAHA, A.K., DOWLING, J.N., LAMARCO, K.L., DAS, S., REMALEY, A.T., OLOMU, N., POPE, M., GLEW, R.H. 1985. Properties of an acid and phosphatase from *Legionella micdadei* which blocks superoxide anion production by human neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.*, 243: 150-160.
- SCHAUB, G.A., 1992. The effects of Trypanosomatids on insects. *Adv. Parasitol.*, 31: 255-319.
- SCHEIBE, R.J., KUEHL, H., KRAUTWALD, S., MEISSNER, J.D., MUELLER, W.H., 2000. Ecto-alkaline phosphatase activity identified at physiological pH range on

- intact P19 and HL-60 cells is induced by retinoic acid. *J Cell Biochem.*, 76(3):420-36.
- SCHWARTZ, J.H. & LIPMANN, F., 1961. Phosphate incorporation into alkaline phosphatase of *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 47: 1996-2005.
- SHAKARIAN, A.M., JOSHI, M.B., YAMAGE, M., ELLIS, S.E., DEBRABANT, A., DWYER, M. 2003. Members of a unique histidine acid phosphatase family are conserved amongst a group of primitive eukaryotic human pathogens. *Mol. Cell. Biochem.*, 245: 31-43.
- SHEMER, R., MEIMOUN, A., HOLTZMAN, T., KORNTIZER, D. 2002. Regulation of the transcription factor *gcn4* by *pho85* cyclin *pcl5*. *Mol Cell Biol.* 22: 5395-5404.
- SHENOLIKAR, S., 1994. Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation. *Annu. Ver. Cell Biol.*, 10:55-86. Review.
- SHIMANO, F., ASHIHARA, H. 2006. Effect of long-term phosphate starvation on the levels and metabolism of purine nucleotides in suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells. *Phytochemistry.* 67: 132-141.
- SINGH, T.J., 1990. Characterization of a bovine brain magnesium-dependent phosphotyrosine protein phosphatase that is inhibited by micromolar concentrations of calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 167(2):621-7.
- SINGLA, N., KHULLER, G.K., VINAYAK, V.K., 1992. Acid phosphatase activity of promastigotes of *Leishmania donovani*: a marker of virulence. *FEMS Microbiol. Lett.*, 73(3):221-5.
- SPRINGER, T. A., 1990. The sensation and regulation of interactions with the extracellular environment: the cell biology of lymphocyte adhesion receptors. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 6: 359-402.



- STEC, B., HOLTZ, K.M., KANTROWITZ, E.R., 2000. A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. *J. Mol. Biol.*, 299: 1303-11.
- STEINDEL, M., CARVALHO-PINTO, C.J., TOMA, H.K., MANGIA, R.H.R., RIBEIRO-RODRIGUES, R., ROMANHA, A.J., 1991. *Trypanosoma rangeli* (Tejera 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echymys dasythrix*) in Santa Catarina: first report of this trypanosome in Southern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 86: 73-9.
- STENZEL, I., ZIETHE, K., SCHURATH, J., HERTEL, S. C., BOSSE, D., KÖCK, M. 2003. Differential expression of the LePS2 phosphatase gene family in response to phosphate availability, pathogen infection and during development. *Physiol Plant*. 118: 138-146.
- STEVENS, J. & GIBSON, W., 1999. The evolution of salivarian trypanosomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94 (2): 225-8.
- STONE, R.L. & DIXON, J.E. 1994. Protein-tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 269: 31323-31326.
- STUCKEY, J.A., SCHUBERT, H.L., FAUMAN, E.B., ZHANG, Z.Y., DIXON, J.E., SAPER, M.A., 1994. Crystal structure of *Yersinia* protein tyrosine phosphatase at 2.5 Å and the complex with tungstate. *Nature*, 370(6490):571-5.
- SURIN, B. P., ROSENBERG, H., COX, G. B. 1985. Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships. *J. Bacteriol.* 161: 189-198.
- SWINGLE, M., NI, L., HONKANEN, R.E., 2006. Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse. *Meth. Mol Biol.*, 365: 23-38.

- TAKEMARU, K., MIZUNO, M., KOBAYASHI, Y. 1996. A *Bacillus subtilis* gene cluster similar to the *Escherichia coli* phosphate-specific transport (pst) operon: evidence for a tandemly arranged pstB gene. *Microbiology*. 142: 2017-2020.
- TANAKA, T., YANEDA, Y., IIDA, A., TANAKA, M., 1994. Homologous cysteine proteinase genes located on two different chromosomes from *Trypanosoma rangeli*. *Int. J. Parasitol.*, 24: 179-88.
- TASAKI, Y., KAMIYA, Y., AZWAN, A., HARA, T., JOH, T. 2002. Gene expression during Pi deficiency in *Pholiota nameko*: accumulation of mRNAs for two transporters. *Biosci Biotechnol Biochem*. 66: 790-800.
- TASAKI, Y., KAMIYA, Y., AZWAN, A., HARA, T., JOH, T. 2002. Gene expression during Pi deficiency in *Pholiota nameko*: accumulation of mRNAs for two transporters. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 66: 790-800.
- TESTERINK, C., MUNNIK, T. 2005. Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant. Sci*. 10: 368-375.
- THOMAS, C., RAJAGOPAL, A., WINDSOR, B., DUDLER, R., LLOYD, A., ROUX, S.J., 2000. A role for ectophosphatase in xenobiotic resistance. *Plant Cell*, 12 (4): 519-33.
- TIBBITTS, T.T., MURPHY, J.E., KANTROWITZ, E.R., 1996. Kinetic and structural consequences of replacing the aspartate bridge by asparagine in the catalytic metal triad of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *J. Mol. Biol.*, 257: 700-15.
- TICCONI, C. A., DELATORRE, C. A., ABEL, S. 2001. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 127: 963-972.

- TOBIE, E.J., 1964. Increased infectivity of a cyclically maintained strain of *Trypanosoma rangeli* to *Rhodnius prolixus* and mode of transmission by invertebrate host. *J. Parasitol.*, 50: 593-8.
- TORRIANI, A. 1990. From cell membrane to nucleotides: the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Bioessays.*, 12: 371-376.
- TROWBRIDGE, I.S., JOHNSON, P., OSTERGAARD, H., HOLE, N., 1992. Structure and function of CD45: a leukocyte-specific protein tyrosine phosphatase. *Adv Exp Med Biol.*, 323:29-37.
- UEHARA, K., FUJIMOTO, S., TANIGUCHI, T., 1974a. Studies on violet-colored acid phosphatase of sweet potato. I. Purification and some physical properties. *J Biochem (Tokyo)*, 75(3):627-38.
- UEHARA, K., FUJIMOTO, S., TANIGUCHI, T., NAKAI, K., 1974b. Studies on violet-colored acid phosphatase of sweet potato. II. Enzymatic properties and amino acid composition. *J Biochem (Tokyo)*, 75(3):639-49.
- VAN BELLE, H., 1972. Kinetics and inhibition of alkaline phosphatases from canine tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, 289(1):158-68.
- VANNIER-SANTOS, M.A., MARTINY, A., MEYER-FERNANDES, J.R., DE SOUZA, W., 1995. Leishmanial protein kinase C modulates host cell infection via secreted acid phosphatase. *Eur. J. Cell. Biol.*, 67 (2): 112-9.
- VENKATESAN, S., BIRD, R.G., ORMEROD, W.E., 1977. Intracellular enzymes and their localization in slender and stumpy forms of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Int J Parasitol.*, 7(2):139-47.
- VILLAFRANCA, J.E., KISSINGER, C.R., PARGE, H.E. 1996. Protein serine/threonine phosphatase. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7: 397-402.

- VÖGEL, K. & HINNEN, A., 1990. The yeast phosphatase system.. *Mol. Microbiol.*, 4(12):2013-7. Review.
- VON KRÜGER, W. M., LERY, L. M., SOARES, M. R., DE NEVES-MANTA, F. S., BATISTA E SILVA, C. M., NEVES-FERREIRA, A. G., PERALES, J., BISCH, P. M. 2006. The phosphate-starvation response in *Vibrio cholerae* O1 and *phoB* mutant under proteomic analysis: disclosing functions involved in adaptation, survival and virulence. *Proteomics*. 6: 1495-511.
- WATKINS, R., 1971. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J. Invertebr. Pathol.*, 17: 59-66.
- WERA, S. & HEMMING, B.A. 1995. Serine/threonine protein phosphatase. *Biochem. J.*, 311: 17-29.
- XU, X. & KANTROWITZ, E.R., 1993. Binding of magnesium in a mutant *Escherichia coli* alkaline phosphatase changes the rate-determining step in the reaction mechanism. *Biochemistry*, 32: 10683-91.
- YODA, K., KO, J.H., NAGAMATSU, T., LIN, Y., KAIBARA, C. KAWADA, T., TOMISHIGE, N., HASHIMOTO, H., NODSA, Y., YAMASAKI, M. 2000. Molecular characterization of a novel yeast cell-wall acid phosphatase cloned from *Kluyveromyces marxianus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64: 142-148.
- ZHAN, X.L., HONG, Y., ZHU, T., MITCHEL, A.P., DESCHENES, R.J., GUAN, K-L. 2000. Essential functions of protein tyrosine phosphatase Ptp2 and Ptp3 and Rim1 tyrosine phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* meiosis and sporulation. *Mol. Biol. Cell*, 11: 663-676.

- ZHONG, L., LU, H.-G., MORENO, S.N.L., DOCAMPO, R. 1998. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by *Trypanosoma cruzi* is linked to cell invasion. *FEMS Microbiol. Lett.*, 161: 15-20.
- ZILBERSTEIN, D. & SHAPIRA, M., 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Ann. Rev. Microbiol.*, 48: 449-70. Review.
- ZOIDIS, E., GHIRLANDA-KELLER, C., GOSTELI-PETER, M., ZAPF, J., SCHMID, C. 2004. Regulation of phosphate (Pi) transport and NaPi-III transporter (Pit-1) mRNA in rat osteoblasts. *J. Endocrinol.* 181: 531-540.
- ZOLNIEROWICZ, S. & BOLLEN, M. 2000. Protein phosphorylation and protein phosphatases. *EMBO J.*, 19: 483-488.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)