



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas

Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro

Obtenção dos ligantes à Oligopeptidase B de *Trypanosoma cruzi*

BEATRIZ PEREIRA NEVES

Brasília - DF

2019



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA MÉDICAS

Obtenção dos ligantes à Oligopeptidase B de *Trypanosoma cruzi*

BEATRIZ PEREIRA NEVES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília - Faculdade de Medicina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: **Dr. Jaime Martins de Santana**

Co-Orientadora: **Dra. Flávia Nader Motta**

Brasília - DF, 2019.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Po Pereira Neves , Beatriz
 Obtenção dos ligantes à Oligopeptidase B de Trypanosoma
 cruzi / Beatriz Pereira Neves ; orientador Jaime Martins
 de Santana; co-orientador Flávia Nader Motta. -- Brasília,
 2019.
 66 p.

 Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Médicas) --
 Universidade de Brasília, 2019.

 1. Interatoma de Oligopeptidase B. 2. Técnicas para
 obtenção de ligantes. I. Martins de Santana, Jaime , orient.
 II. Nader Motta, Flávia , co-orient. III. Título.

Pesquisa realizada no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro (LIPH) - Departamento de Biologia Celular - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, com apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAP-DF.

Dedico esse trabalho ao meu pai Igomário, meu maior exemplo de vida e meu orgulho e à minha mãe Orlanda, meu eterno amor e pelo apoio incondicional durante toda minha jornada.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu orientador, professor Dr. Jaime Martins de Santana, pela chance, por todo o conhecimento e experiência passada.

À minha co-orientadora e amiga, professora Dr^a Flávia Nader, por ter me acolhido e dado a oportunidade de conhecer uma pessoa brilhante, inteligente, e solidária. Por todos os momentos de ensinamentos, por ter sentado incontáveis vezes comigo na bancada com toda a paciência para passar os seus conhecimentos. Por ter aberto as portas da sua casa várias vezes para me tirar dúvidas e me auxiliar, e com certeza pela amizade adquirida nesse tempo. Você é uma pessoa incrível e de um coração enorme.

Às professoras Dr^a Izabela Bastos e Dr^a Carla Nunes, por todos os ensinamentos, incentivos e conselhos passados.

A todos os colegas do Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro, por terem me acolhido e me ajudado diversas vezes. Pelos momentos de aprendizado, mas também os de descontração. Ao Álex Mendes por me ajudar sempre em meus experimentos e por ser tão prestativo. E em especial à Déborah Bianca, minha amiga do coração, por estar sempre comigo, pelas várias conversas e boas gargalhadas que eu amo e sinto falta.

Aos meus familiares, minha mãe Orlanda Pereira, meu pai Igomário Lino e meu irmão Igor Pereira, por todo amor, apoio e incentivo. Obrigada por estarem sempre comigo, vocês são meus maiores exemplos de vida.

A todos os meus amigos por toda a paciência e por facilitarem essa caminhada, em especial a Kamila Tonelline e Déborah Bianca. Ao meu melhor amigo e namorado Igor Dutra por todas as palavras que me acalmam, pela paciência, e por ter aparecido no momento mais conturbado, porém o melhor da minha vida. Obrigada pelo companheirismo e pela compreensão em momentos mais difíceis.

Ao Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, pela colaboração na identificação das proteínas, principalmente ao Prof. Sébastien Charneau e ao pós-doutorando Samuel Mandacaru.

Aos membros da banca examinadora por participarem da defesa da dissertação.

Ao CNPq, CAPES e FAPDF pelo financiamento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina - UnB pela oportunidade de realização do mestrado.

Sumário

LISTA DE ABREVIACOES.....	10
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas.....	14
1.2 Doença de Chagas	15
1.2.1 Aspectos epidemiológicos	16
1.2.2 Manifestações clínicas da doença de Chagas	17
1.2.3 O tratamento quimioterápico	19
1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.3.1 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	22
1.3.2 Fatores de virulência em <i>T. cruzi</i>	23
1.4 Proteases.....	26
1.4.1 Oligopeptidase B (OPB)	29
1.5 Complexos proteicos e análises proteômicas	31
2. JUSTIFICATIVA	32
4. METODOLOGIA.....	34
4.1 Manutenção das culturas de células.....	34
4.1.1 Cultura de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	34
4.1.2 Cultivo de células Vero.....	34
4.1.3 Infecção de células de mamífero para obtenção de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	34
4.1.4 Obtenção das formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	34
4.2 Expressão da oligopeptidase B recombinante	34
4.3 <i>Western Blotting</i>	35
4.4 Preparação do extrato solúvel proteico de <i>T. cruzi</i>	36
4.5 Testes para obtenção dos ligantes  OPBTc:.....	36
4.5.1 Com resina de Ni-agarose	36
4.5.2 Com resina de Ni-agarose + <i>cross-linking</i> químico	36
4.6 <i>Pull-down</i>	37
4.7 Célula de mamífero (VERO) + OPBTc	38
4.8 <i>Blue Native Page (BN-PAGE)</i> para análise de complexos proteicos.....	39

4.8.1	Preparo de amostras	39
4.8.2	Primeira e segunda dimensão do <i>BN-PAGE</i>	39
4.9	Coloração dos géis com nitrato de prata	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1	Expressão e purificação da proteína recombinante OPBTc	41
5.2	Detecção de rOPBTc por anticorpo específico anti-OPBTc.....	42
5.3	OPBTc imobilizada em resina de Ni-agarose	43
5.4	Teste com <i>cross-linking</i>	45
5.5	OPBTc imobilizada em resina de Ni-agarose com <i>cross-linking</i>	46
5.6	Fluxograma de trabalho I	48
5.7	<i>Pull-down</i>	49
5.8	Fluxograma de trabalho II	51
5.9	Interação célula hospedeira + rOPBTc	52
5.10	Fluxograma de trabalho III	54
5.11	<i>BN-PAGE</i>	55
5.12	<i>BN-PAGE</i> das três formas do parasito	56
6.	CONCLUSÃO.....	58
7.	REFERÊNCIAS.....	59
8.	APÊNDICE	66

LISTA DE ABREVIACOES

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

DNA – cido desoxirribonucleico

DTNs – Doenças tropicais negligenciadas

EDTA – Etileno bis (oxi-etilenonitrilo) do ácido tetraacético

HCl – cido clorídrico

IPTG – *Isopropyl β-D-1- thiogalactopyranoside*

KCl – Cloreto de potássio

kDa – Kilodalton

LB – Luria Bertani

LC-MS/MS – *Liquid chromatography mass spectrometry*

NaCl – Cloreto de sódio

OMS – Organizao Mundial da Saúde

OPAS – Organizao Pan-Americana da Saúde

OBPTc – Oligopeptidase B de *Trypanosoma cruzi*

OPS – ORGANIZACO PANAMERICANA DE LA SALUD

PBS – *Phosphate-buffered saline*

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

TBS – *Tris-buffered saline*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	23
Figura 2. Purificação da fração solúvel de rOPBTc.....	41
Figura 3. Western blotting da proteína recombinante com anti-OPBTc.	42
Figura 4 Teste de complexos.	44
Figura 5 Teste com <i>cross-linking</i>	45
Figura 6. Teste de complexos com <i>cross-linking</i>	47
Figura 7. Teste de <i>pull-down</i> . d.	49
Figura 8 2º Teste de <i>pull-down</i>	50
Figura 9. Análise de complexos proteicos solúveis das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> – <i>BN-PAGE</i>	55
Figura 10. Análise de complexos proteicos solúveis das formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de <i>T. cruzi</i> – <i>BN-PAGE</i>	57
Figura 11. Interação células VERO + rOPBTc..	52
Figura 12. <i>Western blotting</i> da interação células VERO + rOPBTc.....	53

RESUMO

A oligopeptidase B foi primeiramente isolada de *Escherichia coli*, sua distribuição é restrita a bactérias Gram-negativas e positivas, eucariotos inferiores e plantas e não possui ortólogos em mamíferos, característica importante quando se pensa nesta protease como alvo de droga. Já foi demonstrado que a oligopeptidase B de *Trypanosoma cruzi* (OPBTc) participa do processo de infecção do parasito e tem sido cada vez mais mencionada como um importante fator de virulência para os tripanossomatídeos.. A identificação de substâncias com desempenho comprovado na OPBTc pode servir como molde para o desenho racional de inibidores mais eficazes e seguros, e portanto, com maior possibilidade de sucesso terapêutico. O presente projeto tem como objetivo geral obter os ligantes à oligopeptidase B de *Trypanosoma cruzi* com a finalidade de construir seu interatoma, e como objetivos específicos aprimorar as técnicas de identificação de ligantes. Para obtenção dos ligantes foram utilizadas várias metodologias, como a técnica de cromatografia por afinidade, *pull-down*, técnicas utilizando o *cross-linking* e o *BN-PAGE*, mostrando as diferenças e vantagens entre cada metodologia. No experimento de *BN-PAGE* demonstramos o padrão de migração da OPBTc recombinante e nativo, mostrando pela primeira vez a OPBTc como um dímero (160 kDa) em uma técnica eletroforética. Nos experimentos foi possível visualizar a presença de alguns possíveis complexos, que precisam ser levados para identificação e confirmação da funcionalidade desses complexos no processo de infecção do parasito ao hospedeiro, que poderá ser feito futuramente. Como perspectiva, posteriormente os ligantes/complexos da OPBTc poderão ser identificados pela técnica de espectrometria de massa e melhor estudados para a compreensão de como eles atuam na interação parasito-hospedeiro.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*, proteases, oligopeptidase B, *pull-down*, *BN-PAGE*.

ABSTRACT

Oligopeptidase B (OPB) was first isolated from *Escherichia coli*, its distribution is restricted to Gram-negative and positive bacteria, lower eukaryotes and plants. OPB has no mammalian orthologues, an important feature for a drug target. *Trypanosoma cruzi* oligopeptidase B (OPBTc) has been shown to participate in the process of parasite infection and is frequently mentioned as an important virulence factor for trypanosomatids. Identification of molecules that affect OPBTc enzymatic activity can serve as a template for the rational design of safer and more effective inhibitors, and thus with greater possibility of therapeutic success. In this context, the aim of the present study was to obtain OPBTc ligands to construct its interactome. In the attempt to obtain the ligands, affinity chromatography, pull-down, BN-PAGE and cross-linking techniques were used. The methodologies used did not allow obtaining ligands. However, in the western blotting of the insoluble fraction obtained after the interaction of rOPBTc with the host cell, it was possible to see a band of higher molecular weight than expected, which may indicate an eventual interaction of the enzyme directly with the host cell. In the BN-PAGE experiment, we demonstrated the migration pattern of rOPBTc, showing for the first time OPBTc as a dimer (160 kDa) in an electrophoretic technique. Significant efforts have been made to understand the structural and functional properties of OPBTc, however its physiological role is still unknown and its natural substrate has not been identified.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, proteases, oligopeptidase B, interactome, BN-PAGE.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

Doenças tropicais negligenciadas (DTNs) afetam predominantemente pessoas que vivem em países subdesenvolvidos. Alcançar o controle e eliminação dessas doenças é fundamental e possui a colaboração de diversas instituições interessadas como a Organização Mundial da Saúde – OMS - organizações não governamentais e algumas indústrias farmacêuticas. Essas doenças afetam principalmente populações que vivem em áreas de extrema pobreza, que possuem moradias inadequadas, falta de saneamento básico e de serviços de saúde, desnutrição, e outros fatores que conseqüentemente acarretam na disseminação dessas doenças (OPAS, 2017) (LINDOSO e LINDOSO, 2009).

As DTNs são caracterizadas por serem altamente prevalentes, marcadas por alta cronicidade, e por suas características de incapacidade, e estima-se que, atualmente, 1 bilhão de pessoas no mundo estejam afetadas por essas doenças – raiva, tracoma, treponematose endêmica, leishmaniose, filariose linfática, esquistossomose, doença de Chagas e outros - e aproximadamente 350.000 a 500.000 morrem anualmente. A maioria das DTNs é causada por parasitos, que incluem tanto helmintos, quanto protozoários (WINKLER e col., 2018). Segundo a OMS, 17 DTNs prejudicam a vida de muitas pessoas em 149 países, e nove dessas doenças afetam a população brasileira. Como são consideradas doenças de alta gravidade algumas necessitam que seja feita uma notificação obrigatória e são considerados prioritários para prevenção e controle (BRANDÃO e col., 2017).

Uma dessas doenças de importante interesse para as políticas públicas de saúde é a doença de Chagas que afeta de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo, principalmente na América Latina. A transmissão do *T.cruzi* ocorre principalmente pela via vetorial, através do inseto conhecido como triatomíneo. Assim, fazer o controle desses vetores se torna um método essencial para a prevenção da difusão dessa infecção (WHO, 2018). Além disso, abordagens como quimioterapias, saúde pública veterinária, água potável, saneamento e higiene adequada se tornam essenciais para o combate a essas doenças, no

entanto, o desenvolvimento de novos fármacos, vacinas, e de programas para o tratamento e prevenção dessas doenças não têm recebido atenção adequada (WINKLER e col., 2018) (WHO, 2013).

Nesse contexto, o estudo da doença de Chagas se faz importante por ser uma endemia considerada emergente e reemergente, devido aos desafios para o seu controle, como por exemplo, o desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, causa altos níveis de morbidade e mortalidade em países menos desenvolvidos, sendo considerado um importante problema de saúde pública, e também causa um impacto negativo para o desenvolvimento econômico e social (MARKEY e LIANG, 2012).

1.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) ou Tripanosomíase americana, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, foi descrita primeiramente pelo Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, em 1909, e até hoje, é considerada uma doença potencialmente fatal. A DC ocorre principalmente na parte continental da América Latina, porém, atualmente existem casos relatados no Canadá, nos Estados Unidos e em países europeus. Isso se deve, provavelmente, a mobilidade da população entre a América Latina e outros países (WHO, 2018).

A DC é considerada uma zoonose endêmica em 21 países do continente americano, e o *T. cruzi* é transmitido por triatomíneos comumente chamados de “barbeiros”, que transmitem o protozoário *T. cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida. Não existem vacinas disponíveis para essa DTN, e poucos fármacos antiparasitários estão disponíveis para tratar a fase aguda da doença, porém nenhum é eficiente para tratar a infecção na fase crônica (WHO, 2018) (FILIGHEDDU M. T., e col., 2017) (CUNHA-NETO e CHEVILLARD, 2014).

A transmissão da infecção ocorre principalmente pela via vetorial, quando as fezes infectadas do triatomíneo penetram no local da picada, ou através de contato com a mucosa. Além disso, existem outras formas de transmissão menos comuns, incluindo por transfusão sanguínea e congênita, acidentes laboratoriais, transplante de órgãos e ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas por *T. cruzi*. 30% dos indivíduos infectados desenvolvem uma infecção crônica que pode resultar em danos mais graves

como desordens digestivas com desenvolvimento de megas, arritmias, cardiomiopatias, dentre outros (COURA e DIAS, 2009) (NAVARRETE-SANDOVAL e SERVÍN-ROJAS, 2016).

1.2.1 Aspectos epidemiológicos

Estima-se que mais de 10.000 pessoas vão a óbito todo ano devido às manifestações clínicas que a DC acarreta, e 25 milhões de pessoas estão em risco de adquirir a doença. Essa enfermidade é considerada um importante problema de saúde pública devido à incapacidade que causa em pessoas infectadas. Cerca de 30% das pessoas infectadas cronicamente desenvolvem alterações cardíacas (WHO, 2018).

A distribuição geográfica dos vetores compreende desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile, e mais de 156 espécies foram descritas como capazes de transmitir o *T. cruzi*, mas nem todas são vetores em potencial. Seis espécies possuem uma importância epidemiológica, pois são domesticados – *T. infestans*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *T. sórdida*, e *R. prolixus*; *T. infestans* foi erradicado do Brasil, Uruguai e Chile, e sua eliminação ou controle em outros países da América do Sul está em progresso (COURA e DIAS, 2009) (GURGEL GONÇALVES e col., 2012).

No Equador, as principais espécies de vetores são o *Triatoma dimidiata* e *Rhodnius ecuatoriensis*, que é responsável por metade dos casos da infecção no país, enquanto outras espécies de vetores são responsáveis pela transmissão na região amazônica (WONG e col., 2016). O *T. cruzi* apresenta grande diversidade genética de acordo com sua distribuição geográfica, e é acreditado que isso pode estar associado com hospedeiros específicos e ciclos de transmissão, que pode demonstrar um importante papel na progressão da doença e nas suas manifestações clínicas, bem como na epidemiologia da doença de Chagas (ZINGALES e col., 2012). De acordo com a *Global Burden of Disease Study Group*, a estimativa anual de mortalidade global por doença de Chagas caiu de 12.699 para 10.611 casos por ano, entre os anos de 1990 a 2013 (COLLABORATORS GBD 2013 MORTALITY AND, 2015).

Na região da América Central, *T. cruzi* é considerado endêmico e se espalha principalmente em locais com condições mais pobres, onde a população rural é mais comumente infectada. Já na América Latina o número

de indivíduos infectados com *T. cruzi*, na década de 1980, era de 16 a 18 milhões, no entanto, com o passar dos anos, a criação de bancos de sangue com triagem e a criação de programas de controle de vetores ocasionou em uma diminuição da prevalência da doença de Chagas para cerca de 11 milhões de indivíduos infectados nos anos 1990, e 7,6 milhões de casos atualmente. No entanto, nessa mesma época houve um aumento no número de imigrantes latino-americanos nos Estados Unidos, com mais de 7 milhões de pessoas que saíram de países considerados endêmicos, resultando em um surto naquele país. Atualmente os Estados Unidos ocupa o sétimo lugar no hemisfério ocidental em número de indivíduos infectados por *T. cruzi* (MALIK e col., 2015).

O aumento do número de viajantes também afetou outros países. No Japão, foi identificado cerca de 4,5 mil imigrantes infectados que vieram de regiões endêmicas (SCHMUNIS, 2007). Aproximadamente 4.290 pessoas se encontram infectadas com *T. cruzi* em países europeus – Espanha, França, Itália, Holanda, Suíça, Reino Unido, Bélgica e Portugal – e, na maioria dos casos, a transmissão ocorreu por via congênita, onde as mães eram imigrantes da América Latina; acredita-se que haja cerca de 70 a 120 mil casos não informados de imigrantes (BASILE e col., 2011). Nas últimas décadas, a infecção por *T. cruzi* em países não endêmicos aumentou consideravelmente (WHO, 2013).

No Brasil, a ocorrência de casos e surtos por transmissão oral entre o período de 2007 a 2016 confirmados alterou o quadro epidemiológico da DC, ocasionando mudança de estratégias de prevenção e controle. Uma média de 200 casos é confirmada por ano, e a maior distribuição ocorre na região Norte do Brasil – 95% dos casos – e destes o estado do Pará se responsabiliza por 85% dos casos. Em relação à transmissão, 69% dos casos ocorrem por transmissão oral, 9% por transmissão vetorial e 21% não se identificou a forma de transmissão (BRASIL, 2015).

1.2.2 Manifestações clínicas da doença de Chagas

A doença de Chagas possui duas fases sucessivas: a fase aguda – que dura até 3 meses após a infecção pelo parasito - e a fase crônica. Na maioria das vezes, a fase aguda é assintomática ou não mostra sintomas específicos. Na fase crônica, os infectados com o parasito também podem não

apresentar sintomas, porém 30% podem progredir para as formas clínicas da doença, apresentando distúrbios cardíacos, digestivos e/ou neurológicos (WHO, 2013).

De acordo com Rassi Jr., e col., (2007), após 10 – 30 anos da infecção por *T. cruzi*, 60% a 70% dos indivíduos infectados não apresentam manifestações clínicas, configurando a forma indeterminada da doença de Chagas. Na forma indeterminada, os infectados apresentam somente evidência sorológica para a infecção, no entanto não apresentam evidência radiológica, clínica, eletrocardiográfica ou ecocardiográfica (TANOWITZ e col., 2016).

A fase aguda, geralmente, é diagnosticada como uma doença febril e apenas 1% dos pacientes apresentam infecção aguda grave com risco de vida devido à meningoencefalite ou miocardite, manifestando calafrios, febre, erupção cutânea, miocardite aguda, hepatoesplenomegalia, efusão do pericárdio e insuficiência cardíaca aguda. Um sinal clássico da fase aguda é um nódulo cutâneo denominado chagoma (descrito pela primeira vez por Mazza e Freire, 1940), ou edema palpebral indolor (sinal de Romaña) que podem indicar o local de inoculação do *T. cruzi*. O chagoma é caracterizado como uma lesão cutânea redonda avermelhada, indolor ou pouco dolorosa, endurecida, e que pode ou não ulcerar. Manifestações clínicas da doença quando adquirida por via oral (ingestão de alimentos e/ou bebidas contaminadas com fezes infectadas) costumam ser mais graves, pois parecem estar associadas a uma incidência maior de miocardite e uma taxa maior de letalidade quando comparadas à infecção por via vetorial (TANOWITZ e col., 2016) (BERN, 2015). Entre os sintomas clínicos, observa-se disfunção ventricular, com perda de ejeção sanguínea em até 50% (insuficiência cardíaca sistólica), conjuntivite, diarreia e adenomegalia (ANTUNES e col., 2016; WHO, 2018; STEVERDING, 2014).

Entre 20% a 30% dos pacientes infectados desenvolvem a forma cardíaca da doença, apresentando cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), podendo ser leve ou grave, remodelação e inflamação tecidual do coração, anormalidades estruturais e eventos tromboembólicos, fibrose, conseqüentemente resultando em uma insuficiência cardíaca (RASSI e col., 2017). Dez por cento dos indivíduos soropositivos podem apresentar manifestações digestivas, caracterizados pela presença de megaesôfago ou

megacólon, porém essa prevalência pode variar de acordo com a origem geográfica dos infectados e com a cepa do parasito (TANOWITZ e col., 2016). Determinantes genéticos podem influenciar na forma e gravidade das manifestações clínicas, onde a cardiomiopatia chagásica é a principal manifestação clínica da doença por causa da sua severidade, frequência, morbidade e mortalidade e é considerado um processo relacionado com vários fatores, como a persistência do parasito e uma resposta imune inapropriada ou desregulada do hospedeiro, que pode ser resultado de uma predisposição genética e/ou uma interação entre o sistema imunológico e o parasito (ALVARADO-ARNEZ e col., 2018) (TANOWITZ e col., 2016).

A cardiomiopatia chagásica é caracterizada por bradicardias juncionais, bloqueios atrioventriculares, taquicardia ventricular sustentada ou não, fibrilação atrial, e eventualmente esses pacientes podem progredir para uma cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva. Alguns eventos tromboembólicos como acidente vascular cerebral podem ocorrer consequentes à formação de um trombo no ventrículo esquerdo dilatado ou a um aneurisma (BERN, 2015).

A fase crônica da doença dura ao longo da vida resultando na baixa taxa de sobrevivência e que inclui um amplo espectro de manifestações. No sistema digestivo, onde a doença é menos frequente, a doença afeta esôfago e cólon, que pode manifestar desde distúrbios de motilidade assintomáticos e uma leve acalasia a um megaesôfago grave, com sintomas que incluem odinofagia, refluxo esofágico, disfagia, aspiração, regurgitação e tosse. Já o megacólon caracteriza-se por constipação prolongada que pode dar origem a fecaloma, isquemia intestinal e vôlvulo (BERN, 2015).

1.2.3 O tratamento quimioterápico

Para o combate ao parasito, a doença de Chagas pode ser tratada com dois medicamentos: benzonidazol e nifurtimox. Esses medicamentos são considerados de eficácia limitada (fase aguda, 50-80%; fase crônica, 8-20%), possuem muitos efeitos colaterais e alguns fatores influenciam na eficácia desses medicamentos, como a dose utilizada, idade, período de tratamento, origem geográfica do paciente e sistema imunológico do infectado (CARNEIRO e col., 2017). Se a doença for tratada no início da infecção, na fase aguda, a

eficácia do tratamento pode chegar a quase 80% de cura, no entanto, essa eficácia vai diminuindo com o passar do tempo de infecção (WHO, 2018). Esses fármacos estão disponíveis para tratamento há mais de 40 anos, e faz-se necessário a descoberta de novas terapias. Em alguns países, o nifurtimox foi proibido, provavelmente devido à sua baixa eficácia como tripanocida em regiões endêmicas, restando somente o benzonidazol, como no caso do Brasil. O benzonidazol é considerado altamente ativo na fase aguda da infecção, porém existem poucos estudos que confirmam a eficácia total do benzonidazol na eliminação do parasito (COURA e CASTRO, 2002) (SCARIM e col., 2018) (BENEFIT, 2015).

O tratamento também é indicado para pacientes na qual a infecção foi reativada, e para pacientes infectados já na fase crônica, pois o tratamento também pode prevenir ou reduzir a progressão da doença. Além disso, o tratamento correto pode prevenir a transmissão congênita, no caso de mulheres grávidas, e dessa forma os benefícios são considerados válidos em comparação aos possíveis efeitos adversos e longa duração do tratamento (até 2 meses) (WHO, 2018).

Alguns efeitos adversos foram relatados devido ao uso de nifurtimox e benzonidazol como anorexia, náusea, insônia, vômito, perda de peso, dor de cabeça, dor muscular, convulsões, neuropatias periféricas, sonolência, edema da mucosa, manifestações cutâneas, tontura, confusão mental, perda de equilíbrio, intolerância hepática, problemas de memória (SCARIM e col., 2018) (NASCIMENTO e col., 2018). Se houver abandono do tratamento, o parasito pode desenvolver resistência ao medicamento (APT e ZULANTAY, 2011).

Atualmente, os estudos para o tratamento da doença de Chagas têm se baseado no desenvolvimento de uma vacina preventiva ou na identificação de novos fármacos efetivos ou na associação de fármacos, pois não existem vacinas disponíveis para essa doença (DIAS, 2009). Antigamente, quando a doença foi recém descoberta, a falta de medicamentos eficazes e de inseticidas para o controle vetorial levou a um processo de melhoria das habitações a fim de prevenir a doença (CARNEIRO e col., 2017).

De acordo com a OMS, o fármaco ideal para o tratamento da doença de Chagas deveria seguir algumas características: eficácia em uma ou poucas doses, baixo custo, cura parasitológica durante a fase aguda e crônica, sem

indução de resistência, e ausência de efeitos colaterais ou teratogênicos (CARNEIRO e col., 2017).

Como não existe nenhum fármaco seguro e totalmente eficaz para o tratamento da doença de Chagas, compostos mais ativos para tratar a fase crônica da infecção são urgentemente necessários, devendo levar em conta a toxicidade na hora do desenvolvimento desses compostos. O desenvolvimento de medicamentos é considerado caro e demanda tempo, portanto, até poucos anos atrás, o interesse para desenvolver novos fármacos das grandes indústrias farmacêuticas era baixo. Uma alternativa seria a modificação da quimioterapia usada atualmente para diminuir sua toxicidade e aumentar a sua eficácia, e felizmente, o interesse para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos tem crescido (SCARIM e col., 2018) (CARNEIRO e col., 2017).

Dessa forma, o controle vetorial, saneamento básico, triagem sorológica e outras ações preventivas são considerados de grande importância e devem ser feitas constantemente a fim de prevenir a disseminação da doença, já que o *T. cruzi* possui uma grande variedade de reservatórios naturais, o que facilita a progressão e desenvolvimento da doença (WHO, 2018) (DIAS, 2009).

1.3 *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um organismo eucarioto que pertence ao reino protista, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, e família *Trypanosomatidae*. Já foram fornecidas várias evidências de que o *T. cruzi* é um organismo diploide, e já foram fornecidas evidências de que existe reprodução sexual nesses organismos (ZINGALES, 2011) (SMITH-CAVALIER, 2016). O *T. cruzi* caracteriza-se pela presença de somente um flagelo e do cinetoplasto – uma organela localizada na mitocôndria que contém DNA – que permite uma fácil identificação desses organismos, pois seu cinetoplasto é volumoso, ultrapassando os limites da membrana parasitária (BRENER, 1997).

O parasito apresenta características de acordo com o seu ciclo de vida, onde o cinetoplasto permite a identificação de cada forma no decorrer do seu ciclo biológico: tripomastigota metacíclico (estágio infectante da doença) na qual o flagelo se origina da bolsa flagelar, próximo ao cinetoplasto que é localizado na parte posterior do organismo, em posição terminal ou

subterminal; amastigotas (estágio evolutivo do parasito e que se multiplicam no interior da célula hospedeira) que são caracterizados por flagelos dificilmente notáveis e por sua forma arredondada; e epimastigotas (formas que se encontram dentro do vetor) onde a bolsa flagelar e o cinetoplasto se encontram em posição justaposta ao núcleo (BORGES, Bruna C e col., 2016) (BRENER, 1997).

1.3.1 Ciclo de vida do *T. cruzi*

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* é conhecido por ser um processo complexo, que envolve 2 hospedeiros – intermediário e definitivo (triatomíneo e o mamífero) e 4 formas morfológicas e bioquimicamente distintas de vida: as formas replicativas epimastigotas e amastigotas, e as formas não replicativas tripomastigota sanguíneas e metacíclicas. As formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas ocorrem ainda dentro do inseto, enquanto as outras 2 formas – amastigotas e tripomastigotas sanguínea – ocorrem dentro da célula do mamífero.

Resumidamente (Figura 1), o ciclo se inicia quando o inseto triatomíneo ingere sangue de um hospedeiro infectado com as formas tripomastigotas sanguíneas presentes na circulação. Os parasitos sobreviventes se transformam em formas epimastigotas no interior do triatomíneo, que é o hospedeiro invertebrado, e à medida que atingem o intestino posterior do inseto, sofrem metaciclogênese, mudando para as formas tripomastigotas metacíclicas, que são as formas infectivas presentes nas fezes e urina do inseto. Em um novo repasto sanguíneo esta forma parasitária é liberada pelas fezes e urina do inseto e penetra o tecido epitelial através da picada ou mucosa do hospedeiro vertebrado, difundindo-se na corrente sanguínea, transformando-se em tripomastigotas sanguíneas. Os tripomastigotas sanguíneos invadem diversas células do mamífero, como fibroblastos ou mioblastos, e no meio intracelular se diferenciam nas formas amastigotas, que se replicam por fissão binária, preenchendo o citoplasma das células hospedeiras. Após uma intensa multiplicação, os amastigotas saem dos vacúolos para o citoplasma, se replicando e diferenciando em tripomastigotas sanguíneos que conseguem afetar outras células vizinhas ou chegar ao sistema circulatório, que resulta no aumento da parasitemia, onde o ciclo pode

se reiniciar através de um novo repasto sanguíneo por um inseto não infectado (ALVES e col., 2017) (KESSLER, R.L., CONTRERAS, V.T., MAZZAROTTO, G.A.C.A., BATISTA, M., SOCCOL, V.T., KRIEGER, M.A. AND PROBST, 2017) (CARREA e DIAMBRA, 2016) (VANRELL e col., 2017).

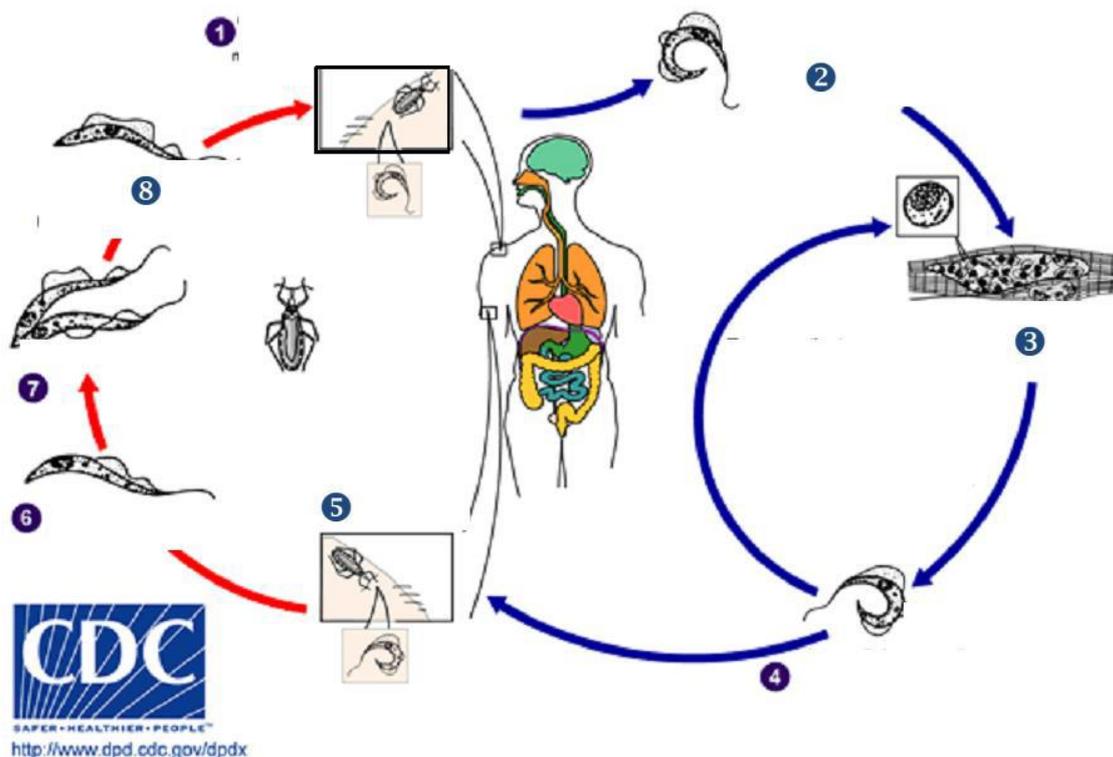


Figura 1. Ciclo de vida do *T. cruzi*. ❶ O triatomíneo ingere o sangue do hospedeiro vertebrado e libera os tripomastigotas metacíclicos (TM) do *T. cruzi* nas fezes e urina; ❷ os TM penetram em vários tipos celulares e dentro da célula se diferenciam em amastigotas; ❸ Os amastigotas se reproduzem por divisão binária e depois se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos (TS) na corrente sanguínea; ❹ os TS entram na circulação sanguínea e podem invadir novas células; ❺ o triatomíneo ingere o sangue do hospedeiro contendo TS; ❻ os TS se diferenciam em epimastigotas no intestino médio do triatomíneo; ❼ os epimastigotas se reproduzem por divisão binária; ❽ e se diferenciam em TM no intestino posterior. Fonte: CDC Image Library. Modificado de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trypanosoma_cruzi_LifeCycle.gif. Acessado em 18/05/2018.

1.3.2 Fatores de virulência em *T. cruzi*

Como demonstrado acima, o *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo e depende da participação de diversas moléculas para a interação patógeno-hospedeiro, e algumas moléculas funcionam como fatores de virulência ajudando no processo de infecção. Assim, os fatores de virulência podem ser definidos como moléculas produzidas por patógenos, onde a perda

dessa molécula impede especificamente a virulência, mas não a viabilidade do patógeno. Dessa forma, os fatores de virulência ajudam o patógeno a invadir e se estabelecer dentro do hospedeiro, sendo capazes de desenvolver estratégias de evasão do sistema imune do hospedeiro e causar a doença (FREIRE-DE-LIMA e col., 2015) (OSORIO e col., 2012).

Um número considerável de proteínas excretadas/secretadas pelo *T.cruzi* já foi identificado em nível funcional e estrutural, e desempenham funções importantes, onde tripomastigotas e amastigotas conseguem liberar microvesículas contendo diversos fatores de virulência envolvidos em: (i) desenvolvimento intracelular dos parasitos e invasão de células hospedeiras, como as proteínas trans-sialidasas, prolyl peptidyl cis-trans-isomerase, proteases e oligopeptidases, fosfolipases C e A1, MASP (proteínas de superfície associadas a mucina), proteínas específicas de amastigota P21, proteínas ricas em prolina, e proteínas de superfície de membrana; (ii) evasão do sistema imune; (iii) aumento do coração devido ao parasitismo, arritmia e inflamação. Além disso, algumas dessas proteínas também são usadas como marcadores para diagnóstico dessa patologia. As microvesículas que carregam esses fatores conseguem se ligar ao parasito e conferem proteção contra o ataque do sistema complemento ajudando no processo de invasão celular pelo *T.cruzi*. Além disso, já foi mostrado que as microvesículas estão envolvidas na transferência de material genético entre a célula do mamífero e o parasito e são capazes de induzir a produção e liberação de citocinas por meio da ativação dos receptores do tipo toll em macrófagos (WATANABE COSTA e col., 2016) (CESTARI e col., 2012) (BAYER-SANTOS e col., 2014) (GARCIA-SILVA e col., 2014) (NOGUEIRA e col., 2015).

Na invasão às células de mamíferos, algumas glicoproteínas presentes em tripomastigotas metacíclicos, como gp82, gp35/50 ou gp30, desencadeiam diversos eventos que levam a uma mobilização intracelular de Ca^{+2} no parasito e na célula hospedeira. Alguns derivados de cultura de tecido de tripomastigotas possuem componentes - como cruzipaina, oligopeptidase B, POPTc80, gp83 – que auxiliam na passagem pela matriz extracelular e invasão da célula hospedeira (BURLEIGH e ANDREWS, 1998) (YOSHIDA e CORTEZ, 2008). Por meio das moléculas de superfície da superfamília gp85/transialidase, o parasito se liga a fibronectina/laminina (OUAISSI e col.,

1986) (GIORDANO e col., 1994) e sinalizam o caminho para ação de algumas enzimas como a POPTc80, que hidroliza o colágeno (SANTANA e col., 1997) (GRELLIER e col., 2001) (BASTOS, Izabela M D e col., 2005). Ao encontrar o alvo celular, os tripomastigotas conseguem se aderir a ele através da Tc85 (ALVES e col., 1986), gp83 (VILLALTA e col., 2001) ou Tc-1 (AUGUSTINE e col., 2006). Em seguida, a oligopeptidase B (OPBTc) (BURLEIGH e AMDREWS., 1995) (CALER e col., 1998) gera uma sinalização pelo Ca^{+2} derivado de um precursor molecular não conhecido, auxiliando a invasão do parasito à célula hospedeira.

Ao entrar no organismo do hospedeiro vertebrado, o *T. cruzi* conta com uma série de enzimas que possuem um papel fundamental na desintoxicação de oxigênio reativo e espécies de nitrogênio que são produzidos durante a interação parasito-hospedeiro. No início da infecção, a molécula NAD(P)H, associada à membrana de macrófagos, é ativada e produz um forte oxidante e potente citotóxico contra *T. cruzi*. Dessa forma, algumas enzimas (TcCPX, TcMPX, TcTS) antioxidantes de *T. cruzi* atuam como uma primeira linha de defesa para lidar com essa oxidação. Análises proteômicas já mostraram uma supregulação de antioxidantes em tripomastigotas quando comparados a epimastigotas, tornando os parasitos mais resistentes ao peroxinitrito (citotoxina intrafagossomal que age contra patógenos) e conseqüentemente mais infecciosos. Em um estudo, foi mostrado que camundongos infectados apresentaram uma correlação direta entre os níveis de proteína de TcCPX, TcMPX, e TcTSy e a parasitemia encontrada, reforçando a ideia de que enzimas antioxidantes do parasito representam fatores de virulência envolvidos no processo de estabelecimento da infecção (PIACENZA e col., 2013) (OSORIO e col., 2012).

Outras moléculas importantes para o estabelecimento da infecção por *T. cruzi*, e bastante conhecidas, são as proteases, que possuem mecanismos moleculares e celulares envolvidos na invasão celular por esse parasito. Dessa forma, uma melhor compreensão sobre como essas moléculas auxiliam no processo de invasão do parasito podem aumentar as chances de descobrir novos agentes terapêuticos contra essa doença.

1.4 Proteases

As proteases são moléculas importantes que, como mencionado acima, auxiliam o *T. cruzi* no processo de infecção, podendo ser consideradas como potenciais fatores de virulência. Desde a identificação de proteases em extratos de epimastigotas na década de 1970, várias dessas enzimas foram purificadas e caracterizadas (ALVAREZ e col., 2012). Proteases foram originalmente estabelecidas (GRASSMAN e DYCKERHOFF, 1928) como um grupo de enzimas que degradam proteínas através da hidrólise de ligações peptídicas. Elas podem ser divididas em endopeptidases e exopeptidases (SILVA-LÓPEZ, 2010). As endopeptidases clivam principalmente em regiões internas de cadeias polipeptídicas. Já as exopeptidases executam sua atividade enzimática por hidrólise apenas nas extremidades N ou C terminal de cadeias polipeptídicas e são subdivididas em aminopeptidases e carboxipeptidases; as aminopeptidases agem em extremidades aminoterminais liberando um resíduo de aminoácido, dipeptídeo ou tripeptídeo, classificados como dipeptidil-peptidases e tripeptidil-peptidases; já as carboxipeptidases que liberam um dipeptídeo são classificadas como peptidil-peptidases (BARRETT e MCDONALD, 1986) (SILVA-LÓPEZ, 2010). De acordo com seu sítio catalítico, as proteases podem ser classificadas, de forma geral, em: cisteína-, metalo-, serino-, aspártico-, treonina- e glutamato-protease.

As cisteíno-proteases são consideradas uma superfamília de endopeptidases dependentes de tiol, e a maioria dessas proteases são membros da família da papaína. O grupo nucleófilo tiol da cisteína catalítica forma uma ligação covalente com o grupo carbonila da cisão da ligação peptídica em substratos. O mecanismo dessa protease se dá através de um modelo de acil enzima de três etapas que envolve uma tríade catalítica Cys-His-Asn análoga a Ser-His-Asp que é a tríade de serino-proteases. Essa protease compreende 82 famílias de enzimas classificadas em 14 clans (BARRETT e col., 2014) (BROCKLEHURST e PHILPOTT, 2013) (KĘDZIOR e col., 2016).

As cisteíno-proteases foram consideradas importantes no ciclo de vida do *T. cruzi* pela primeira vez em um estudo que mostrou que um inibidor da cetona fluorometil-peptidil causou a lise dos tripomastigotas de *T. cruzi*, porém sendo utilizado em altas concentrações (ASHALL e col., 1990). Uma importante

cisteíno-protease – calpaína - chamou a atenção de pesquisadores, visto que o estudo de suas propriedades pode ser uma alternativa para o tratamento da DC e da leishmaniose. Essas proteases foram encontradas em *T. cruzi*, *L. major* e *T. brucei* através de análises genômicas e algumas evidências mostraram que as calpaínas participam de vários processos celulares, diferentes vias de transdução de sinais e apoptose. Para avaliar a potencial função dessas cisteíno-proteases, os parasitos foram previamente tratados com anticorpo específico para calpaína, e o bloqueio dessas proteases levou a uma redução significativa na capacidade de adesão do *T. cruzi* ao intestino médio de *Rhodnius prolixus*. Além disso, o uso do anticorpo específico de calpaína na cultura de parasitos inibiu o processo de diferenciação para tripomastigotas metacíclicos em quase 50% quando usado na maior concentração do anticorpo (SANTOS e col., 2011). Outro importante estudo também mostrou que a diferenciação de tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* é sensível à inibição da atividade de cisteíno-proteases, através do uso de inibidores peptídicos derivados de diazometano (BONALDO e col., 1991).

As metaloproteases contêm um ou dois íons de metal no seu centro ativo e a maioria contém Zn^{2+} , e outros contêm Ni^{2+} , Cu^{2+} e Mg^{2+} , onde esses íons têm um papel de ativar a molécula de água, servindo como um nucleófilo em catálise. A maioria das metaloproteases contêm apenas um desses íons, e os que contêm dois desses íons são descritos como exoproteases. Essas proteases são produzidas em todas as espécies de plantas, microorganismos e animais, algumas agem na célula ou na membrana, enquanto outras são secretadas para o periplasma ou para fora da célula, sendo denominadas metaloproteases extracelulares. Nos mamíferos, podem ter importantes funções pois estão relacionadas a várias doenças como artrite, alguns tumores malignos e esclerose (RAWLINGS e BARRETT, 2004) (MALEMUD, 2006).

As metaloproteinases de matriz são proteases teciduais endógenas importantes na ação do *T. cruzi* durante a invasão ao hospedeiro. Sugere-se que essas metaloproteases sejam responsáveis pelo dano tecidual observado durante a invasão desse parasito no hospedeiro (DUASO e col., 2012). Para avaliar a participação de duas metaloproteases importantes (gelatinase A e gelatinase B), um estudo mostrou que houve aumento nos níveis de expressão dessas proteases durante a transmissão congênita do *T. cruzi* quando as

células foram incubadas com esse parasito, e a inibição dessas metaloproteases por doxiciclina impediu parcialmente o dano tecidual causado pelo *T. cruzi*, além de diminuir a carga parasitária dentro das vilosidades coriônicas que foram utilizadas para o experimento (CASTILLO e col., 2012).

Outro grupo pequeno de enzimas também tem ganho atenção da comunidade científica devido ao seu envolvimento com doenças, que são as aspártico-proteases. Essas proteases são popularmente conhecidas como proteases ácidas e são distribuídas em todas as formas de vida, incluindo bactérias, vírus, plantas, fungos e vertebrados, e participam de doenças como AIDS e candidíase. Essas enzimas possuem algumas funções, incluindo degradação da barreira tecidual do hospedeiro, destruição de moléculas de defesa, e suprir através da geração de nutrientes (FAIRLIE e col., 2000) (COOPER, 2002) (MADALA e col., 2010) (NAGLIK e col., 2003). Pesquisadores compararam a atividade de uma aspártico-protease – catepsina D – entre triatomíneos infectados ou não com *T. cruzi* e demonstraram, pela primeira vez, que esse parasito afeta a fisiologia digestiva do triatomíneo. Acredita-se que o *T. cruzi* module os níveis da atividade de proteases no intestino médio posterior do triatomíneo *R. prolixus*, aumentando a atividade da catepsina D. No entanto, o papel dessa aspártico protease no desenvolvimento e na metaciclogênese desse parasito ainda permanece desconhecido (BORGES, Erika C e col., 2006).

Mais de um terço das proteases humanas são serino-proteases, que são caracterizadas por um resíduo de serina catalítica que age como um nucleófilo, e está envolvida em uma ampla variedade de processos, como desenvolvimento, coagulação sanguínea, digestão, clivagem pro-hormonal, fibrinólise, resposta imune, fixação de complemento e transdução de sinal, degradação do tecido conjuntivo do hospedeiro, assimilação de aminoácidos, remodelagem do parasito e ativação de enzimas biologicamente ativas; seus representantes mais conhecidos são a tripsina e a quimiotripsina (SOUALMIA e EL AMRI, 2018) (SILVA-LÓPEZ, 2010). A oligopeptidase B, alvo de estudo dessa dissertação, é classificada como serino-protease e sua descrição será apresentada a seguir.

1.4.1 Oligopeptidase B (OPB)

Essa protease foi primeiramente isolada de *Escherichia coli* - chamada protease II - na qual mostrou substratos com especificidade para clivar o lado carboxi de resíduos básicos, com preferência para a arginina sobre a lisina e uma preferência a mais por dois pares adjacentes de resíduos básicos (PACAUD e RICHAUD, 1975) (BASTOS, I M D e col., 2013). A oligopeptidase B é composta por dois domínios: α/β hidrolase, onde está localizada a tríade catalítica conservada - Ser, Asp e His e o β propeller (GERCZEI e col., 2000) (POLGAR, 1997). Sua distribuição é restrita a bactérias Gram-negativas e positivas, eucariotos inferiores e plantas e não possui ortólogos em mamíferos, característica importante quando se pensa nesta enzima como alvo de droga. A presença da OPB em eucariotos foi mostrada, pela primeira vez, em *T. cruzi*, (CAZZULO, 2002) e suas implicações na doença de Chagas serão descritas a seguir.

1.4.1.1 Oligopeptidase B do *Trypanosoma cruzi* (OPBTc)

A OPBTc é uma protease alcalina que foi descrita primeiramente por Santana e colaboradores, mostrando uma massa molecular de 120 KDa, e é presente nas 4 formas de vida do *T. cruzi* e possui atividade proteolítica somente em tripomastigotas infectantes. É uma enzima citosólica que pertence ao clã SC, família prolyl oligopeptidase (POP) – família S9 – de serino-proteases, e são incapazes de clivar após prolina, porém ainda assim compartilham propriedades físico-químicas e estruturais com membros da família POP. São observadas em organismos superiores por participarem na maturação de peptídeos ativos, e estão relacionadas a várias patologias, como por exemplo, o Alzheimer (YOSHIMOTO e col., 1980) (KATO e col., 1980) (MEDICINA e BOTUCATU, 2006) (SANTANA, 1992) (RAWLINGS e col., 2006) (COETZER, e col., 2008).

Alguns resíduos de ácido glutâmico já foram encontrados em OPB de *Salmonella entérica* (OPBSe), o que sugere que pode definir uma especificidade para P1 e a atividade catalítica da OPB em relação ao sítio carboxila em resíduos básicos. Foi sugerido que OPBTc apresenta uma estrutura de dímero ativo, pois quando a proteína é totalmente desnaturada, migra como uma proteína de 80kDa de uma massa molecular aparente de

120kDa quando nativa, sem aquecimento prévio, que corresponde a um monômero para um estado dimérico. Porém a evidência de dímero estável da OPB somente por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) deixou dúvidas sobre a existência desse dímero. Por outro lado, uma montagem oligomérica de OPBTc em um dímero estável ativo foi recentemente demonstrado por ultracentrifugação analítica (AUC) (BASTOS, I M D e col., 2013).

Oligopeptidase B é encontrada no citosol de tripanossomatídeos, mas seu papel fisiológico ainda não foi bem elucidado, assim como seu substrato fisiológico também não foi identificado. Estudos mostram que a oligopeptidase B está diretamente relacionada com o influxo transitório de Ca^{2+} em células de mamíferos, provocando um recrutamento e fusão de lisossomos para o local de invasão do parasito, pois, diferentemente de outros parasitos, essa organela é necessária para a entrada do *T.cruzi* nas células do hospedeiro até completar o seu ciclo de vida, formando um vacúolo parasitóforo contendo o parasito. Sua participação na invasão celular ocorre por meio da geração de um agonista que ativa fosfolipase C da célula hospedeira resultando na formação de inositol trifosfato (IP3) e, conseqüentemente, na liberação de Ca^{2+} intracelular. No entanto, não se sabe se a produção desse agonista ocorre no citoplasma do parasito ou no meio extracelular pela OPBTc secretada (BURLEIGH e ANDREWS, 1995) (RODRIGUEZ e col., 1995) (FERNANDES e col, 2005). Segundo Caler (1998), a deleção do gene que codifica OPB resultou em uma redução significativa da capacidade de infecção pelo *T.cruzi*, e em adição, a OPBTc recombinante purificada foi capaz de restaurar a sinalização de Ca^{2+} no mutante (CALER e col, 1998).

Com o exposto acima, observa-se que têm sido feitos esforços significativos para a compreensão das propriedades estruturais e funcionais da OPBTc, para ajudar a elucidar o papel dessa enzima na infecção pelo parasito. Na investigação biológica, a maioria das proteínas funciona normalmente como um componente de complexos contendo outras macromoléculas específicas a fim de realizar processos biológicos montando uma rede de interações capaz de conectar múltiplas e diferentes etapas celulares (CUSICK e col., 2005). Interações proteína-proteína são fundamentais para todos os processos biológicos e a determinação de interações que possam ocorrer em um

organismo ou inter-organismos é de grande valia para entendimento de processos celulares como crescimento e metabolismo celular, interação patógeno-hospedeiro, entre outros.

1.5 Complexos proteicos e análises proteômicas

Interações entre macromoléculas desempenham papel biológico no interior celular e são regulados por uma rede de interações complexas entre as proteínas. Complexos de proteínas podem desempenhar funções importantes na célula, seja através de funções especializadas de máquinas macromoleculares, ou através de complexos de sinalização transitória, e dessa forma determinar as estruturas de complexos de proteínas essenciais para a compreensão mecanicista da célula (BULLOCK e col., 2018). Nos últimos anos, o trabalho em proteômica tem demonstrado as inter-relações entre diversas moléculas com a finalidade de compreender o comportamento global de sistemas biológicos, já que muitas proteínas homólogas conseguem interagir entre si (UETZ e col., 2000) (RAIN e col., 2001) (ALOY e col., 2005).

Vários métodos têm como objetivo identificar as interações entre proteínas em um organismo, e dentre esses métodos podemos citar a purificação por afinidade (GAVIN e col., 2002), BN-PAGE, co-precipitação (MANN e col., 2001), ensaios de duplo-híbrido (ITO e col., 2001) que são amplamente usados para vários organismos.

2. JUSTIFICATIVA

Já é de conhecimento que o processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, com baixas probabilidades de sucesso para ser aprovado, e podendo alcançar 13 anos até a formulação chegar ao mercado (TEIXEIRA, 2007). Por outro lado, os fármacos podem aumentar a expectativa de vida das pessoas, tratar doenças como a doença de Chagas, que é um importante problema de saúde pública, e assim trazer benefícios sociais e econômicos para a população. O tratamento da doença de Chagas é antigo, causa diversos efeitos adversos, e não são eficazes na fase crônica da doença. Dessa forma, pesquisadores tem se esforçado para identificar e caracterizar alvos específicos para o desenvolvimento de potenciais fármacos para tratar essa doença (PROD e col., 2018).

O desenvolvimento de drogas é um processo desafiador e que exige bastante tempo; da descoberta de um composto com atividade biológica desejável ao teste clínico de uma droga baseada no mesmo pode-se demorar mais de uma década. Portanto, é necessária uma abordagem multidisciplinar para a otimização de cada uma das etapas desse processo, de modo a evitar desperdício de tempo e de recursos financeiros. O conjunto dessas abordagens multidisciplinares forma a base do desenvolvimento racional de drogas (MANDAL, MOUDGIL e col., 2009). A biomolécula alvo deve possuir, além de um papel importante na infecção, características estruturais específicas que garantam a possibilidade de modulação por pequenas moléculas. Reunidas, essas características definem a drogabilidade do alvo.

Além de ser um fator de virulência do parasito, a vantagem de se utilizar a OPBTc como alvo potencial de droga reside na ausência de ortólogos em mamíferos (VENALAINEN e col., 2004). Em teoria, isso facilitaria o desenvolvimento de drogas seletivas, isto é, com menor possibilidade de efeitos colaterais ao homem.

Dentro deste panorama, a identificação de substâncias com comprovada atuação na OPBTc podem servir de molde para o desenho racional de inibidores mais eficazes e seguros e, portanto, com maiores possibilidade de êxito terapêutico. Além disso, o estudo do interatoma desta protease irá acrescentar mais conhecimento sobre o seu papel na biologia do parasito e no desenvolvimento e instalação da infecção.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo identificar os ligantes à oligopeptidase B de *Trypanosoma cruzi*. Para tal, foram realizados os seguintes objetivos específicos:

a) Interação da rOPBTc com o extrato protéico do parasito

i. Com ou sem *cross-linker*

Recuperação da rOPBTc após interação com o extrato proteico do parasito por meio de:

ii. Resina de afinidade Ni-agarose

iii. *Pull-down* (sem *cross-linker*)

b) Interação da rOPBTc com células de mamíferos

i. Com ou sem *cross-linker*

c) Análise, por meio de *BN-PAGE*, dos complexos protéicos existentes nas formas epi-, tripo- e amastigota do parasito.

4. METODOLOGIA

4.1 Manutenção das culturas de células

4.1.1 Cultura de epimastigotas de *T. cruzi*

Epimastigotas da cepa C. L. Brener foram cultivados com meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) a 28°C na estufa e gentamicina 100µg/mL. Para uso nos experimentos, as células foram centrifugadas a 1000 x g por 10 min e o pellet lavado 3 vezes com PBS (tampão salina fosfato) 1X estéril.

4.1.2 Cultivo de células Vero

Células Vero foram cultivadas em meio DMEM suplementado com SFB (soro fetal bovino) 2% (v/v) e 100µg/mL de gentamicina a 37°C e 5% de CO₂.

4.1.3 Infecção de células de mamífero para obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi*

A infecção foi estabelecida durante 7-15 dias, com aproximadamente 10 parasitos por célula (8×10^4 células/cm²). Os tripomastigotas liberados foram coletados e centrifugados a 1000 x g por 10 minutos. O pellet com as formas tripomastigotas foi lavado 3 vezes com PBS 1X estéril e armazenado a -80°C.

4.1.4 Obtenção das formas amastigotas de *T. cruzi*

Formas tripomastigotas foram incubadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) pH 5.0 sem SFB (Soro Fetal Bovino), a 37°C e 5% CO₂ durante 9 h (TOMLISON et al., 1995; HERNANDEZ-OSORIO et al., 2010). As formas amastigotas foram coletadas e centrifugadas a 1000 x g.

4.2 Expressão da oligopeptidase B recombinante

A expressão e purificação da oligopeptidase B foi realizada de acordo com o protocolo de Motta, 2012. Brevemente, a OPBTc foi induzida com 0,5mM de IPTG e, após a incubação, foi centrifugada e o sedimento das bactérias foi lisado em BugBuster (Novagen) e DNase. As bactérias foram ressuspensas em 7mL de BugBuster contendo 1µl de DNase através da

pipeta sorológica para homogeneização; as bactérias foram deixadas sob agitação constante no shaker por 10 min, para a lise das bactérias e obtenção dos corpos de inclusão. Após esse procedimento, o lisado bacteriano foi centrifugado a $14500 \times g$ por 5 min para a obtenção da fração solúvel contendo a rOPBTc. As frações solúveis e insolúveis foram analisadas posteriormente. A purificação foi feita por cromatografia de afinidade, usando a resina His-Bind, de acordo com Motta, 2012.

As amostras obtidas foram passadas em coluna contendo a resina His-Bind (GE Healthcare) com níquel, que foi previamente equilibrada. A coluna foi lavada primeiramente com 3 volumes de água (1,5mL), e depois com 5 volumes (2,5 mL) de tampão *binding buffer* contendo 0,5 M NaCl, 20mM Tris-HCl e 20mM de imidazol, e a proteína recombinante foi eluída com 20mM, 80mM e 250mM de imidazol. As frações obtidas pela purificação foram então analisadas através de gel SDS-PAGE 10% sob condições desnaturantes e redutoras, e a proteína foi confirmada por análise através de *Western blotting* usando anticorpo anti-His e anticorpo específico anti-OPBTc.

4.3 Western Blotting

A amostra de interesse foi separada por SDS-PAGE e transferida para uma membrana de nitrocelulose (Amershan™ Potran® Supported, GE Healthcare) em sistema MiniProtean®3 Cell (BioRad) de acordo com o estipulado pelo fabricante. A membrana contendo a amostra de interesse foi bloqueada com TBS (Tris buffered saline – 50mM e 150mM NaCl) e leite 5% (v/v) durante 1h. Após o bloqueio, adicionou-se TBS leite 1% (v/v) contendo o anticorpo específico de interesse e a membrana foi sensibilizada 12h a 4°C. Após esse passo, a membrana foi lavada com TBS Tween 20 0,1% (v/v) por 4 vezes durante 5 min. Em seguida adicionou-se o anticorpo secundário – *goat-anti mouse IgG horseradish peroxidase conjugated* (1:30000) em TBS leite 1% (v/v) e este foi incubado por 2h a temperatura ambiente. Antes da revelação, a membrana foi lavada 7 vezes com TBS Tween 20 0,1% (v/v) por 5 min (cada lavagem). Para a revelação, utilizou-se o substrato quimioluminescente de peroxidase (ECL™ *Prime Western blotting detection* reagente, GE Healthcare) de acordo com o descrito pelo fabricante e a visualização foi realizada no equipamento *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare).

4.4 Preparação do extrato solúvel proteico de *T. cruzi*

A cultura de epimastigotas de *T. cruzi* foi centrifugada a 2000 x g por 10 min e lavadas 3 vezes com PBS. Ao final das lavagens 400µL de PBS foi adicionado a 1×10^8 parasitos e a amostra foi congelada e descongelada 3 vezes para desestabilização da membrana resultando na lise celular. Em seguida, a amostra celular resultante foi centrifugada a 13.500 x g por 10 min para separação dos extratos solúvel e insolúvel que foram analisadas posteriormente.

4.5 Testes para obtenção dos ligantes à OPBTc:

4.5.1 Com resina de Ni-agarose

O extrato solúvel proteico de 1×10^8 epimastigotas foi incubado com 10 µg de OPBTc a 25°C por 2 h sob agitação constante no shaker. Para recuperar os complexos, os mesmos foram adicionados à resina de afinidade (GE healthcare) previamente equilibrada, e deixados em incubação por 20 min à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas – 1000 x g por 5 min – para recuperar a OPBTc ligada à resina. A resina foi lavada com tampão 25µM Tris pH 8,0 na presença de 10µM de imidazol seguida por uma eluição com tampão 25µM Tris pH 8,0 na presença de 250 µM de imidazol. As frações resultantes foram analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com prata e/ou comassie-blue.

Em seguida, um novo teste de complexos foi feito sob as mesmas condições anteriores, porém com algumas otimizações. Adicionou-se um controle a mais, onde 10µM do inibidor antipaína foi colocado em interação com 40µg de rOPBTc, e foi deixado em incubação por 20min, antes de promover a interação rOPBTc + extrato total (15×10^8 epimastigotas previamente lisados). Os 3 controles foram deixados em interação a 18°C, *overnight*, sob agitação constante.

4.5.2 Com resina de Ni-agarose + *cross-linking* químico

Previamente, formaldeído na concentração de 1% foi adicionado nos 4 eppendorfs que estavam em interação (+, + com inibidor, - extrato total, - rOPBTc), e foi deixado agir por 2 hrs, sob agitação constante a 37°C. Após a

interação 0,150M de glicina foi adicionado e incubado em temperatura ambiente por 5 min. Após esses procedimentos, o teste continuou normalmente, e a interação com OPBTc ou não foi feita a 18°C, *overnight*, sob agitação constante (KLOCKENBUSCH e KAST, 2010) (SUTHERLAND e col., 2008).

O formaldeído consegue ligar-se eficientemente e bloquear a funcionalidade proteica de alguns vírus, e dessa forma supõe-se que o formaldeído pode funcionar igualmente bem em complexos proteicos, pois acredita-se na ideia de que esses complexos podem ser “congelados” no seu estado funcional específico, purificado e caracterizado por espectrometria de massas, contribuindo para o estudo de interações proteína-proteína (SUTHERLAND e col., 2008).

4.6 Pull-down

Dynabeads (Invitrogen) foram ressuspendidos e colocados no vortex para tornar uma solução homogênea. Utilizou-se 50µl (2mg de Co) de *dynabeads* para cada controle, e depois de homogeneizados estes foram colocados em contato magnético para separar as *beads*. 350µl de rOPBTc previamente purificada foi adicionada a 350µl de tampão 2X *binding/wash buffer* (100mM fosfato de sódio pH8.0, 600mM NaCl, 0,02% Tween-20) e a amostra foi ressuspendida e deixada em incubação por 10min sob agitação constante no shaker. Em seguida, as amostras foram colocadas em contato magnético para separação das *beads*; as quais foram então lavadas 6 vezes com 300µl de *binding/wash buffer*. Enquanto isso a amostra de extrato total (1 x 10⁹ epimastigotas) previamente lisada foi adicionada ao tampão *protein pull-down* (6,5mM fosfato de sódio pH7.4, 140mM NaCl, 0,02% Tween-20), e essa amostra foi adicionada às *beads* que foram previamente preparadas e adicionadas ou não à rOPBTc, deixando-as em incubação por 30min sob agitação constante no shaker, à temperatura ambiente. Em seguida, as *beads* foram novamente colocadas em contato magnético para separação e as frações foram analisadas em gel SDS-PAGE. As *beads* foram lavadas mais 6 vezes com tampão *binding/wash buffer*, e depois de lavadas, tampão *His-elution buffer* (300mM imidazol, 50mM fosfato de sódio pH8.0, 300mM NaCl, 0,01% Tween-20) foi adicionado às amostras, para fazer as eluições, e deixado

em incubação por 5 min. Após o tempo de incubação, as amostras foram colocadas em contato magnético para separação das *beads*. Todas as frações resultantes foram analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE (SEE e ISOLATION, 2017)).

Foi feito um novo experimento de *pull-down*, porém adicionou-se mais um controle (acrescido de inibidor de protease), onde o extrato total (1×10^8 epimastigotas) foi lisado com tampão NP40 (150mM NaCl, 1% NP40, 50mM Tris pH8.0) + coquetel de inibidor de protease 1X. Posteriormente seguiu-se todas as etapas conforme descrito anteriormente, porém a interação de rOPBTc + extrato total lisado foi feita em 1 hr a 37°C. Foram feitas 3 lavagens e 4 eluições, e as frações foram analisadas em gel SDS-PAGE. Outro experimento *pull-down* foi feito com um novo controle (negativo com inibidor de protease), que também foram analisados em gel SDS-PAGE.

4.7 Célula de mamífero (VERO) + OPBTc

Células VERO com uma confluência de 70%, previamente cultivadas, foram tripsinizadas e inativadas com DMEM gelado. As células foram acondicionadas em falcon e o meio de cultura, juntamente com a tripsina, foi retirado por centrifugação – $1.800 \times g$ por 3 min a temperatura ambiente. Dois controles foram previamente permeabilizados com 0,2µl de Triton X-100 e foi deixado em incubação por 10 min a 4°C, e em seguida, as amostras foram centrifugadas – $1.800 \times g$ por 3 min - e lavadas 2 vezes com 1 mL de Tris 25mM pH8 NaCl 150mM. Células Vero foram expostas ou não a 100µg de OPBTc durante 15 min em 1 mL de Tris 25mM pH8 NaCl 150mM. Após a interação, uma nova centrifugação foi feita – $1.800 \times g$ por 3 min – e o tampão contendo ou não a OPBTc foi retirado e adicionou-se formaldeído na concentração final de 1% (volume final de 1 mL), que foi incubado em temperatura ambiente por 10 min. A solução de fixação foi removida novamente por centrifugação sob as mesmas condições anteriores e 0,125M de glicina foi adicionado às células para que o formaldeído fosse completamente inativado. Este procedimento teve uma duração de 5 min, e logo depois a glicina foi removida por centrifugação – $1.800 \times g$ por 3 min - e as células foram lavadas 2 vezes com 1 mL de PBS gelado. As células lavadas foram lisadas em 150µl de RIPA buffer (50mM Tris HCl, pH8,0, 150mM NaCl,

1% NP40, 0,5% desoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 1mM EDTA, inibidor de protease) durante 60 min a 4°C. Após a lise, as células foram centrifugadas durante 30 min a 20.000 x g a 4°C para remover os detritos insolúveis e as frações resultantes foram diretamente armazenadas a - 80°C (KLOCKENBUSCH e KAST, 2010).

4.8 Blue Native Page (BN-PAGE) para análise de complexos proteicos

4.8.1 Preparo de amostras

Amostras das formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas foram obtidas a partir de cultura específica, onde, respectivamente, 1×10^8 , 1×10^8 e 1×10^7 de parasitos foram lisados em solução *BN-Lise buffer* (Bis-Tris 20mM, Ácido aminocapróico 500mM, NaCl 20mM, EDTA 2mM, Glicerol 10%, Triton x-100 0,1%) e a fração insolúvel foi separada por centrifugação – 10.000 x g por 30 min (SWAMY e col., 2012) (FIALA e col., 2011).

4.8.2 Primeira e segunda dimensão do BN-PAGE

O *BN-PAGE* foi feito com 2 géis, um separador com gradiente de 5-18% e um concentrador a 4%. Foi realizado uma corrida das amostras aplicadas a uma corrente constante de 15mA, após a montagem do sistema, e após a corrida o gel foi submetido a fixação utilizando uma solução fixadora (etanol 50%, ácido fosfórico 3%), e as amostras que foram submetidas a *western blotting* não foram colocadas em solução de fixação (FIALA e col., 2011) (SWAMY e col., 2012).

Uma quantidade determinada de complexos é retirada da primeira dimensão do *BN-PAGE* e submetida a segunda dimensão. A amostra é incubada por 2 horas em tampão desnaturante (1% β -mercaptoetanol e 1% de SDS 10%) e lavada várias vezes com água já que o β -mercaptoetanol inibe a polimerização. O gel corre durante 10 horas a uma corrente de 25mA constante e corado com nitrato de prata.

4.9 Coloração dos géis com nitrato de prata

Os géis corados com nitrato de prata foram incubados *overnight* com solução de fixação (metanol 50%, ácido acético 12%, formaldeído 0,05%), e em seguida, foram submetidos a uma lavagem de 20 min com metanol 50%.

Na sequência, o gel foi incubado com 0,02% de tiosulfato de sódio (p/v) por 1 min e depois foi lavado 3 vezes por 20 segundos com água ultra-pura. A solução de impregnação foi feita com 0,2% AgNO₃, 0,075% formaldeído por 20 min e após foram feitas 2 lavagens de 20 segundos com água ultra-pura. A solução reveladora – 6% NaCO₃ (w/v), 0,05% formaldeído e 0,4mg tiosulfato (w/v) – foi adicionada e o gel foi incubado por 10 min. Após o tempo de revelação, a reação foi parada com solução 50%metanol e 12% ácido acético.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Expressão e purificação da proteína recombinante OPBTc

Inicialmente foi feita a expressão de rOPBTc na fração solúvel BL21(DE3) (Figura 2), após a indução com 0,5mM de IPTG *overnight* a 20°C sob agitação constante, e logo após as bactérias foram centrifugadas a 3000 x g por 20 min. Posteriormente um teste com anticorpo específico anti-OPBTc foi realizado através da técnica de *Western blotting*, que indicou a presença de rOPBTc (80kDa) ligada a cauda de histidina, pelo sistema de expressão bacteriano por *E. coli*. A bactéria obtida pela indução que continha a proteína recombinante foi utilizada para purificação por cromatografia de afinidade com a resina His-Bind (GE Healthcare) que continha níquel.

As frações contendo proteína recombinante rOPBTc foram dialisadas e concentradas em filtro Amicon® 10K (Millipore) na velocidade de 1000 x g por 10 min a 4°C, e posteriormente foram levadas para quantificação no aparelho Qubit 2,0 (Invitrogen, EUA), obtendo 0,8µg/ul de proteína. A rOPBTc foi diluída em glicerol (1:1) e estocada a -20 °C para utilização em ensaios futuros.

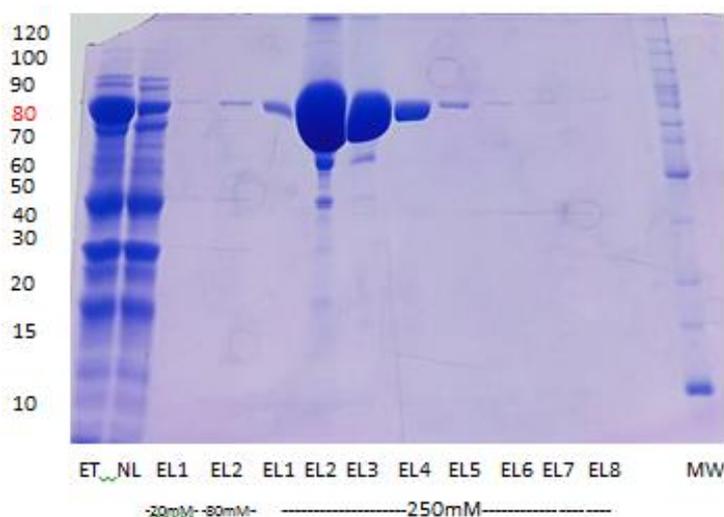


Figura 2. Purificação da fração solúvel de rOPBTc. Foi feita transformação em BL21DE3 e indução e posteriormente purificação por cromatografia de atividade em níquel, utilizando His-tag, onde foram recolhidos: ET – extrato total; NL – não ligado; e foram feitas as devidas eluições, onde EL1 – 20mM = eluição feita com 20mM de imidazol de Binding Buffer; EL2 – 80mM = eluição feita com 80mM de imidazol de Binding Buffer; e EL1 a EL8 – 250mM = eluições feitas com 250mM de imidazol de Binding Buffer. Em cada poço foi aplicado 10µL de cada amostra; gel 10% corado com azul de Coomassie Blue.

5.2 Detecção de rOPBTc por anticorpo específico anti-OPBTc

Inicialmente foi feito um teste para 2 anticorpos específicos anti-OPBTc (AC1 e AC2) que tinham no laboratório, e foi utilizada a proteína recombinante previamente purificada, rOPBTc. Para cada anticorpo foram feitas três diluições (1:200, 1:100, 1:50), e foi utilizado um controle com o anticorpo anti-HIS, como mostra a figura 3.

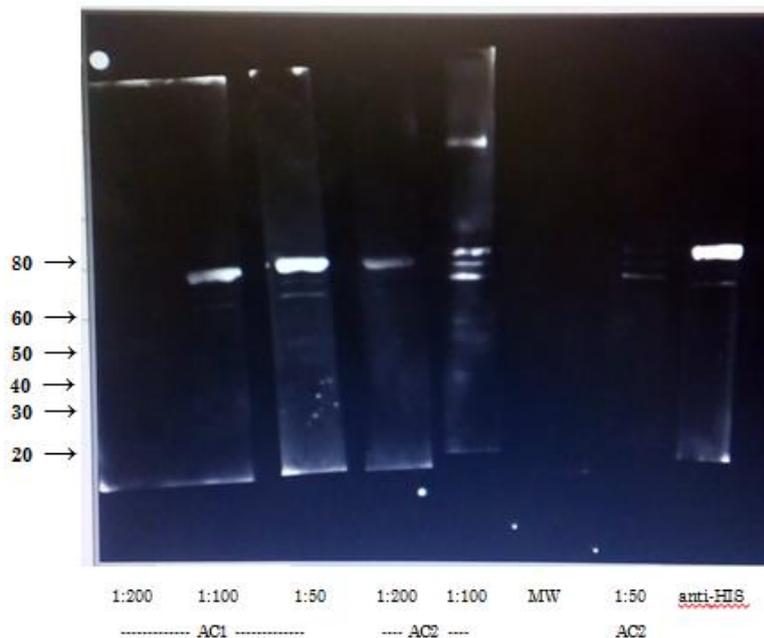


Figura 3. Western blotting da proteína recombinante com anti-OPBTc. Western blotting dos anticorpos policlonais anti-OPBTc nas seguintes diluições: 1:200, 1:100 e 1:50 e controle anti-HIS. Foram utilizadas 3µg de rOPBTc em cada poço para reatividade com anti-OPBTc.

As marcações de bandas na altura de 80kDa foram melhor observadas quando a rOPBTc foi incubada com o AC1 diluição 1:50, mostrando que houve reatividade com o antígeno rOPBTc. Porém quando foi feita a diluição 1:200 o AC1 não mostrou reatividade, diferentemente do AC2 que observa-se uma marcação, ainda que fraca. Ainda em relação ao AC1, observou-se que a diluição 1:50 mostrou uma reatividade maior, como já esperado. Por outro lado, o AC2 praticamente não mostrou uma marcação melhor estabelecida, quando comparado ao AC1, e dessa forma esse anticorpo (AC2) foi descartado para experimentos futuros.

5.3 OPBTc imobilizada em resina de Ni-agarose

Na tentativa da obtenção do(s) ligante(s) da OPBTc, o primeiro experimento realizado foi a imobilização da OPBTc em resina de Ni-agarose para interação com o extrato de proteína total da forma epimastigota do parasito. Na primeira condição 10µg de proteína rOPBTc foi colocada em interação com extrato total de 1×10^9 epimastigotas a 25°C no shaker por 2 horas, no qual foi possível observar a presença de uma marcação de banda na altura de 110kDa (Fig. 4A), que não estava presente no controle negativo. Porém, a marcação da banda pode ser resultado de proteínas provenientes da purificação; dessa forma, foram feitos outros testes para confirmação dessas marcações no controle positivo.

Já na segunda condição, foram utilizados 4 condições em duplicata para verificar o efeito do tempo na interação, onde 4 condições foram deixados em interação *overnight*, e os outros 4 condições foram deixados em interação por 4 horas, e além disso foi utilizado um inibidor da protease oligopeptidase B – antipaína. As condições foram mudadas deixando a interação por maior tempo e conseqüentemente foi utilizada uma temperatura mais baixa para não interferir na interação e o resultado foi analisado em gel SDS - PAGE 8% para pegar a maior quantidade de proteínas possível. Além disso, o inibidor de protease antipaína foi utilizado para impedir que outras proteases se ligassem ao complexo. Na análise dos géis as mesmas bandas presentes acima da altura da proteína de interesse (OPBTc) no controle positivo foram observadas também no controle negativo (Fig, 4B e C), que sugere que provavelmente essas bandas são provenientes do extrato total.

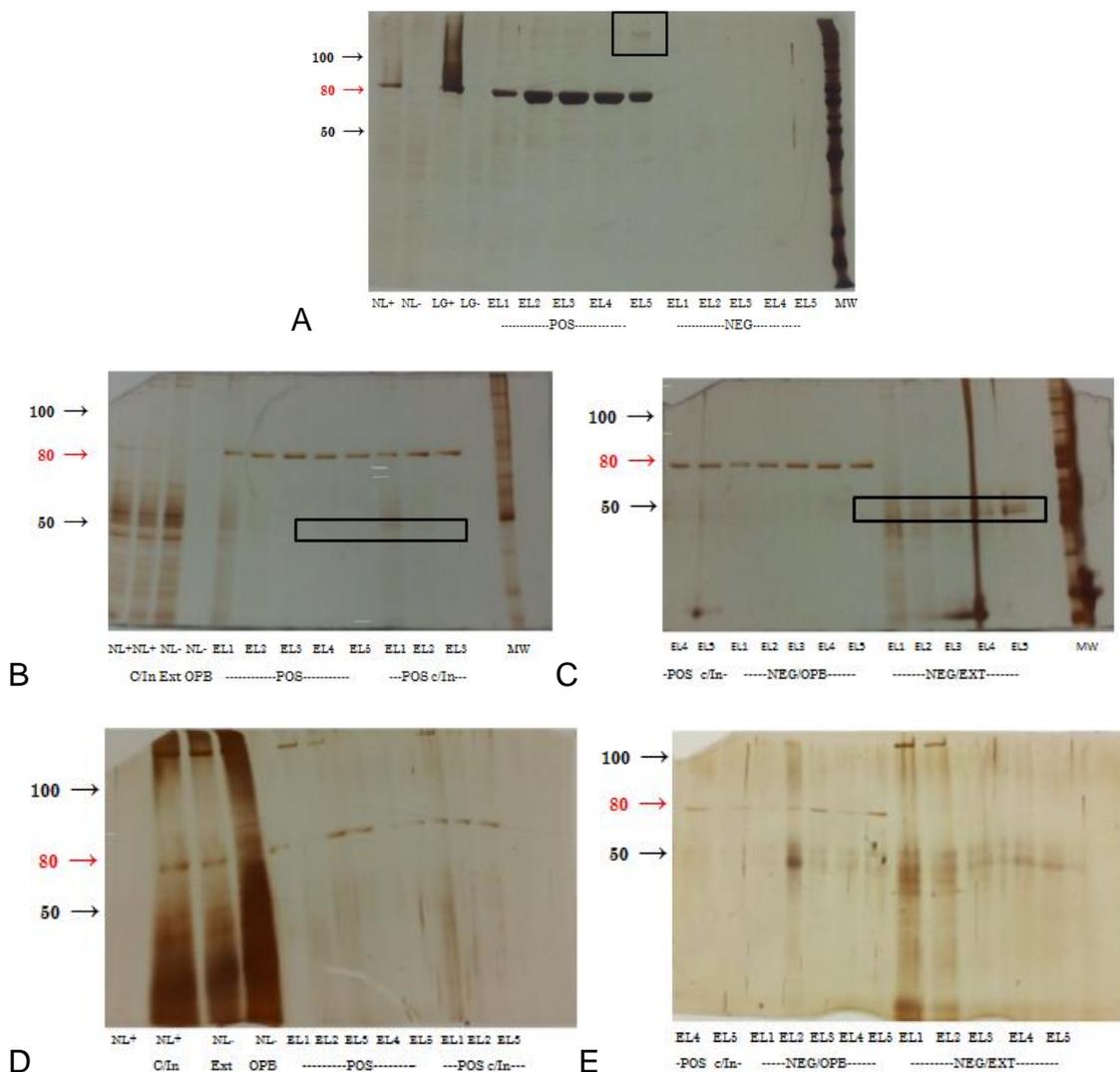


Figura 4 Teste de complexos. Testes de interação entre rOPBTc (10 μ g) e epimastigotas (1 x 10⁹). A.: Gel SDS 10% - foi feita ou não a interação entre os parasitos com rOPBTc a 25°C no shaker por 2 horas, onde: NL = não ligado; LG = ligado; EL1 a EL5 = as respectivas eluições de cada controle. B e C.: Gel SDS 8% - interação a 18°C no shaker por 4 horas, com os seguintes controles: OPB + ET (positivo), OPB + antipaína + ET (POS com inib.), ET + tampão (negativo do ET), OPB + tampão (negativo da OPB). D e E.: Gel SDS 8% foram utilizados os mesmos controles da figura B e C, porém esses controles foram deixados em interação *overnight*. POS = controle positivo; POS c/In = controle positivo com inibidor de protease; NEG/OPB = controle negativo, somente com OPB; NEG/EXT = controle negativo somente com extrato de epimastigotas. Em cada poço foi aplicado 20 μ L de cada amostra e os géis foram corados com nitrato de prata.

Na terceira condição (Fig 4D e E) as mesmas bandas que apareceram na parte de cima do controle positivo também apareceram no controle negativo, contrariando a primeira condição realizada. Nenhuma das condições foi utilizada coquetel de inibidor de protease, que poderia ter ajudado na inibição

de uma possível degradação geral de proteínas em tecidos ou extratos celulares por proteases endógenas.

5.4 Teste com *cross-linking*

No nosso experimento o formaldeído foi utilizado em 3 concentrações: 1%, 2% e 4%, para analisar se a concentração influenciava no resultado. 6µg de rOPBTc foi incubada com formaldeído nas devidas concentrações, por 2 horas no shaker a 37°C e a reação foi parada com 150mM de glicina (Fig. 5A). A partir desse experimento foi feito um *western blotting* para tentar observar a formação de algum complexo com o *linker*. Em um novo gel, foi feito o mesmo experimento que o anterior, porém com uma condição a mais – OPB com tampão sem B-mercapto e sem DTT, porém fervida (OPB/ferv.) (Fig. 5B).

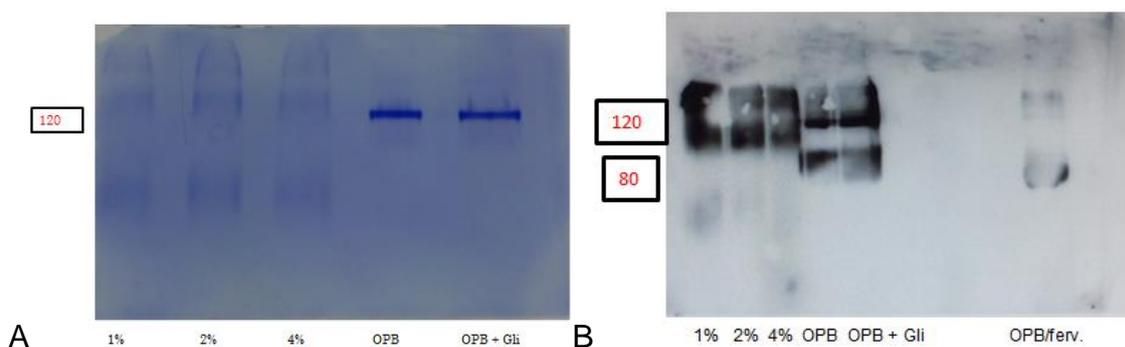


Figura 5 Teste com *cross-linking*. A: rOPBTc com formaldeído nas concentrações de 1%, 2%, e 4%; foi utilizado um controle com rOPBTc + tampão (OPB), e um segundo controle com rOPBTc + tampão + glicina (OPB + Gli). Em cada poço, foi aplicado 25µL de cada amostra; gel de acrilamida 8% corado com azul de Coomassie Blue; B: *Western blotting* da interação da rOPBTc com formaldeído nas concentrações de 1%, 2%, e 4%; foi utilizado um controle a mais OPB + tampão fervida (OPB/ferv.). Em cada poço, foi aplicado 25µL de cada amostra; gel de acrilamida 8% revelado no *ImageQuant LAS 4000*.

Além das condições já informadas, o tampão utilizado foi sem DTT e sem B-mercapto para observar se esses dois componentes estavam interferindo ou não em uma possível ligação de complexos. As amostras também foram corridas em tampão de corrida gelado e na geladeira, para evitar que uma temperatura mais quente pudesse desfazer a ligação. Na fig. 5A observa-se que as amostras que foram incubadas com formaldeído formaram um rastro, sem mostrar qualquer marcação de banda estabelecida. Já nos

controles, foi observado a presença do dímero OPB (120 kDa), como já era esperado, pois sem o processo de ferver a amostra, não houve quebra do dímero OPBTc. Provavelmente, com algumas otimizações a visualização dos complexos no gel poderia ser melhor estabelecida, pois cada proteína depende do seu ambiente fisiológico, e podem se estabelecer melhor em condições de temperatura diferentes, por exemplo. De acordo com Klockenbusch e Kast, 2010, três parâmetros desempenham um papel crítico durante a ligação por formaldeído, que são eles: o tempo de incubação, a concentração de formaldeído e a temperatura da reação. No entanto, estudo feito com a incubação a 25°C e a 35°C não mostrou diferença, e um menor tempo de incubação proporciona a vantagem de usar o formaldeído como um ligante, minimizando a formação de ligações inespecíficas e permite a formação de interações transitórias (KLOCKENBUSCH e KAST, 2010).

Já na figura 5B, observou-se que o anticorpo reconheceu a OPB, mostrando claramente a diferença entre a amostra fervida (80 kDa), e a amostra não fervida (dímero – 120kDa), porém novamente as amostras que continham formaldeído não ficaram bem delimitadas. A otimização da concentração de formaldeído e do tempo de incubação pode ser necessário para obter melhores resultados nesses experimentos (SUTHERLAND e col., 2008).

5.5 OPBTc imobilizada em resina de Ni-agarose com *cross-linking*

Para otimizar o teste de complexos, e tentar encontrar complexos formando bandas bem estabelecidas foi feito um teste com a rOPBTc utilizando um *linker* já utilizado em experimentos anteriores – o formaldeído, que tem sido utilizado para congelar o estado nativo de tecidos e células (SUTHERLAND e col., 2008). A ligação formada pelo formaldeído impede a precipitação de uma proteína de interesse que pode ser necessário para estudos de interação proteína – proteína, e, além disso, o uso de baixas concentrações de formaldeído (0,4% a 2%) e tempos de reação mais curtos previne que a formação de complexos se desfça e que o formaldeído funcione como um *linker* para analisar interações proteína-proteína (HOFFMAN e col., 2015) (KLOCKENBUSCH e KAST, 2010) (KLUGER e ALAGIC, 2004).

Foi realizado um teste de complexos com formaldeído, onde ele foi utilizado a uma concentração de 1%, em 4 condições. Para esse experimento, as amostras também foram preparadas com tampão sem DTT e sem B-mercapto, e também não foram fervidas para não ocorrer possíveis interferências no teste.

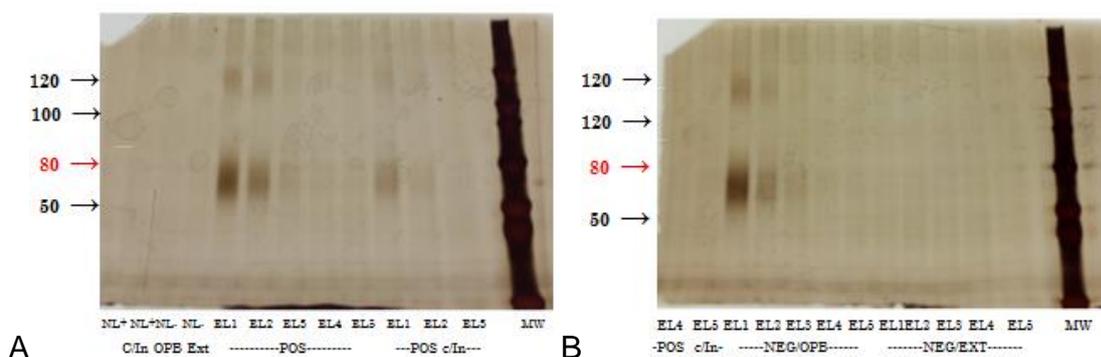
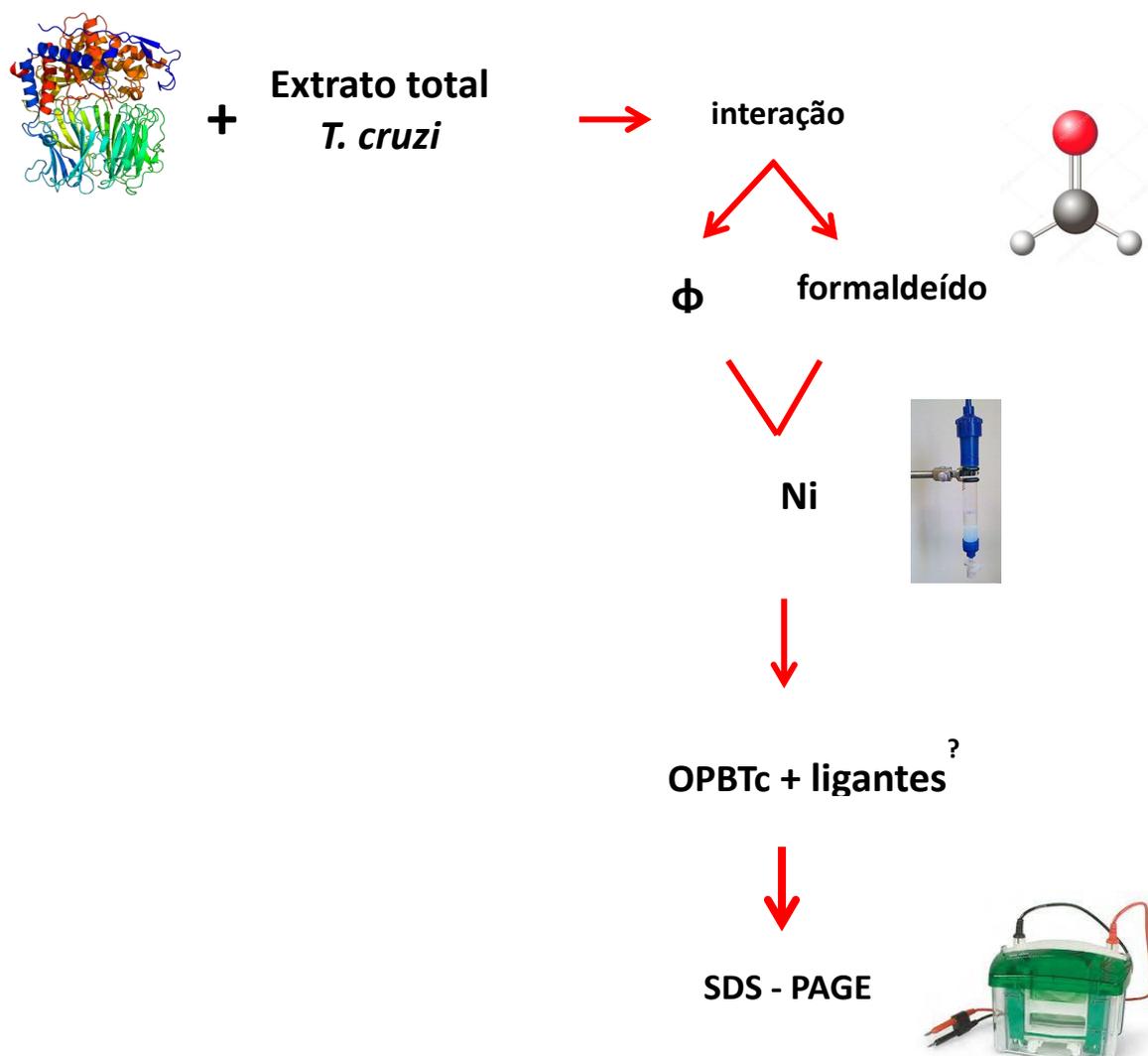


Figura 6. Teste de complexos com *cross-linking*. Teste de complexos, com a interação entre rOPBTc + epimastigotas + formaldeído, onde: NL = não ligado; LG = ligado; EL1 a EL5 = as respectivas eluições de cada controle. Em cada poço foi aplicado 25 μ L de cada amostra; gel 8% corado com nitrato de prata.

Novamente, os poços que mostram as amostras que foram utilizadas com formaldeído, não mostraram bandas bem estabelecidas, formando apenas rastros. O objetivo deste experimento era criar uma estratégia onde o formaldeído pudesse ajudar na ligação das proteínas que estivessem próximas entre si, e ajudando assim a formar o complexo e não desfazer facilmente essa rede de interação proteína-proteína, para que posteriormente os possíveis complexos pudessem ser identificados por espectrometria de massa. Já foi mostrado que a estratégia tradicional com o *cross-linking* consegue gerar uma grande quantidade de dados para análise por espectrometria de massa, que é bastante difícil de analisar com ferramentas de *software* de rotina (CHAKRABARTY e col., 2016). A ligação formada por ligantes como o formaldeído, por exemplo, depende de conexões covalentes entre aminoácidos de proteínas próximas entre si por um reagente químico; esse ligante possui um comprimento definido e conecta apenas esses aminoácidos que estão a uma distância adequada para serem ligados. Geralmente a análise dessa

interação de proteínas é realizada por uma abordagem clássica proteômica, onde a proteína ligada é digerida por enzimas específicas, e as misturas peptídicas são analisadas por cromatografia líquida com espectrômetro de massa (PIOTROWSKI e SINZ, 2018). Logo, o resultado esperado era de bandas maiores e melhores definidas próximos a altura de 80 kDa, por provavelmente se ligarem a OPBTc. O experimento poderia ser feito novamente, mudando algumas condições, como temperatura e concentração do formaldeído, para observar se demonstrava alguma diferença, e assim, conseguir bandas mais estabelecidas para levar para análise. Dessa forma, é necessário ainda estudos mais aprofundados, e mais experimentos com condições diferentes para achar a condição ideal para a incubação da proteína de interesse com o extrato do parasito.

5.6 Fluxograma de trabalho I



5.7 Pull-down

Já é sabido que a determinação dos ligantes proteicos é importante para entender a função das proteínas e seu papel biológico dentro de um sistema. Dessa forma para otimizar a identificação de interações proteína-proteína foi utilizado o experimento *pull-down* que é uma técnica *in vitro* que consiste na detecção de interações físicas entre duas ou mais proteínas e para confirmar a interação proteína-proteína existente ou identificar novos parceiros. (LOUCHE e col., [S.d.]). Basicamente foi feito um experimento fazendo o uso de purificação por afinidade com várias etapas de lavagens e diluições, como mostra a figura abaixo (Fig 7):

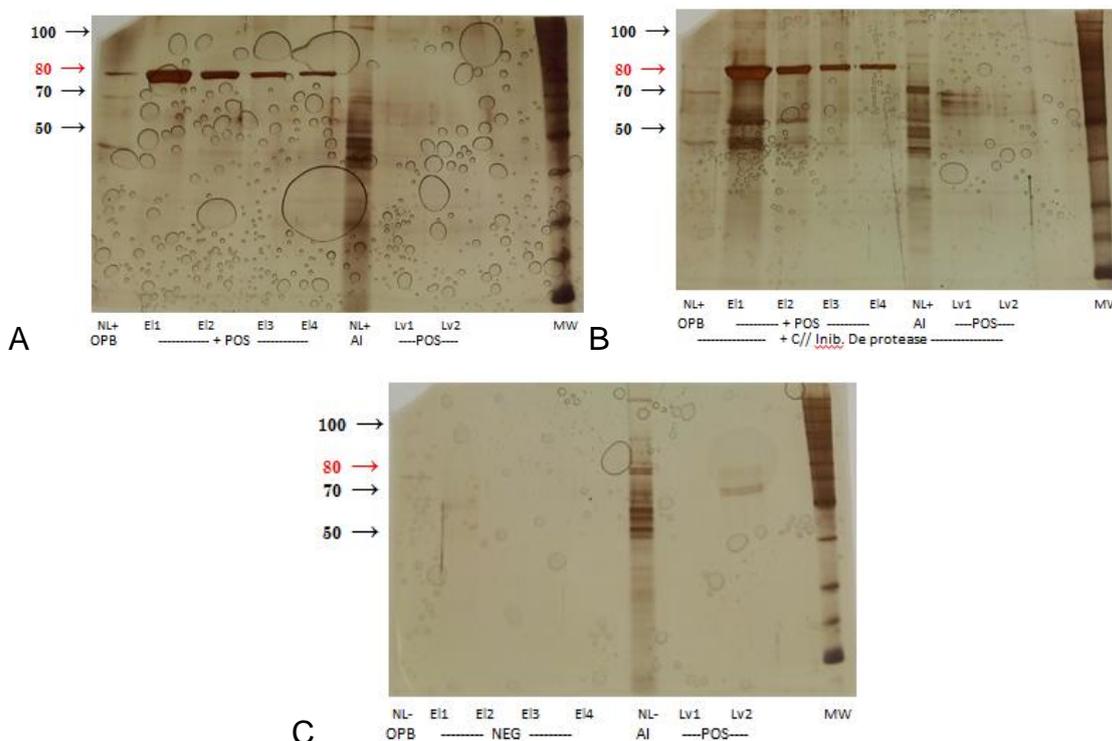


Figura 7. Teste de pull-down. Teste de pull-down, com a interação entre rOPBTc + epimastigotas + coquetel de inibidor de protease 1X, onde: NL = não ligado; LG = ligado; EL1 a EL5 = as respectivas eluições de cada controle, e LV = as respectivas lavagens. Foram utilizados 3 condições, sendo um POS (OPB + ET), um NEG (somente ET) e um POS c/ inib. de protease (OPB + ET com coquetel de inib. de protease 1X). Em cada poço foi aplicado 25 μ L de cada amostra; gel SDS 10% corado com nitrato de prata.

Nos controles positivos, foi possível identificar a marcação das bandas na altura de 80 kDa, como já esperado por possuir a rOPBTc. Algumas bandas

adicionais foram identificadas no gel de controle positivo com inibidor de protease, que pode representar a presença de novos parceiros. No entanto estes devem ser confirmados em um novo teste antes de serem levados para identificação por equipamento adequado. Além disso, nas lavagens foi possível fazer o controle da saída ou não da proteína de interesse (OPB), mostrando que a proteína não saiu durante as lavagens (Lv1 e Lv2). Para confirmação das marcações das bandas que apareceram no gel de controle positivo com inibidor de protease, um novo experimento foi feito (Fig. 8):

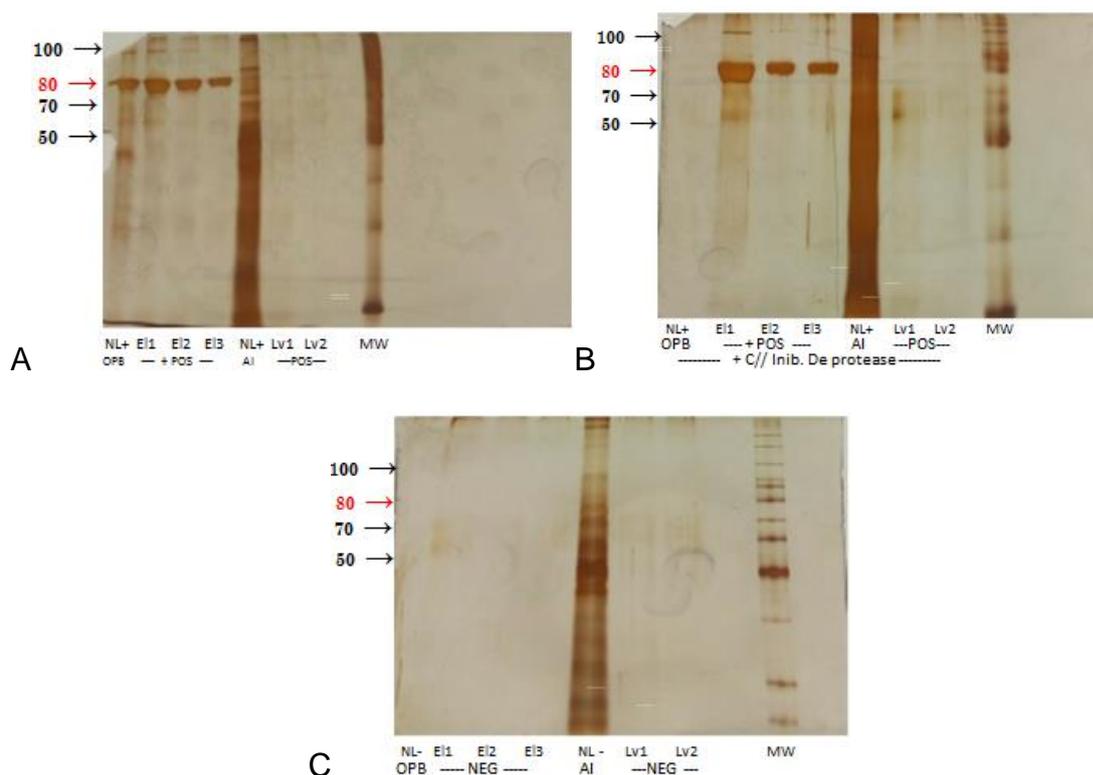
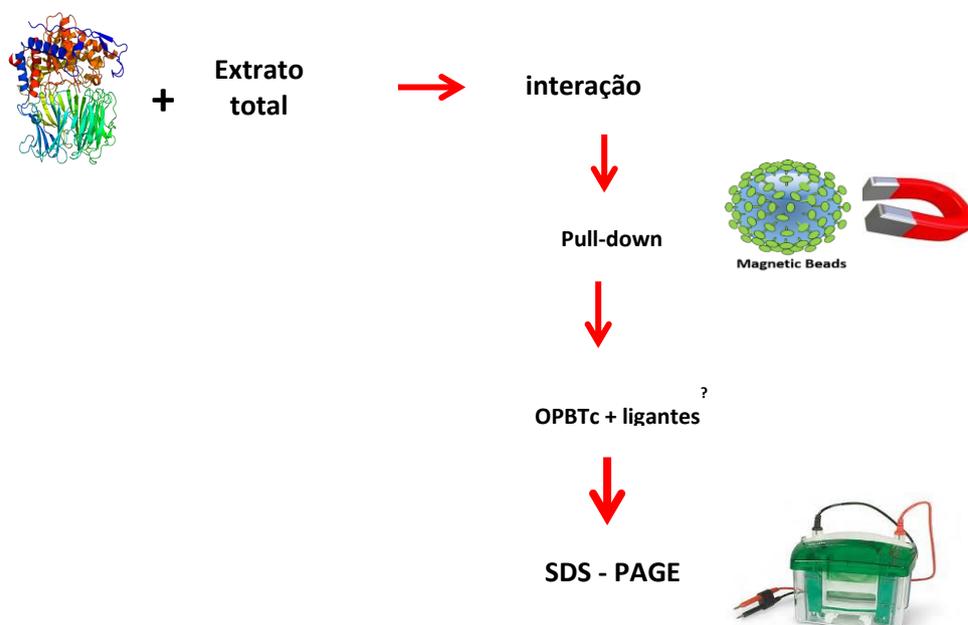


Figura 8 2º Teste de *pull-down*. Teste de *pull-down*, com a interação entre rOPBTc + epimastigotas + coquetel de inibidor de protease, onde: NL = não ligado; LG = ligado; EL1 a EL5 = as respectivas eluições de cada controle, e LV = as respectivas lavagens. Foram utilizados três controles, sendo um POS (OPB + ET) (A), um NEG (somente ET) (C) e um POS c/ inib. de protease (OPB + ET com coquetel de inib. de protease 1X) (B). Em cada poço, foi aplicado 25µL de cada amostra; gel SDS 10% corado com nitrato de prata.

Neste segundo experimento, observou-se a presença de marcações mais fracas ou quase não estabelecidas no gel de controle positivo com inibidor de protease. Dessa forma, precisaria de mais experimentos de *pull-down* para confirmação dessas bandas, e se elas são ou não novos parceiros que devem ser levados para identificação. Além disso, no gel de controle positivo, a

rOPBTc erroneamente saiu no poço da amostra do não ligado, que provavelmente a amostra do poço seguinte pode ter vazado para esse poço, mostrando a OPB na sua devida altura – 80kDa. O teste de *pull-down* é considerado um método *in vitro* eficiente intuitivo e rápido para analisar interações proteína-proteína diretamente (KIM e HAKOSHIMA, 2019). Para otimização futuramente, o teste de *pull down* poderia ser usado com a proteína de interesse fundida ao GST (glutathiona S-transferase – enzima antioxidante que serve para melhor visualização e marcação da banda), facilitando a detecção dos complexos, como mostra o artigo de Kim e Hakoshima, 2019, onde o teste de *pull-down* com GST foi eficiente para analisar interações diretas proteína-proteína. Além disso, ainda é possível analisar as bandas formadas no controle positivo com inibidor de protease, visto que o coquetel de inibidor de protease pode ter evitado a degradação de proteínas da atividade de proteases, que não é mostrado no controle positivo sem o coquetel de inibidor, porque essas proteínas podem ter sido degradadas. Mas somente com a análise dessas marcações para mostrar se há ou não a presença de ligantes. A ideia principal do experimento seria achar se a rOPBTc interage com alguma proteína do *T. cruzi* ou se forma uma rede de interações proteína-proteína, e por isso foi feito o experimento de *pull-down*, visto que seu objetivo principal sera a imobilização seletiva da proteína de interesse – nesse caso a OPB – em uma matriz sólida, que iria atrair os seus parceiros de interação – provenientes do *T. cruzi*.

5.8 Fluxograma de trabalho II



5.9 Interação célula hospedeira + rOPBTc

Para saber se a oligopeptidase B também se liga diretamente a algum componente da membrana celular do hospedeiro foi feito um experimento *in vitro* de interação entre a célula de mamífero com a rOPBTc. Células de mamífero previamente permeabilizadas (ou não) foram incubadas com 100 μ g de rOPBTc. Neste experimento, as células também foram tratadas com formaldeído após a interação. O resultado foi analisado em gel SDS 10% corado com nitrato de prata (Fig. 11).

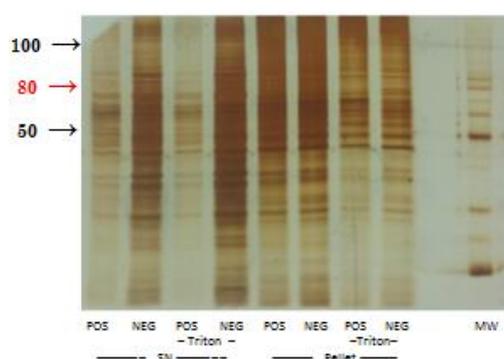


Figura 9. Interação células VERO + rOPBTc. Teste de interação entre rOPBTc + células de mamífero VERO, onde foram separadas as 2 frações (pellet e sobrenadante), e em cada uma temos o controle positivo (POS = VERO + OPB) e negativo e os mesmos 2 controles com Triton X-100. Em cada poço foi aplicado 15 μ L de cada amostra; gel SDS 10% corado com nitrato de prata.

A tentativa de visualização da interação da rOPBTc com a célula hospedeira foi realizada por meio de *western blotting* utilizando o anticorpo específico para rOPBTc (Fig. 12).

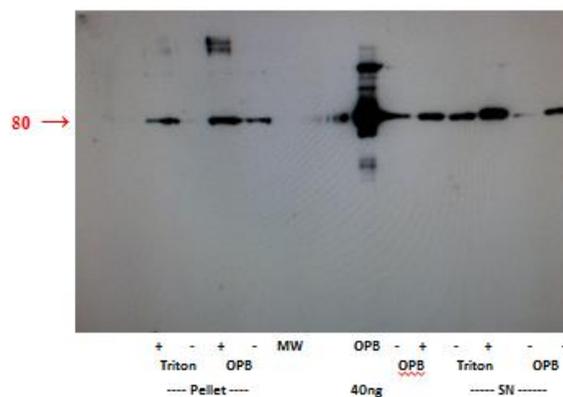


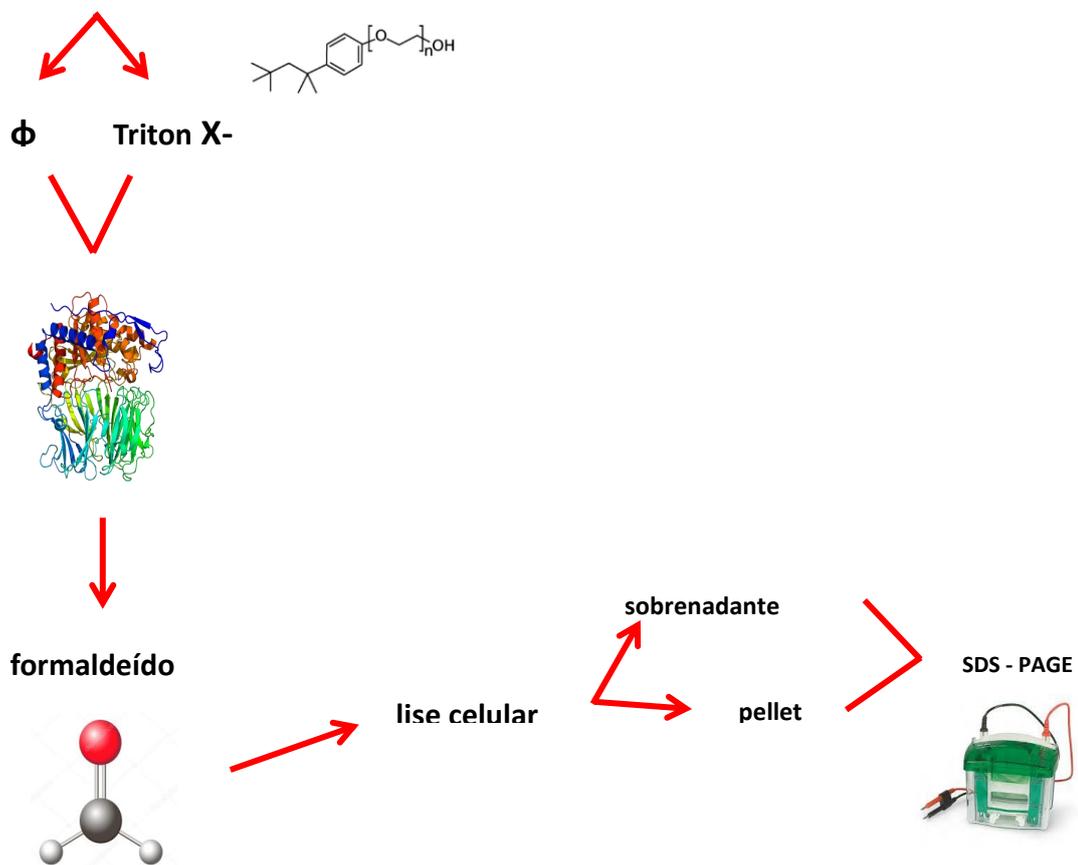
Figura 10. Western blotting da interação células VERO + rOPBTc. Western blotting do teste de interação entre rOPBTc + células de mamífero VERO, onde foram adicionados mais 2 controles – negativo e positivo da oligopeptidase B de experimento passado.

Foi possível observar uma marcação acima do peso molecular esperado (80 kDa) quando recuperou-se o pellet (fração insolúvel) da condição: interação rOPBTc + célula hospedeira. Na marcação do pellet proveniente da condição: interação rOPBTc + célula hospedeira, onde a última foi tratada previamente com 0,2% Triton X-100, também foi possível ver a marcação acima do peso molecular esperado porém menos intensa. Nessa condição, a maior parte da rOPBTc pode ter adentrado à célula e, por isso, teve-se um sinal mais fraco na revelação do *western blotting*. Esse foi o primeiro experimento em que se conseguiu visualizar, mesmo que de forma indireta, um possível complexo da rOPBTc. Embora a OPBTc não seja considerada uma enzima secretada com base em sua localização citosólica e ausência de peptídeo sinal previsível (1), sua atividade enzimática no substrato fluorogênico N-Cbz-Gly-Gly-Arg-AMC foi detectada no sobrenadante de culturas tripomastigotas (2), o que pode sugerir a presença da enzima no meio extracelular no momento da infecção. Não foi possível proceder para o passo de identificação do complexo porque, para tal, ter-se-ia que testar protocolos que permitissem a recuperação deste complexo ainda intacto.

Apesar das diversas abordagens utilizadas nesse estudo com o intuito de, ao menos, saber se a OPBTc é uma enzima que interage com outras moléculas, ainda não foi possível responder a essa pergunta. Melhoras nos protocolos testados neste trabalho e, evidentemente, outros protocolos precisam ser colocados em prática para determinar possíveis parceiros e/ou substratos da enzima. Esforços significativos tem sido feitos para a

compreensão das propriedades estruturais e funcionais da OPBTc, no entanto seu papel fisiológico ainda é desconhecido e seu substrato natural não foi identificado.

5.10 Fluxograma de trabalho III



5.11 BN-PAGE

Em experimentos posteriores foi iniciada a técnica de *BN-PAGE* para tentar identificar um possível complexo dentro do parasito. A técnica de *BN-Page* vem sendo bastante utilizada devido a seu potencial de separar complexos proteicos do lisado do extrato total de parasitos. Para a separação dos complexos no *BN-PAGE*, é necessário o uso do azul de Coomassie, que se liga não especificamente às proteínas e as cobre com cargas negativas. Dessa forma, o Coomassie blue permite a mobilidade eletroforética das proteínas em direção ao cátodo no pH neutro; além disso, o azul de Coomassie previne a agregação de proteínas no gel de gradiente – 5% a 18% - durante a eletroforese (JOHANN, 1991) (FIALA e col., 2011). Essa técnica possibilitou a separação de possíveis complexos proteicos de epimastigotas de *T. cruzi* em condições nativas (Fig. 9).

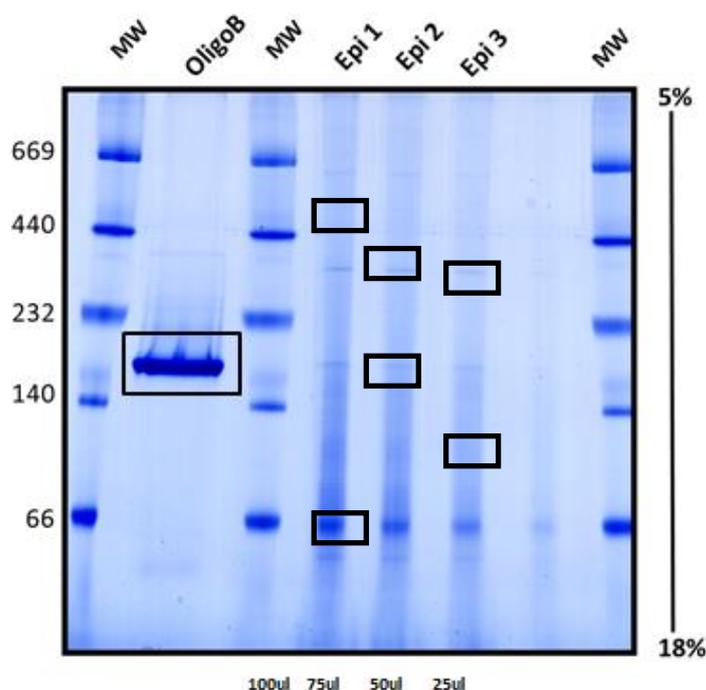


Figura 11. Análise de complexos proteicos solúveis das formas epimastigotas de *T. cruzi* – *BN-PAGE*. Foi feita uma separação dos complexos em uma malha de 5-18% e as amostras foram concentradas em um gel concentrador 4%. Foram adicionados marcadores de peso molecular – MW; A proteína purificada foi observada pela 1ª vez em sua conformação nativa na altura de 160 kDa; e os extratos de epimastigotas foram colocados em diferentes concentrações para análise dos complexos. Os complexos estão marcados.

Após a confecção do gel em gradiente, a corrida foi realizada a uma corrente constante de 15 mA por 4 horas, e após a corrida o gel foi submetido a

fixação e deixado *overnight* de acordo com o protocolo. Além disso, quantidade suficiente de oligopeptidase B purificada foi utilizada como um controle onde foi possível observar pela primeira vez na literatura a proteína em sua conformação nativa na altura de 160 kDa. Os complexos foram observados nas quatro concentrações diferentes utilizadas (100µL, 75µL, 50µL e 25µL) e futuramente serão levados para identificação. O estudo da interação proteína-proteína requer uma caracterização detalhada dos complexos multiproteicos e devem ser separados por condições nativas, onde o experimento de *BN-PAGE* permite a determinação do tamanho desses complexos, sua composição e sua abundância relativa nesse gel (JOHANN, 1991). Neste experimento, o Triton X-100 foi usado a baixa concentração pois permite a identificação de formas diméricas, e além disso, é um detergente não-iônico que tende a ser melhor para a estabilidade desses multicomplexos (CAMACHO-CARVAJAL e col., 2004).

As proteínas visualizadas por coloração de Coomassie poderiam ser levadas já para identificação por espectrometria de massa, visto que os complexos estão bem delimitados. No entanto, como foi possível observar uma grande quantidade de complexos na forma epimastigota, tivemos o interesse de fazer um novo experimento de *BN-PAGE* com as três formas de *T. cruzi* – epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas – para observar a diferença de complexos existentes entre as 3 formas de vida desse parasito.

5.12 *BN-PAGE* das três formas do parasito

Um *BN-PAGE* das 3 formas do parasito (epi-, tripo- e amastigotas) também foi realizado a fim de identificar possíveis complexos que podem se diferenciar de acordo com a fase de vida do *T. cruzi*. Da mesma forma, diferentes concentrações do parasito foram utilizadas para identificar em qual concentração teríamos a melhor quantidade de complexos visíveis, para posteriormente leva-los para identificação.

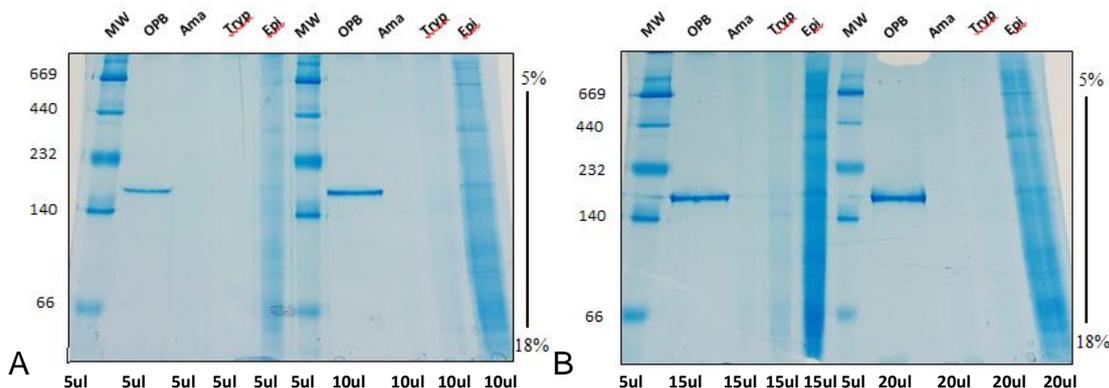


Figura 12. Análise de complexos proteicos solúveis das formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* – BN-PAGE. Foi feita uma separação dos complexos em uma malha de 5-18% e as amostras foram concentradas em um gel concentrador 4%. Foram adicionados marcadores de peso molecular – MW; OPB foi identificada em sua conformação nativa na altura de 160kDa; e os extratos das três formas do *T. cruzi* foram colocados em diferentes concentrações para análise dos complexos.

Ao final foi possível observar que as formas epimastigotas possuem mais complexos, quando utilizadas na mesma quantidade que as outras 2 formas, e que os complexos são mais visíveis nas concentrações de 10 μ L e 15 μ L de parasito, que futuramente foram utilizadas em um outro experimento - o *western blotting* (BN-blot). Foi feito um teste com o gel para o BN-blot, no entanto a transferência para a membrana de nitrocelulose não foi realizada como o esperado (dado não mostrado). O azul de Coomassie também é transferido durante a transferência em um BN-gel, e dessa forma o gel ficará transparente, como de costume, mostrando a transferência bem sucedida, porém a membrana ficará com a cor azul. Além disso, nem todos os anticorpos usados em experimentos normais de *western blot* após SDS-page funcionam também depois de um BN-PAGE, pois os anticorpos podem não reconhecer os multicomplexos de interesse, pois seu epítipo está oculto na conformação nativa das proteínas. Uma solução para esse problema seria desnaturar as proteínas dentro do BN-gel antes da transferência pelo gel brevemente fervido em tampão de amostra SDS 1X (SWAMY e col., 2012) (FIALA e col., 2011). Além disso, a utilização de metanol pode interferir nos complexos formados que deveriam ser transferidos para a membrana de nitrocelulose. Assim ainda não foi feito um novo BN-blot testando essas outras condições já que a metodologia para transferência em BN-blot não está bem estabelecida.

6. CONCLUSÃO

- Nas condições de interação da rOPBTc com o extrato protéico do parasito experimentadas neste trabalho não foi possível recuperar nenhum ligante;
- Um suposto complexo somente foi observado após a interação da rOPBTc diretamente com células de mamíferos;
- A técnica de *BN-PAGE* permitiu a visualização da OPBTc na sua forma dimérica pela 1ª vez.

7. REFERÊNCIAS

- ALOY, P., PICHAUD, M., RUSSELL, R. B. **Protein complexes: structure predictions challenges for the 21st century**. *Scien.Dir.* v. 15, 15-22, 2005.
- ALVARADO-ARNEZ, Lucia Elena e colab. **Single nucleotide polymorphisms of cytokine-related genes and association with clinical outcome in a Chagas disease case-control study from Brazil**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 6, p. 1–12, 2018. Disponível em: <<http://memorias.ioc.fiocruz.br/article/6453/0489-single-nucleotide-polymorphisms-of-cytokine-related-genes-and-association-with-clinical-outcome-in-a-chagas-disease-case-control-study-from-brazil#>>>.
- ALVAREZ, Vanina E. e NIEMIROWICZ, Gabriela T. e CAZZULO, Juan J. **The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death**. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1824, n. 1, p. 195–206, 2012.
- ALVES, Maria Julia Manso e colab. **Comprehensive glycoprofiling of the epimastigote and trypomastigote stages of *Trypanosoma cruzi***. *Journal of Proteomics*, v. 151, p. 182–192, 2017.
- ANTUNES, A. F. e colab. Chronic heart disease after treatment of oral acute Chagas disease. **Arquiv. Bras. Cardiol.**, p. 184–186, 2016.
- ASHALL, Frank e ANGLIKER, Herbert e SHALL, Elliott. **Lysis of Trypanosomes by Peptidyl Fluoromethyl Ketones**. *Biochemical and biophysical research communications*. v.170, No.2, 1990.
- B.A. Burleigh, E. V. Caler, P. Webster, N.W. Andrews, **A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells**, *J. Cell Biol.* (1997). doi:10.1083/jcb.136.3.609.
- BARRETT, A. J. e MCDONALD, J. K. **Biochem. J.** 231, 807. 1985
- BERGMANN, M. e ROSS, W. F. J. **Biol. Chem.** 114,717-726. 1936
- BASILE L., e colab. **Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system**. *Euro Surveil.*, v.16 pii, p. 19968, 2011.
- BASTOS, I M D e colab. **Parasite Prolyl Oligopeptidases and the Challenge of Designing Chemotherapeutics for Chagas Disease , Leishmaniasis and African Trypanosomiasis**. p. 3103–3115, 2013.
- BASTOS, Izabela M D e colab. **Molecular , functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells**. *Discover*, v. 38, p. 29–38, 2005.
- BERN, Caryn. **Chagas' Disease**. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 5, p. 456–466,

2015. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1410150>>.

BONALDO, Myrna C e ESCOFFIER, Luiz N E Y D e SALLES, M. **Characterization and Expression of Proteases cruzi Metacyclogenesis during Tr ~ panosoma Proteases have been widely described in 1990). As yet , the precise role of these pro- has suggested in other parasites that might host (Piras Breton the turnover o. v. 51, n. 191, p. 44–51, 1991.**

BORGES, Bruna C e colab. **Mechanisms of Infectivity and Evasion Derived from Microvesicles Cargo Produced by Trypanosoma cruzi.** v. 6, n. November, p. 1–7, 2016.

BORGES, Erika C e colab. **Trypanosoma cruzi: E V ects of infection on cathepsin D activity in the midgut of Rhodnius prolixus.** v. 112, p. 130–133, 2006.

BRANDÃO, Eduardo e colab. **Neglected tropical diseases in Brazilian children and adolescents: Data analysis from 2009 to 2013.** Infectious Diseases of Poverty, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2017.

BRASIL. Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilância em Saude. Departamento de Vigilância Epidemiologica. **Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013 Vol. 43 - nº 2/ Ministerio da Saude, Secretaria de Vigilância em Saude, Departamento de Vigilância Epidemiologica.** – Brasília : Ministerio da Saude, 2015.

BRENER, Zigman. **Typanosoma cruzi:** 1997.

BROCKLEHURST, Keith e PHILPOTT, Mike P. **Cysteine proteases: Mode of action and role in epidermal differentiation.** Cell and Tissue Research, v. 351, n. 2, p. 237–244, 2013.

BULLOCK, Joshua Matthew Allen e colab. **Modeling Protein Complexes Using Restraints from Crosslinking Mass Spectrometry.** Structure, p. 1–10, 2018.

CALER, Elisabet V. e colab. **Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by Trypanosoma cruzi.** EMBO Journal, v. 17, n. 17, p. 4975–4986, 1998.

CAMACHO-CARVAJAL, Margarita M e colab. **Two-dimensional Blue Native / SDS Gel Electrophoresis of Multi-Protein Complexes from Whole Cellular Lysates.** p. 176–182, 2004.

CARNEIRO, Cláudia Martins e colab. **Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.16-0761>>.

CARREA, Alejandra e DIAMBRA, Luis. **Systems biology approach to model the life cycle of Trypanosoma cruzi.** PLoS ONE, v. 11, n. 1, p. 1–20, 2016.

CASTILLO, C e colab. **Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo Trypanosoma cruzi infection of human placental chorionic villi.** Placenta, p. 4–10, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2012.10.004>>.

CAZZULO, Juan José. **Proteinases of Trypanosoma Cruzi: Potential Targets for the**

Chemotherapy of Chagas Disease. n. 54 11, p. 1261–1271, 2002.

CHAKRABARTY, Jayanta K e colab. **approach for high confidence in identifying protein cross-linking Differential tandem mass spectrometry-based cross-linker: a new approach for high confidence in identifying protein cross-linking.** 2016.

COETZER, T. H., GOLDRING, J. P., HUSON, L. E. **Oligopeptidase B: a processing peptidase involved in pathogenesis.** *Biochimie*, 90(2), 336-344. 2008.

COLLABORATORS GBD 2013 MORTALITY AND. **Global , regional , and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death , 1990-2013 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013.** *Lancet* (London, England), v. 385, n. 9963, p. 117–171, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530442>%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4340604>.

COOPER, J. B. **Five atomic resolution structures of endothiapsin inhibitor complexes: implications for the aspartic proteinase mechanism.** *J Mol Biol* 318:1405–1415. 2002.

COURA, José Rodrigues e DIAS, João Carlos Pinto. **Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. i, p. 31–40, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S007402762009000900006&lng=en&nr m=iso&tIng=en>.

CUNHA-NETO, Edecio e CHEVILLARD, Christophe. **Chagas disease cardiomyopathy: Immunopathology and genetics.** *Mediators of Inflammation*, v. 2014, 2014.

DUASO, Juan e colab. **Reorganization of Extracellular Matrix in Placentas from Women with Asymptomatic Chagas Disease : Mechanism of Parasite Invasion or Local Placental Defense ?** v. 2012, 2012.

FAIRLIE, D. P., e colab. **Conformational selection of inhibitors and substrates by proteolytic enzymes: implications for drug design and polypeptide processing.** *J Med Chem* 43:1271–1281. 2000.

FERNANDES, L.C., e colab. **Specific human antibodies do not inhibit *Trypanosoma cruzi* oligopeptidase B and cathepsin B, and immunoglobulin G enhances the activity of trypomastigote-secreted oligopeptidase B,** *Microbes Infect*, 7, 375-384. 2005.

FIALA, Gina J e SCHAMEL, Wolfgang W A e BLUMENTHAL, Britta. **Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) for Analysis of Multiprotein Complexes from Cellular Lysates.** n. February, p. 1–8, 2011.

FILIGHEDDU, M. T. e colab. **Orally-transmitted Chagas disease.** *Medicina Clínica* (English Edition), Volume 148, Issue 3, 9 February 2017, Pages 125-131

FREIRE-DE-LIMA, L e colab. **The *trans* -sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence**

factor: Three decades of studies. *Glycobiology*, v. 25, n. 11, p. 1142–1149, 2015. Disponível em: <<http://www.glycob.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/glycob/cwv057>>.

GAVIN, A.C. e SUPERTI-FURGA, G. **Protein complexes and proteome organization from yeast to man.** *Curr.Opin.Chem. Biol.* v.7, 21–27, 2003.

Grassmann, W. & Dyckerhoff, H. **Hoppe-Seyler's Z.**

GURGEL-GONÇALVES, R. e colab., **Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based in ecological niche modeling.** *Journal of Tropical Medicine.* V. 2012, Article ID 705326, 15 p, 2012. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1155/2012/705326>>.

Physiol. Chem. 179, 41-78. 1928.

ITO, T., CHIBA, T., OZAWA, R., YOSHIDA, M., HATTORI, M., SAKAKI, Y. **A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 98, 4569-4574, 2001.

JOHANN, Der. **Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane Protein Complexes in Enzymatically Active Form.** v. 231, p. 223–231, 1991.

KĘDZIOR, Mateusz e SEREDYŃSKI, Rafał e GUTOWICZ, Jan. **Microbial inhibitors of cysteine proteases.** *Medical Microbiology and Immunology*, v. 205, n. 4, p. 275–296, 2016.

KESSLER, R.L., CONTRERAS, V.T., MAZZAROTTO, G.A.C.A., BATISTA, M., SOCCOL, V.T., KRIEGER, M.A. AND PROBST, C.M. (aceito para publicação). **Recently differentiated *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are infective to the mammalian host.** *Molecular Microbiology.*, v. x, n. x, p. xx–xx, 2017.

KIM, Sun-yong e HAKOSHIMA, Toshio. **Chapter 20 GST Pull-Down Assay to Measure Complex Formations.** v. 1893, p. 273–280, 2019.

KLOCKENBUSCH, Cordula e KAST, Juergen. **Optimization of Formaldehyde Cross-Linking for Protein Interaction Analysis of Non-Tagged Integrin β 1.** v. 2010, 2010.

L.C. Fernandes, I.M.D. Bastos, L. Lauria-Pires, A.C.O. Rosa, A.R.L. Teixeira, P. Grellier, J. Schrével, J.M. Santana, **Specific human antibodies do not inhibit *Trypanosoma cruzi* oligopeptidase B and cathepsin B, and immunoglobulin G enhances the activity of trypomastigote-secreted oligopeptidase B,** *Microbes Infect.* 7 (2005) 375–384. doi:10.1016/j.micinf.2004.11.009.

LINDOSO, José Angelo L. e LINDOSO, Ana Angélica B.P. **Neglected tropical diseases in Brazil.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 51, n. 5, p. 247–253, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652009000500003&lng=en&tlng=en>.

LOUCHE, Arthur e SALCEDO, Suzana P e BIGOT, Sarah. **Protein – Protein Interactions : Pull-Down Assays.** v. 1615, p. 247–255, [S.d.].

- MADALA, P. K., TYNDALL, J. D., NALL, T., FAIRLIE, D. P. **Update 1 of: proteases universally recognize beta strands in their active sites.** Chem Rev 110:PR1–PR31. 2010.
- MANN, M., HENDRICKSON, R. C., PANDEY, A. **Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry.** Ann. Rev. Biochem. v. 70, 437-473, 2001.
- MANDAL, MOUDGIL e colab. **Rational drug design.** Eur J Pharmacol. 2009 Dec 25;625(1-3):90-100. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.065. Epub 2009 Oct 14.
- MALEMUD, C. J. **Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview.** Front Biosci 11:1696–1701. 2006.
- MALIK, Lindsey H. e SINGH, Gagan D. e AMSTERDAM, Ezra A. **The epidemiology, clinical manifestations, and management of chagas heart disease.** Clinical Cardiology, v. 38, n. 9, p. 565–569, 2015.
- MARKEY, T. & LIANG, B. **Threats from emerging and re-emerging neglected tropical diseases (NTDs).**, v. 2, p. 75-88, 2012.
- MEDICINA, Escola Paulista De e BOTUCATU, R. **Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi.** v. 78, p. 87–111, 2006.
- NAGLIK, J. R., CHALLACOMBE, S. J., HUBE, B. **Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis.** Microbiol Mol Biol Rev 67:400–428. 2003.
- NASCIMENTO, Silva e colab. **SC.** 2018.
- NAVARRETE-SANDOVAL, Rafael Hernán e SERVÍN-ROJAS, Maximiliano. **Bug smash, bug splash: A case report of an unusual transmission of american trypanosomiasis with a brief review of the literature.** American Journal of Case Reports, v. 17, p. 993–996, 2016.
- OPAS. Relatório da OMS informa progressos sem precedentes contra doenças tropicais negligenciadas. **Organização Panamericana de Saúde**, 2017. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5401:relatorio-da-oms-informa-progressos-sem-precedentes-contra-doencas-tropicais-negligenciadas&Itemid=812>
- OSORIO, L e colab. **Virulence factors of Trypanosoma cruzi: who is who?** Microbes and infection / Institut Pasteur, v. 14, n. 15, p. 1390–1402, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23006853>>.
- PIACENZA, Lucía e colab. **Trypanosoma cruzi Antioxidant Enzymes As Virulence Factors in Chagas Disease.** Antioxidants & Redox Signaling, v. 19, n. 7, p. 723–734, 2013. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2012.4618>>.
- PIOTROWSKI, Christine e SINZ, Andrea. **Structural Investigation of Proteins and Protein Complexes by Chemical Cross-Linking / Mass Spectrometry.** p. 101–121, 2018.
- PROD, Gest e CARLOS, São e MUNHOZ, Igor Polezi. **Inovação tecnológica na indústria farmacêutica : diferenças entre a Europa , os EUA e os países farmaemergentes.** 2018.

RAIN, J.C., e colab., **The protein-protein interaction map of Helicobacter pylori.** *Nature*.v.409, 211-215, 2001.

RASSI, Anis e MARIN-NETO, José Antonio e RASSI, Anis. **Chronic chagas cardiomyopathy: A review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (BENEFIT) trial.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 3, p. 224–235, 2017.

RAWLINGS, N. D., BARRETT, A. J. **Introduction: metallopeptidases and their clans.** In: Barrett AJ, Rawlings ND (eds) *Handbook of proteolytic enzymes*, vol 1, 2 edn. Elsevier, Amsterdam, pp 231– 268. 2004.

RODRIGUEZ, A., RIOULT, M. G., ORA, A. e ANDREWS, N. W. **A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells,** *J Cell Biol*, 129, 1263-1273. 1995.

RUEDA, Karina e colab. **Transmisión oral de Trypanosoma cruzi : una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos.** p. 631–641, 2014.

SANTOS, L S e colab. **MDL28170 , a Calpain Inhibitor , Affects Trypanosoma cruzi Metacyclogenesis , Ultrastructure and Attachment to Rhodnius prolixus Midgut.** v. 6, n. 4, 2011.

SCARIM, C.B. e colab. **Response to different benznidazole doses in animal models of chronic phase chagas disease: A critical review.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 51, n. 2, p. 133–140, 2018.

SCHMUNIS, G.A. **Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.102 (Suppl. I), p. 75-85, 2007.

SEE, Dynamag Magnet e ISOLATION, Dynabeads His-tag. **Dynabeads™ His-Tag Isolation & Pulldown Kit contents Sample guidelines.** p. 1–2, 2017.

SILVA-LÓPEZ, Raquel Elisa. **Revisão.** v. 33, n. 7, p. 1541–1548, 2010.

SOUALMIA, Feryel e EL AMRI, Chahrazade. **Serine protease inhibitors to treat inflammation: a patent review (2011-2016).** *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 28, n. 2, p. 93–110, 2018.

STEVERDING, D. **The History of Chagas Disease.** *Parasites & Vectors.*, v. 317(7), p. 1-8, 2014.

SUTHERLAND, Brent W e TOEWS, Judy e KAST, Juergen. **SPECIAL FEATURE : Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein – protein interactions.** n. April, p. 699–715, 2008.

SWAMY, Mahima e colab. **Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) for**

the Identification and Analysis of Multiprotein Complexes INTRODUCTION RECIPES. v. 2006, n. September 1999, 2012.

TANOWITZ, Herbert B e colab. **Developments in the management of Chagas cardiomyopathy.** v. 13, n. 12, p. 1393–1409, 2016.

UETZ, P., e colab. **A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*.** Nature. v. 403, 623-627, 2000.

VANRELL, María Cristina e colab. **The regulation of autophagy differentially affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 11, n. 11, p. 1–23, 2017.

VENALAINEN, J.I., e colab. **Evolutionary relationships of the prolyl oligopeptidase family enzymes,** Eur J Biochem, 271, 2705-2715.2004.

WATANABE COSTA, Renata e DA SILVEIRA, Jose F. e BAHIA, Diana. **Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways.** Frontiers in Microbiology, v. 7, n. MAR, p. 1–9, 2016.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). **World Health Organ.** Detail. 2018. < [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 18 mai. 2018.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). **World Health Organ.** Epidemiology. 2013. < <http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>>. Acesso em: 21 out. 2018.

WHO. Second WHO report on neglected tropical diseases: sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **World Health Organization**, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/>. Acesso em: 20 mai. 2018.

WINKLER, A.S. e colab. **Neglected tropical diseases - the present and the future.** Tidsskrift for den Norske Lægeforening, v. 138, n. 3, 2018.

WONG, Yim Yan e colab. **Molecular epidemiology of *Trypanosoma cruzi* and *Triatoma dimidiata* in coastal Ecuador.** [S.l: s.n.], 2016. v. 41.

YOSHIDA, N., e Cortez, M. ***Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process.** Mol. Mech. Parasite Invasion 47, 82–91. 2008.

ZINGALES, Bianca. ***Trypanosoma cruzi*: um parasita , dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas ?** p. 44–48, 2011.

ZINGALES, B., e colab. **The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications.** Infect Genet Evol. 12, 240-253. 2012.

8. APÊNDICE

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Beatriz P. Neves,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Biochimie

Title: Oligopeptidase B, a missing enzyme in mammals and a potential drug target for trypanosomatid diseases

Corresponding Author: Izabela M. D. Bastos

Co-Authors: Flávia Motta; Clênia Azevedo; Beatriz P. Neves; Carla Araújo; Philippe Grellier; Jaime Santana;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register

here: <https://ees.elsevier.com/biochi/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Beatriz&lname=P.Neves&email=beatrizpneves1@gmail.com>

Or log

in: <https://ees.elsevier.com/biochi/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=beatrizpneves1@gmail.com>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at dourado@unb.br.

Thank you,

Biochimie