

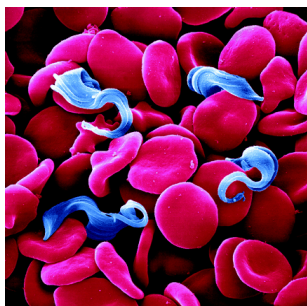
Investigação do *Trypanosoma brucei rhodesiense* por MALDI

Nota de Aplicação – MALDI

Nº 1

Introdução

A doença do sono ou tripanossomíase africana é uma doença causada pelo protozoário *Trypanosoma brucei*. A forma crônica da doença é causada pelo *Trypanosoma brucei gambiense*, enquanto a forma aguda pelo *Trypanosoma brucei rhodesiense*. O *Trypanosoma brucei* é um dos parentes do *Trypanosoma cruzi* (causador da doença de Chagas).



Parasitas de *Trypanosoma brucei* rodeado por células vermelhas (J. Berger e Dr. P. Overath, Instituto Max Planck)

A tripanossomíase africana é transmitida ao ser humano pela picada da mosca tsé-tsé. O parasita existente na saliva destas moscas é injetado na corrente sangüínea quando estas se alimentam de sangue humano. O parasita se reproduz primeiro no sangue e no sistema linfático e, em seguida, no sistema nervoso central. Os primeiros sintomas da doença são febre, dor de cabeça e dores nas articulações. Neste estágio, o tratamento é relativamente fácil, mas o diagnóstico é difícil. Mais tarde,

quando o parasita invade o cérebro, surgem os sintomas neurológicos, tais como distúrbios do sono, confusão mental e convulsões, que sem tratamento adequado resultam em debilitação física, sonolência, coma e morte. A doença do sono é considerada uma doença negligenciada, porque afeta principalmente os muito pobres, em áreas igualmente pobres. O diagnóstico da doença é realizado pela detecção microscópica dos parasitas no sangue ou pela detecção de seu DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

O uso da espectrometria de massas MALDI (*Matrix-assisted laser desorption ionization*) em análise proteômica, permite a identificação de proteínas provenientes da digestão enzimática por PMF (*Peptide mass fingerprinting*) em bancos de dados. Esta metodologia foi empregada na investigação do *Trypanosoma brucei rhodesiense* e encontra-se descrita nesta nota de aplicação.

Resultados

Para investigação do *Trypanosoma brucei*, uma porção de 500 µg de proteína total do parasita foi submetida à separação por eletroforese bidimensional, na qual as

proteínas migram sob a influência de um campo elétrico e são separadas por diferenças de carga e de massas moleculares, como se observa na Figura 1.

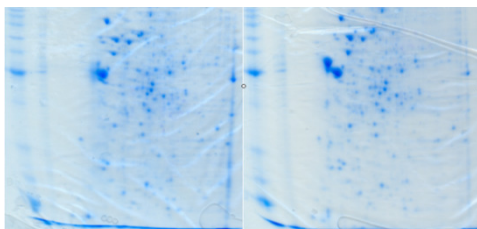


Figura 1. Padrão bidimensional eletroforético de 500 µg de proteína total do protozoário *Trypanosoma brucei*.

A identificação das proteínas de interesse, obtidas no gel bidimensional, é realizada através do corte da mancha do gel, subsequente digestão enzimática com tripsina, extração dos peptídeos e identificação por espectrometria de massas. O conjunto de dados obtidos, ou seja, o espectro de massas da amostra é comparado com os valores teóricos calculados a partir do DNA em um banco de dados (Mascot), permitindo a identificação da(s) proteína(s) presente em cada ponto do gel.

Para identificação das proteínas foi utilizado um espectrômetro de massas MALDI modelo CFR-plus, Kratos-Shimadzu Biotech. A Figura 2 mostra o espectro PMF de uma das manchas do gel.

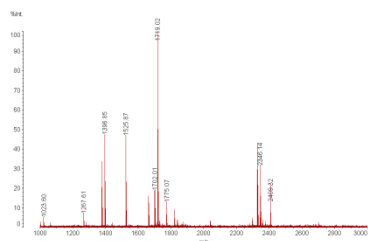


Figura 2. Espectro PMF de uma mancha no gel bidimensional.

Submetendo o espectro de massas obtido na Figura 2 a uma busca no Mascot, utilizando o banco de dados SwissProt, obteve-se o resultado observado na Figura 3.



Figura 3. Resultado da busca no Mascot para o espectro PMF mostrado na Figura 2.

Os resultados de pontuação apresentados no Mascot baseiam-se numa probabilidade estatística e permitem dizer quão confiável é o conjunto de dados obtidos, dando-lhe significância. No resultado apresentado na Figura 3, obteve-se uma pontuação ou score de 144 pontos. Este resultado mostra que o espectro de massas apresentado na Figura 2 é indubitavelmente a proteína tubulina de cadeia β do protozoário *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

Caso o resultado obtido na busca de um espectro PMF seja pouco significativo, com pontuação menor que 64, pode-se recorrer ao espectro MS/MS dos peptídeos mais intensos, na tentativa de se obter resultados mais significativos e com isso elucidar a proteína presente em cada uma das manchas no gel.