

**Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas
Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro**

Expressão heteróloga e citolocalização da γ -Glutamilcisteína sintetase e Glutathiona sintetase de *Trypanosoma cruzi*

Isabel Garcia Sousa

Brasília, 2011

Isabel Garcia Sousa

**Expressão heteróloga e citolocalização da
 γ -Glutamylcisteína sintetase e Glutathione
sintetase de *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Jaime Martins de Santana

Brasília, 2011

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro da Universidade de Brasília, sob a orientação do Prof. Dr. Jaime Martins de Santana. Este trabalho teve apoio financeiro da CAPES, CNPq, Finep, FAP-DF e PRONEX.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus que me dotou de capacidade, saúde e condições para que chegasse até aqui, por mais essa conquista.

Aos meus queridos pais Walter e Eliana pela educação, carinho, amor e por muitas vezes que sacrificaram seus sonhos para que os meus fossem realizados. Por me proporcionarem esta oportunidade, pelo apoio incondicional e incentivo para seguir em frente e não desistir no primeiro obstáculo.

A meu irmão Adriel e sua esposa Patrícia que torceram muito por mim, agradeço pela compreensão e estímulo.

A minha família, avós, tios, primos e amigos que sempre me encorajaram e me ajudaram em mais essa etapa da minha vida.

Ao meu orientador Dr. Jaime Martins de Santana, pela amizade, confiança, colaboração, incentivo e dedicação.

Aos queridos amigos e companheiros de bancada Brina, Bruna, Raquel, Paula, André, Hugo e Thiago, pelo suporte integral, conversas e desabafos, e pela consideração. Obrigada pela acolhida e pela amizade!

Aos colegas do laboratório Izabela, Carla, Viviane, Flávia, Keyla, Ana Camila, Márcio, Isaque e aos que estão chegando agora, pelo apoio e parceria.

Agradeço aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite e pela participação.

Também de forma especial, agradeço aos professores José Correia, Sebastien Charneau, Anamélia Bocca e Cezar Sá pela colaboração boa vontade e disponibilidade ao desenvolvimento da pesquisa.

Lista de abreviaturas

ATP	Adenosina tri-fosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
C-terminal	Extremidade carboxi-terminal de cadeia polipeptídica
DAPI	4'6-diamidino phenilyndole
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	2'-deoxinucleosídeo 5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GSH	Tripeptídeo L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina
GCS	γ -Glutamilcisteína sintetase
GS	Glutationa sintetase
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
N-terminal	Extremidade amino-terminal da cadeia polipeptídica
NBT	Nitro-azul-tetrazólio
OD	Densidade óptica
PBS	Tampão fosfato 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,2
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogênico
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Duodecil Sulfato de Sódio
UV	Espectro de luz ultra-violeta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
°C	Graus Celsius
g	Grama
ng	Nanograma

μg	Micrograma
mg	Miligrama
Da	Dalton
V	Volts
L	Litro
μL	Microlitro
mL	Mililitro
M	Molar
μM	Micromolar
mM	Milimolar

Resumo

O sistema biológico depende de rígido controle do processo de oxidação proveniente do metabolismo. A oxidação pode resultar em danos irreparáveis em inúmeras moléculas importantes para a manutenção da fisiologia celular. Assim, há uma via metabólica voltada para manter esse sistema reduzido, que nos tripanosomatídeos parece ser única, e alguma interrupção causaria danos ao parasito. Nesse intuito, esse trabalho teve como objetivo estudar duas enzimas participantes da via de óxido-redução do *Trypanosoma cruzi* identificadas como γ -glutamilcisteína sintetase (GCS) e glutatona sintetase (GS). A sequência nucleotídica dos genes *gcs* e *gs* de *T. cruzi* codificam proteínas de 693 e 535 resíduos de aminoácidos de massa molecular 79,67 kDa e 58,63 kDa respectivamente. Essas proteínas já foram estudadas em muitos organismos, e apresentam sequências altamente conservadas entre os tripanosomatídeos patogênicos. O baixo grau de identidade com a enzima humana é bastante interessante, pois podem representar alvos específicos para o desenvolvimento de quimioterápicos seletivos. As proteínas recombinantes foram expressas em sistema heterólogo de *E. coli*, a partir do vetor de expressão *gcs*-pET28a e *gs*-pET28a. As proteínas foram purificadas sob condições desnaturantes, pois a rGCSTc só está presente na fração insolúvel do lisado bacteriano, e rGSTc da fração solúvel apresentou dificuldades em se ligar na coluna de afinidade. Os anticorpos policlonais produzidos pelos camundongos imunizados foram eficientes no reconhecimento das proteínas recombinantes e das proteínas nativas no extrato total de epimastigotas de *T. cruzi*. Análise da imunofluorescência revelou que as enzimas são expressas por todas as formas do *T. cruzi* e localizam-se no interior de vesículas no citoplasma do parasito.

Abstract

Biological systems depend on the strict control of the oxidation process derived from the metabolism. Oxidation can result in irreparable damage to many molecules important to the maintenance of cellular physiology. Thus, there is a pathway to keep the system reduced, that in trypanosomatids appears to be unique, and any disruption would cause damage to the parasite. At this purpose, this work aimed to study two enzymes participating in the redox pathway of *Trypanosoma cruzi*, identified as γ -glutamylcysteine synthetase (GCS) and glutathione synthetase (GS). The nucleotide sequence of the *T. cruzi gcs* and *gs* genes encode proteins of 693 and 535 amino acid residues with molecular masses 79.67 kDa and 58.63 kDa respectively. Their proteins have already been studied in many organisms and their sequences are highly conserved among pathogenic kinetoplastids. The low degree of identity with the human enzyme may represent specific targets for the development of selective chemotherapeutic agents. The recombinant proteins were expressed in *E. coli* using the expression vectors *gcs*-pET28a and *gs*-pET28a. The proteins were purified under denaturing conditions, because the rGCSTc is only present in the insoluble fraction of bacterial lysate and the soluble fraction of rGSTc does not bind to the affinity column under non-denaturing conditions. Polyclonal antibodies against the purified enzymes, raised in mice, were effective in the recognition of the recombinant proteins and their native forms in the total extract of epimastigotes of *T. cruzi*. Immunofluorescence analysis revealed that the enzymes are expressed in all forms of *T. cruzi* and located within vesicles in the cytoplasm of the parasite.

Sumário

Agradecimentos	i
Lista de abreviaturas	ii
Resumo	iv
Abstract	v
Sumário	vi
Introdução	1
Doenças tropicais negligenciadas.....	1
<i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas.....	2
Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
Desenvolvimento da infecção e tratamento.....	4
Sistema óxido redutor nos tripanosomatídeos.....	5
Objetivos	11
Metodologia	12
Análise de bioinformática	12
Obtenção do parasito	12
Extração de DNA genômico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
Extrato total de <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
Amplificação dos genes <i>gcsTc</i> e <i>gsTc</i>	13
Eletroforese em gel de agarose e purificação dos insertos	13
Clonagem dos genes <i>gcsTc</i> e <i>gsTc</i>	14
Sequenciamento	15
Expressão heteróloga das proteínas	15
Extração das proteínas recombinantes	15
Reagente BugBuster®	15
Sonicação	16
Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	16

Purificação das proteínas recombinantes	16
Purificação de corpo de inclusão	17
Purificação da fração solúvel	17
Imunização	18
<i>Immunoblot</i>	18
Imunofluorescência	19
Resultados	20
Discussão	44
Conclusões	59
Referências	50

Introdução

Doenças tropicais negligenciadas

Como os seres vivos sempre estiveram sujeitos a infecções por patógenos, o processo evolutivo resultou no estabelecimento de complexa relação patógeno-hospedeiro, permitindo aos patógenos adaptar-se desenvolvendo estratégias para controlar a infecção. Esta interação tem sido objeto fascinante de pesquisa da biologia moderna, que trabalha no sentido de compreender os mecanismos pelos quais a interface patógeno-hospedeiro resulta em doença, na erradicação do agente infeccioso ou na convivência pacífica entre ambos. Os custos sociais e econômicos advindos destas infecções, que causam doenças crônicas com altas taxas de mortalidade e morbidade, são incalculáveis.

Aproximadamente 2,7 bilhões de pessoas no mundo estão infectadas por alguma das doenças parasitárias tropicais negligenciadas. Este cenário está diretamente vinculado às condições socioeconômicas tais como desemprego, pobreza, desnutrição, falta de instrução e precariedade no saneamento básico (HOTEZ *et alii*, 2007).

As infecções parasitárias, virais e bacterianas conhecidas como doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2010) têm recebido pouca atenção das indústrias farmacêuticas ao longo dos anos considerando a magnitude dos seus impactos no desenvolvimento econômico e na qualidade de vida da população menos favorecida, particularmente aquelas que vivem em áreas remotas e rurais, favelas urbanas ou em zonas de conflito. Com pouca voz política, as populações afetadas pelas doenças tropicais negligenciadas têm um perfil de baixo status nas prioridades da saúde pública, particularmente no que diz respeito às responsabilidades das indústrias farmacêuticas.

Algumas dessas doenças são causadas por tripanosomatídeos, protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastidae e ao gênero *Trypanosoma*, e neste incluem espécies como *Trypanosoma brucei*, responsável por causar a tripanossomíase africana, e o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas ou tripanosomíase americana. Os tripanosomatídeos representam um dos primeiros ramos evolutivos da linhagem eucariótica e possuem ciclos de vida complexos em diversas fases, algumas presentes nos insetos vetores, e outras vinculadas aos hospedeiros mamíferos. Eles compartilham muitos aspectos de sua

bioquímica básica, que mostra um número de peculiaridades na compartimentalização do metabolismo e regulação (HANNAERT *et alii*, 2003).

***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas**

A doença de Chagas foi descoberta em 1909 por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909), seu relatório original sobre a doença foi o único na história a descrever o reservatório natural do parasito, o agente etiológico, a localização intradomiciliar do inseto transmissor, o modo de transmissão e os aspectos clínicos do estágio agudo e crônico de uma parasitose (RASSI Jr *et alii*, 2010). Cerca 10 milhões de pessoas estão infectadas no mundo, principalmente na América Latina onde a doença de Chagas é endêmica. Estima-se que em 2008 a doença de Chagas matou mais de 10 mil pessoas (WHO, 2010).

Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, com estágios de desenvolvimento no inseto vetor triatomíneo e no hospedeiro mamífero, onde induz um quadro clínico com características e consequências variadas. No intestino do vetor, epimastigotas replicam-se e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, a forma infectante do parasito que é transmitida para os mamíferos através das fezes do vetor infectado durante o repasto sanguíneo. Este estágio entra na corrente sanguínea e, finalmente, invade uma variedade de tipos celulares, onde sofrem diferenciação em amastigotas. Os amastigotas intracelulares diferenciam-se em tripomastigotas que são liberados na corrente sanguínea e invadem outras células ou são ingeridos pelo vetor durante o repasto sanguíneo continuando o ciclo (Fig. 1). Durante a fase aguda, todos os tipos de células nucleadas no hospedeiro humano são alvos em potencial para a infecção. Com o desenvolvimento da resposta imune, a parasitemia reduz a uma concentração subpatente e o número de parasitos nos tecidos diminui substancialmente, sinalizando o fim da fase aguda. No entanto, uma vez que o parasito não é eliminado completamente, a infecção de tecidos específicos, como músculo cardíaco ou gânglios entéricos, persiste indefinidamente na vida do hospedeiro (RASSI Jr *et alii*, 2010).

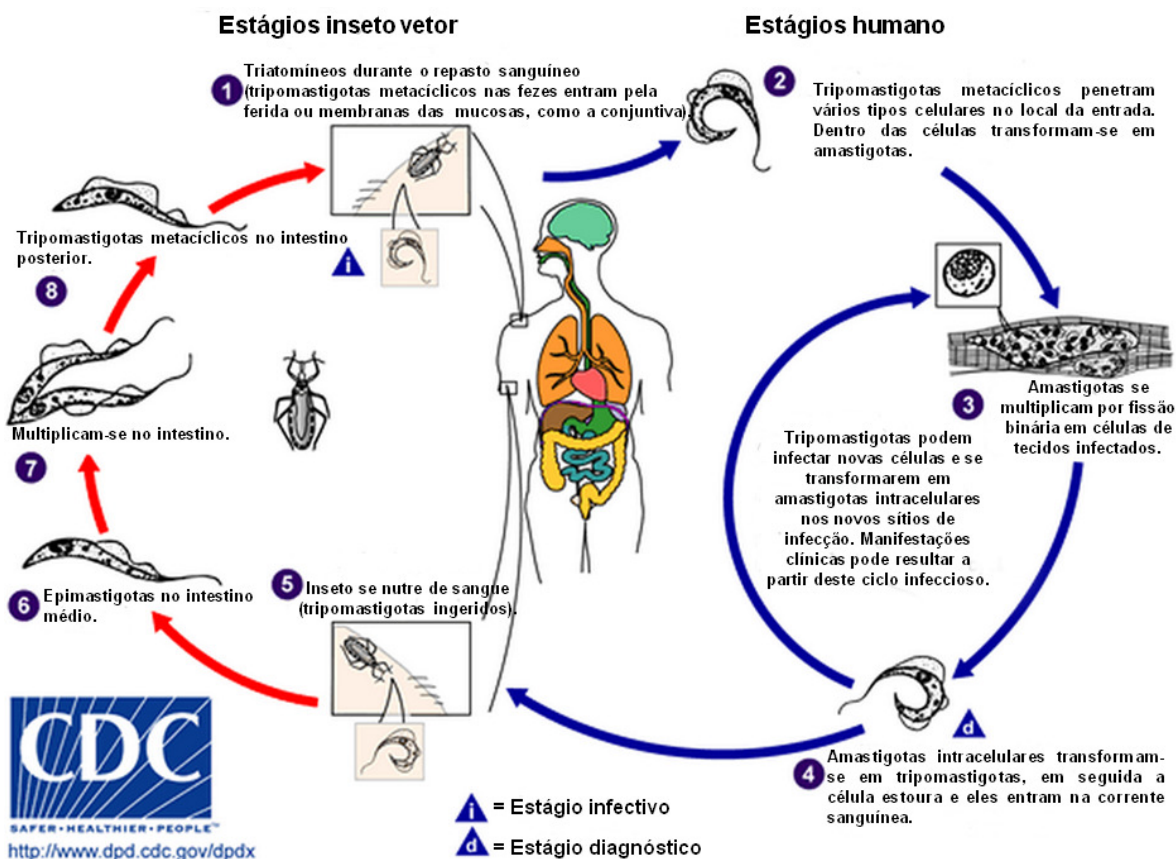


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Tripomastigotas metacíclicos infectantes de *Trypanosoma cruzi* são transmitidos pelas fezes de insetos triatomíneos vetores infectados durante o repasto sanguíneo (1). Parasitos infectam diferentes tipos de células, onde diferenciam-se em formas amastigotas (2) e se multiplicam por fissão binária (3). Amastigotas intracelulares diferenciam-se em tripomastigotas que são liberados na corrente sanguínea e invadem outras células (4) ou são ingeridos pelo vetor durante o repasto (5). Tripomastigotas se transformam em epimastigotas (6), e multiplicam-se no intestino do triatomíneo (7) e se diferenciam em tripomastigotas infectantes (8) (Adaptado de CDC, 2010).

O processo de adesão do parasito à célula hospedeira envolve interações fundamentais entre a superfície da célula hospedeira e a do parasito, onde diferentes moléculas parecem estar envolvidas no reconhecimento e na invasão. Após a adesão, ocorrem modificações nas membranas do parasito e do hospedeiro, mecanismo este que envolve ligante-receptor e atividade proteolítica. Estudos demonstraram que a invasão das células pelo *T. cruzi* é realizada por um mecanismo distinto de fagocitose, a invasão das células não fagocíticas não requer projeções da membrana plasmática da célula hospedeira. Assim, o parasito entra por depressões da membrana, o que pode ser evidenciado com a utilização de anticorpos monoclonais anti-vimentina e anti-actina, observando a disrupção do citoesqueleto nestes filamentos em células de fibroblasto infectadas por *T. cruzi* (LOW *et alii*, 1992).

Durante a infecção, lisossomos são recrutados para o local de adesão onde forma-se uma vesícula parasitófora. A formação dessa vesícula depende de um mecanismo liberador de Ca^{2+} da célula induzido pelo parasito, sugerindo que o Ca^{2+} pode ser o agente mediador na disrupção dos filamentos do citoesqueleto durante a infecção das células pelo *T. cruzi* (LOW *et alii*, 1992; PEREIRA *et alii*, 1993; YOSHIDA, 2006).

Esse mecanismo de invasão é altamente complexo e envolve várias proteínas do parasito, como a prolil-oligopeptidase, as glicoproteínas de 90 kDa (GP90), de 82 kDa (GP82), GP35/50, a oligopeptidase B, a cruzipaina e a penetrina que promovem a adesão do parasito às células (ORTEGA-BARRIA & PEREIRA, 1991; RAMIREZ *et alii*, 1993; SANTANA *et alii*, 1992; SANTANA *et alii*, 1997; YOSHIDA *et alii*, 1993; YOSHIDA, 2006; YOSHIDA, 2008). A elevação dos níveis intracelulares de cálcio na célula e o recrutamento de lisossomos causa a acidificação do pH. O meio ácido parece, também, ter papel importante no início da diferenciação de tripomastigotas em amastigotas, forma intracelular proliferativa. Esse processo se inicia no vacúolo e termina no citoplasma. Após sucessivas divisões binárias, os amastigotas transformam-se em tripomastigotas em um processo igualmente dependente de atividade enzimática. Por fim, a célula hospedeira rompe-se e libera tripomastigotas no meio extracelular. Desta forma os parasitos estão aptos a começar novo ciclo, infectando células vizinhas (ANDREWS & COLLI, 1982; BURLEIGH & WOOLSEY, 2002; TANOWITZ *et alii*, 1992; YOSHIDA, 2006).

Desenvolvimento da infecção e tratamento

A doença de Chagas pode se desenvolver em três fases: aguda, indeterminada (latente) e crônica. A fase aguda da doença normalmente é assintomática, mas pode apresentar algumas manifestações como febre, mal-estar e dor de cabeça (CASTRO *et alii*, 2006). Os indivíduos que resistem à fase aguda evoluem para a fase indeterminada (CASTRO *et alii*, 2006), que pode ser assintomática ou sintomática, podendo manter a infecção de forma latente e sem sintomas por vários anos (LANA & TAFURI, 2005). A infecção pode levar ao desenvolvimento de complicações cardíacas e digestivas, sobretudo na fase crônica, que muitas vezes culmina com a morte do indivíduo. Caracteriza-se por apresentar baixa parasitemia e ausência de febre (LANA & TAFURI, 2005).

Os quimioterápicos utilizados para tratar a infecção atualmente são Benzonidazol e Nifurtimox. Entretanto nenhum destes compostos é ideal porque são ineficientes durante a fase crônica da doença e apresentam sérios efeitos colaterais, requerem administração por

longos períodos de tempo sob supervisão médica, há grande variação na susceptibilidade de isolados do parasito além de apresentarem alto custo. Uma análise proteômica revelou que os parasitos desenvolvem resistência multigênica ao Benzonidazol. Ambos os compostos devem ser prescritos para pacientes que estão na fase agudada da doença, independentemente do meio de transmissão (AMATO NETO, 1999; ANDRADE *et alii*, 2008; FAUNDEZ *et alii*, 2005; LEVI *et alii*, 1996; TEIXEIRA, 1990). Portanto, permanece a necessidade da busca por medicamentos com efeitos colaterais reduzidos e eficácia comprovada, uma vez que a doença foi e continua a ser um problema econômico e social de muitos países da America Latina (MATHERS *et alii*, 2007; MONCAYO & SILVEIRA, 2009).

Uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas drogas é a concepção de compostos que interfiram nos mecanismos pelos quais os tripanosomatídeos mantêm os níveis de glutathione (GSH) reduzida, necessária para a defesa contra estresse oxidativo. A importância das atividades funcionais das enzimas metabólicas no mecanismo de infecção do hospedeiro mamífero pelo *T. cruzi* tem sido demonstrada em várias pesquisas. A importância dessas atividades as tornam fatores de virulência face à potencialidade de inibidores das enzimas relacionadas à glutathione como alvo para o desenvolvimento de substâncias candidatas a fármacos, portanto, potenciais alvos terapêuticos (KRAUTH-SIEGEL & COOMBS, 1999).

Sistema óxido redutor nos tripanosomatídeos

O sistema redox tem uma variedade de funções importantes para os protozoários parasitos, sugerindo que as enzimas envolvidas são fundamentais para as suas sobrevivências. Tal como outros organismos que vivem em um ambiente aeróbio, os tripanosomatídeos também estão expostos a espécies reativas de nitrogênio (NOS) e oxigênio (ROS), tais como ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH), gerados por seu metabolismo. No entanto, os protozoários parasitos não lidam só com os seus próprios metabólitos tóxicos endógenos mas também com o estresse oxidativo (ou respiratório) do sistema imunitário do hospedeiro. Nos últimos anos, vários sistemas de antioxidantes e de desintoxicação dos protozoários parasitos foram identificados e o seu papel na sobrevivência dos parasitos investigados (FAIRLAMB & CERAMI, 1992; MULLER *et alii*, 2003; FILOMENI *et alii*, 2005; FAUNDEZ *et alii*, 2008).

Ao contrário do que ocorre em mamíferos e na maioria dos outros organismos, o metabolismo redox de tripanosomatídeos depende de uma espermidina conjugada à glutatona chamada tripanotiona (N^1, N^8 - bis glutationilespermidina). A tripanotiona é sintetizada por uma reação dependente de ATP catalisada pela tripanotiona sintetase usando o tripeptídeo glutatona (GSH) e a poliamina espermidina como substratos. Os tripanosomatídeos apresentam verdadeiros estoques celulares da tripanotiona para evitar o estresse oxidativo e manter o equilíbrio celular redox, contribuindo para sua sobrevivência no hospedeiro. A tripanotiona, juntamente com a sua enzima associada, a tripanotiona redutase (TriR), parece ter substituído muitas funções metabólicas antioxidantes da glutatona/glutatona redutase e tiorredoxina/tiorredoxina redutase em sistemas de outros organismos (FAIRLAMB *et alii*, 1987; BREKKEN E PHILLIPS, 1998; ABBOTT *et alii*, 2002; OZA *et alii*, 2002; FAUNDEZ *et alii*, 2008).

A proteção do parasito contra o estresse oxidativo é conseguida através da oxidação da tripanotiona da forma de ditiol ($T(SH)_2$) para a forma de dissulfeto ($T(S)_2$), seguida por regeneração da $T(SH)_2$ pela tripanotiona redutase, enzimaticamente dependente de NADPH (FAIRLAMB & CERAMI, 1992). Estes compostos foram encontrados em todos os tripanosomatídeos, mas em nenhum outro organismo (FAIRLAMB *et alii*, 1985).

A biossíntese da tripanotiona envolve duas vias metabólicas distintas nos tripanosomatídeos. No *T. brucei*, a espermidina é sintetizada a partir da ornitina via putrescina e, posteriormente, conjugada com GSH para produzir glutationilespermidina e tripanotiona (FAIRLAMB *et alii*, 1987). Em contraste, no *T. cruzi* (Fig. 2), poliaminas não podem ser sintetizadas *de novo* a partir de seus aminoácidos precursores (ornitina, arginina e lisina). Em vez disso, putrescina e cadaverina exógenas são absorvidas e convertidas em espermidina ou aminopropilcadaverina e após, em tripanotiona ou homotripanotiona, respectivamente (HUNTER *et alii*, 1994). A biossíntese de homotripanotiona parece ser exclusiva para *T. cruzi*, um parasita que possui um número de transportadores de alta afinidade para putrescina, cadaverina e espermidina e que não são encontrados em *T. brucei* (LE QUESNE & FAIRLAMB, 1996).

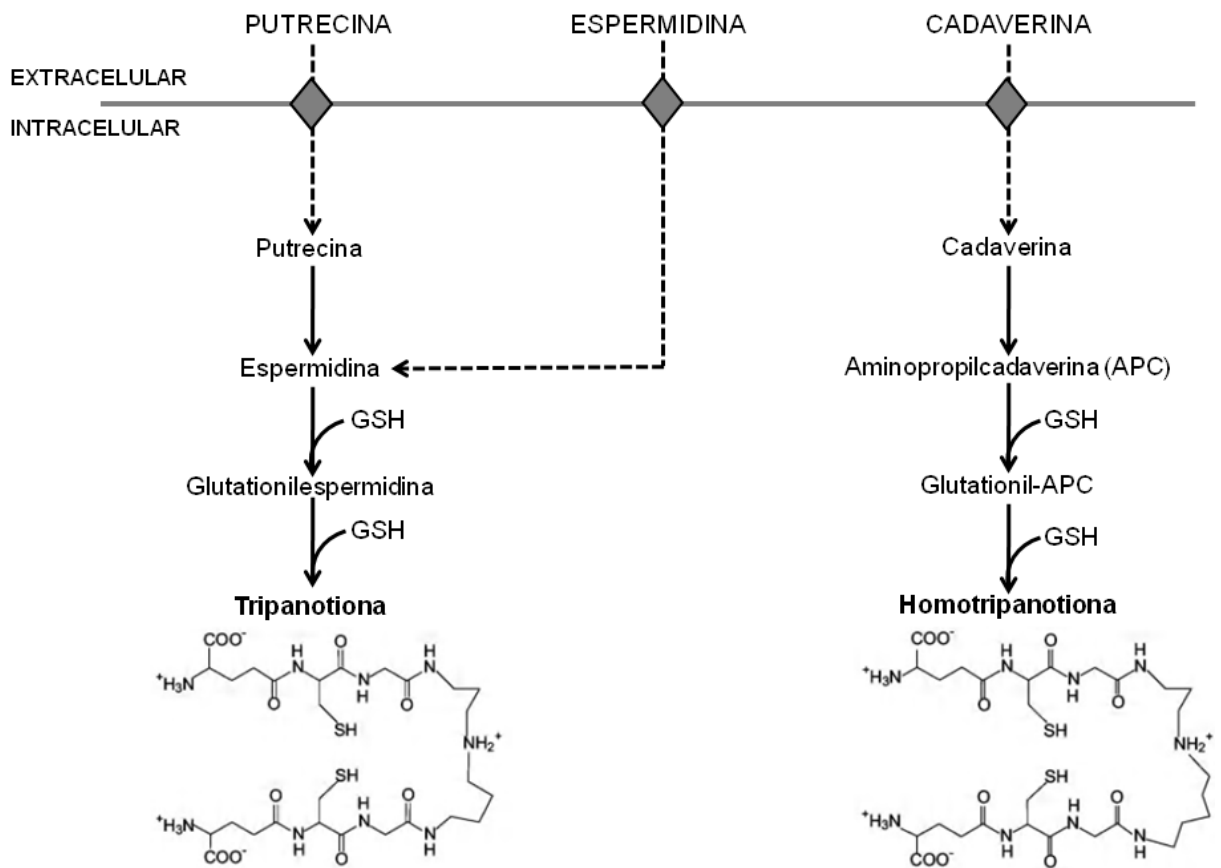


Figura 2. Vias biossintéticas de tripanotona e homotripanotona em *T. cruzi*. Vias de transporte são mostradas em linhas tracejadas. Putrecina e cadaverina exógenas podem ser prontamente absorvidas e convertidas em espermidina ou aminopropilcadaverina dando origem à tripanotona ou homotripanotona, respectivamente (Adaptado de OZA *et alii*, 2002).

O sistema tiol-redox baseado no tiol de baixa massa molecular N¹, N⁸-bis glutationileespermidina e tripanotona redutase (TriR) é único nos tripanosomatídeos. É importante notar que os tripanosomatídeos não possuem a glutationa redutase (GR), encontrada em outras células, e embora GR do hospedeiro e TriR do parasito pertençam a mesma família de flavoproteínas oxidoreduzases de dissulfeto, a especificidade mutuamente exclusiva para o seu substrato dissulfureto indica que a inibição seletiva da TriR é possível (ARIYANAYAGAM & FAIRLAMB, 2001; HUNTER *et alii*, 1994). Várias estratégias genéticas têm sido utilizadas com sucesso para validar TriR como um alvo de droga em *Leishmania* spp. (DUMAS *et alii*, 1997; TOVAR *et alii*, 1998A; TOVAR *et alii*, 1998B) e em *T. brucei* (KRIEGER *et alii*, 2000).

Sem exceção, todos os organismos contêm altas concentrações de pelo menos um tiol de baixa massa molecular para a manutenção de um ambiente intracelular

reduzido. Embora esta seja geralmente obtida por meio de GSH, alguns organismos utilizam análogos de GSH, como homoglutationa nos feijões (CARNEGIE, 1963), Nl-glutationilpermidina na fase estacionária de *Escherichia coli* (TABOR & TABOR, 1975) e *Crithidia fasciculata* (SHIM & FAIRLAM, 1988), tripanotiona nos Tripanosomatídeos (OZA *et alii*, 2002) e L- γ -glutamil-L-cisteína em halobacteria (NEWTON & JAVOR, 1985).

A Glutationa (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina, GSH) é o mais abundante tiol celular de baixa massa molecular. Está presente em elevados níveis, amplamente distribuída nos tecidos de animais, plantas e microrganismos (MEISTER, 1988; JANOWIAK *et alii*, 2006). A homeostase da GSH é criticamente importante para o organismo, possui um papel fundamental no metabolismo da biotransformação e eliminação de xenobióticos mantendo o equilíbrio redox intracelular e protegendo a célula contra danos oxidativos e químicos (BIRAGO *et alii*, 2001; HIBI *et alii*, 2004). O sistema antioxidante da GSH protege primordialmente as mitocôndrias de danos oxidativos, muitas evidências suportam esta hipótese, como *Entamoeba histolytica* e *Trichomonas vaginalis*, que não possuem mitocôndrias, são completamente desprovidos de glutaciona (FAHEY *et alii*, 1984). As mitocôndrias possuem um sistema de transporte de alta afinidade para a captação de GSH sintetizada no citossol (GRIFFITH & MEISTER, 1985; KUROSAWA *et alii*, 1990; MARTENSSON *et alii*, 1990). A deficiência de GSH induzida pela administração de L-butionina sulfoximina (L-BSO) causa dano mitocondrial no cérebro de ratos recém-nascidos (JAIN *et alii*, 1991). No entanto, se a função antioxidante da GSH é essencial para o desempenho do papel mitocondrial em todos os eucariotos, então seria de se esperar que o sistema mostrasse um padrão de distribuição similar de tripanotiona. Isso não foi encontrado, uma vez que a tripanotiona é exclusivamente localizada no compartimento citossólico de *T. brucei* em duas fases diferentes de seu ciclo de vida (SMITH *et alii*, 1991). A GSH também tem sido proposta a desempenhar um papel importante na proteção do DNA contra danos causados pelos radicais induzidos por radiação ionizante (REVESZ, 1985).

A biossíntese da GSH inicia-se com a formação da ligação peptídica entre a carboxila γ do glutamato e a amina da cisteína, com a ação catalítica da enzima γ -glutamilcisteína sintetase (GCS) formando o dipeptídeo L- γ -glutamil-L-cisteína, a formação desta ligação peptídica necessita da ativação da carboxila γ , realizada por ATP (reação 1). A segunda reação é catalisada pela glutaciona sintetase (GS), onde o ATP ativa a carboxila da cisteína para possibilitar que ela se condense com a amina da glicina formando então o tripeptídeo L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina (reação 2) (HUANG *et alii*, 1988; MEISTER,

1988; TEW, 1994; LUEDER & PHILLIPS, 1996; BREKKEN & PHILLIPS, 1998; GRIFFITH, 1999; LÜERSEN *et alii*, 1999; BIRAGO *et alii*, 2001; JANOWIAK *et alii*, 2006) (Fig. 3).

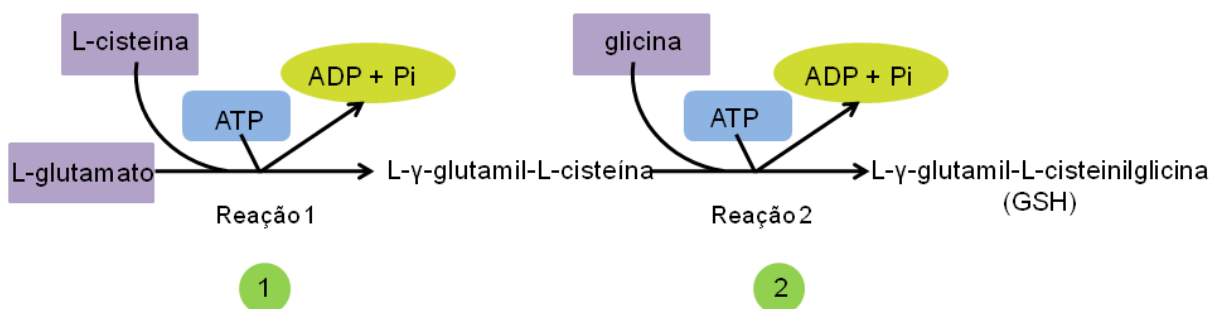


Figura 3. Síntese da Glutaciona. Primeira etapa para a formação do tripeptídeo glutaciona, resultando na ligação peptídica entre a carboxila γ do glutamato e a amina da cisteína, com hidrólise de ATP, catalisada pela γ -glutamilcisteína sintetase (1). Na segunda etapa o ATP ativa a carboxila da cisteína para possibilitar que ela se condense com a amina da glicina formando o tripeptídeo L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina (2).

A atividade enzimática da γ -glutamilcisteína sintetase (GSC) já foi descrita em fígado e rim de ratos, fígado de suínos, em eritrócitos humanos e bovinos e em gema de ovos (DAVIS *et alii*, 1973; MAJERUS *et alii*, 1971; VAN BUSKIRK *et alii*, 1978; YOUNG *et alii*, 2010). Essa atividade enzimática foi também encontrada em *Plasmodium falciparum*, o principal agente etiológico da malária humana (ATAMNA & GINSBURG, 1997), além do *T. brucei*, causador da tripanosomíase africana (LUEDER *et alii*, 1996; HUYNH *et alii*, 2003) e em *Leishmania* (MUKHERJEE *et alii*, 2009). O gene γ -glutamilcisteína sintetase de *T. cruzi* (*gcsTc* - Tc00.1047053507625.99) apresenta uma fase aberta de leitura de 2082 pb que codifica uma proteína com 693 resíduos de aminoácidos com massa molecular predita de 79.67 kDa. Teoricamente a proteína não apresenta peptídeo sinal e nem domínio transmembrânico (GeneDB, 2008).

A atividade enzimática da glutaciona sintetase (GS) já foi descrita em vários organismos como fungos (GRANT *et alii*, 1997), plantas (PASTERNAK *et alii*, 2008), protozoários (REPETTO *et alii*, 1996; ROMAO *et alii*, 1999; LUERSEN *et alii*, 2000; MEIERJOHANN *et alii*, 2002; FYFE *et alii*, 2010) e eritrócitos humanos (RAFTOS *et alii*, 2010). O gene glutaciona sintetase de *T. cruzi* (*gsTc* - Tc00.1047053508865.10) apresenta uma fase aberta de leitura de 1608 pb que codifica uma proteína com 535 resíduos de

aminoácidos e massa molecular predita de 58,63 kDa. Assim como a GCSTc, esta proteína não apresenta peptídeo sinal e nem domínio transmembrânico (GeneDB, 2008).

Estudos desenvolvidos em vários laboratórios demonstraram que um inibidor específico da γ -glutamilcisteína sintetase, o L-BSO, pode curar a infecção ou prolongar a sobrevivência de camundongos infectados por *T. brucei*, uma vez que ele é capaz de interferir na formação da tripanotona (LUEDER E PHILLIPS, 1996; BREKKEN E PHILLIPS, 1998; ABBOTT *et alii*, 2002). Portanto, o estudo das enzimas metabólicas que participam no processo de formação da GSH e do seu conjugado tripanotona é de grande relevância para o entendimento da sua importância no metabolismo, na sobrevivência e no ciclo de vida dos parasitos. Nesse contexto, é justificável a caracterização da γ -glutamilcisteína sintetase e glutatona sintetase presente em *T. cruzi*, as quais podem representar potenciais alvos para o desenvolvimento de quimioterápicos. Uma vez que suas inibições poderiam resultar na ausência da GSH e consequentemente da tripanotona, ocasionando uma maior exposição do parasito aos processos oxidativos do sistema imunitário, contribuindo para sua morte e o controle da infecção.

Objetivo

Tendo em vista o importante papel que as enzimas metabólicas exercem nos processos de virulência e persistência de microrganismos patogênicos, estudá-las é fundamental, não somente para conhecer os mecanismos moleculares da fisiologia das doenças parasitárias, uma vez que o avanço do conhecimento destes mecanismos tem revelado fatores de virulência, mas também para encontrar possíveis alvos de quimioterapia para tratamento destas doenças.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é a caracterização molecular das enzimas γ -glutamylcisteína sintetase e glutathione sintetase de *T. cruzi*. Para tanto, as atividades desenvolvidas para que o objetivo fosse alcançado foram:

1. Clonagem dos genes em vetores de expressão heteróloga;
2. Purificação das enzimas recombinantes expressas em sistema heterólogo;
3. Produção de soro anti- γ -glutamylcisteína sintetase e anti-glutathione sintetase;
4. Caracterização da expressão das proteínas nativas por meio de reações imunes.

Metodologia

Análise de bioinformática

Usando os bancos de dados GeneDB (www.genedb.org), NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), UniProt (www.uniprot.org), ExPASy Proteomics Server (<http://expasy.org/cgi-bin/protparam>) e PDB (www.pdb.org) foi possível obter as sequências gênicas e protéicas da γ -glutamilcisteína sintetase (Tc00.1047053507625.99; *gcsTc*) e glutationa sintetase (Tc00.1047053506659.30; *gsTc*). As sequências peptídicas preditas da tradução dos genes foram obtidas usando o programa BLAST, alinhadas e visualizadas usando os programas ClustalW e BioEdit.

Obtenção do parasito

As formas epimastigotas foram cultivadas em meio Liver Infusion Tryptone (LIT), suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino inativado e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina a 28 °C. As formas amastigotas e tripomastigotas foram obtidas após infecção de células L6 mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina a 37 °C com 5% de CO_2 .

Extração de DNA genômico do *Trypanosoma cruzi*

O DNA genômico foi extraído das formas epimastigotas do parasito segundo protocolo de Medina-Acosta & Cross (1993).

Extrato total de *Trypanosoma cruzi*

A cultura de parasitos foi centrifugada e as células lavadas em PBS 1X por três vezes e, então foram lisadas com seringa e agulha de pequeno calibre, na presença de 2% SDS e inibidor de protease *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche).

Amplificação dos genes *gcsTc* e *gsTc*

A partir das sequências de nucleotídeos presentes nos bancos de dados, oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso foram desenhados para cada um dos genes. Para a clonagem do gene *gcsTc* no vetor de expressão pET-28a, foram adicionados sítios das enzimas de restrição *XhoI* e *NdeI* nos iniciadores. No oligonucleotídeo senso inseriu-se sítio para a enzima *NdeI* (sequência sublinhada) (5'-CATATGATGGAACTCTTGGGGGACGCTGAAC-3'), e no oligonucleotídeo anti-senso inseriu-se sítio para a enzima *XhoI* (sequência sublinhada) (5'-CTCGAGTTATAACAAGCGCCAGTGAAT-3'). Para a clonagem do gene *gsTc* foram adicionadas as mesmas enzimas de restrição, *NdeI* (sequência sublinhada) no oligonucleotídeo senso (5'-CATATGGAACTCTTG GGGGACGCTGAAC-3'), e *XhoI* (sequência sublinhada) no oligonucleotídeo anti-senso (5'-CTCGAGTTATAACAAGCGCCAGTGAAT-3').

As amplificações dos genes foram realizadas por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) usando DNA genômico de *T. cruzi* da cepa CL Brener como molde. Em cada reação adicionaram-se 50 ng de DNA genômico; 0,2 mM de dNTP; 1,5 mM de MgCl₂; 1U de *Taq DNA Polimerase* ou *High Fidelity Polimerase* (Invitrogen) e 1X do tampão da enzima. Realizada em um termociclador, a PCR programada consistiu na desnaturação inicial do DNA a 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento dos iniciadores por 30 s a 62 °C, extensão a 68 °C por 3 min e uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 min.

Eletroforese em gel de agarose e purificação dos insertos

Utilizando a técnica de eletroforese horizontal em gel de agarose foi possível analisar o DNA genômico, produtos da amplificação por PCRs e digestões de DNA. Para tal utilizou-se gel de agarose 0,8% corado com 1µg/mL de Brometo de etídio em tampão Tris-

acetato (TAE), sob voltagem constante de 80 V. As amostras foram aplicadas no gel em tampão de amostra 1X (50 mM de Tris pH 7,6; 25% de azul de bromofenol; 25% de xileno cianol e 6% de glicerol). Para a eluição e purificação dos insertos e vetor, utilizamos um gel de agarose extenso sem brometo, onde as bandas correspondentes aos insertos e vetor foram excisadas do gel e em seguida purificadas utilizando-se o kit de purificação *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). Como padrão usou-se o marcador *1Kb plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Clonagem dos genes *gcsTc* e *gsTc*

Os produtos amplificados, de aproximadamente 2082 pares de bases (*gcsTc*) e 1608 pares de base (*gsTc*), foram ligados diretamente no vetor de clonagem T/A pCR2.1 (Invitrogen) a fim de se obter o plasmídeo recombinante. Para a clonagem usaram-se 60 ng de inserto, 50 ng do vetor de clonagem, 1U de enzima *T4 DNA ligase* (Invitrogen) e tampão da enzima para concentração final de 1X. O sistema de reação foi incubado a 14 °C durante 16 h. A seguir, o plasmídeo recombinante foi transformado em bactéria competente *Escherichia coli* linhagem DH5 α . As células submetidas ao processo de transformação foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo ampicilina (50 μ g/mL), IPTG (0,5 mM) e X-Gal (80 μ g/mL), e incubadas por toda a noite em estufa a 37 °C, onde cresceram colônias azuis e brancas. As colônias brancas foram coletadas e crescidas em tubos individuais com 5 mL de meio LB líquido adicionado de ampicilina, a 37 °C e 200 rpm por 16 h. O DNA plasmidial das bactérias (colônias brancas) foi extraído usando o kit *HiPure Plasmid DNA Purification* (Invitrogen) para a realização de análise de restrição enzimática e confirmação da clonagem.

Confirmada a clonagem no pCR2.1, e após o resultado do sequenciamento o plasmídeo foi clonado no vetor de expressão pET28a (Novagen). O vetor de expressão pET28a contém uma região que codifica uma cauda composta por seis resíduos de histidina, expressa junto com a proteína alvo na sua extremidade N-terminal. A clonagem foi realizada a 16 °C por 16 h, na razão molar de 1:3 de vetor: inserto. Após a incubação, o novo plasmídeo recombinante foi inserido em *E. coli* DH5 α por choque térmico. As células submetidas ao processo de transformação foram plaqueadas em meio LB-ágar com kanamicina (100 μ g/mL) e crescidas em estufa a 37 °C durante toda a noite. Todas as colônias da placa foram crescidas individualmente em meio LB líquido com kanamicina, e submetidas à extração do DNA, e

novamente submetidos a teste de restrição enzimática para confirmação da clonagem. Os vetores recombinantes obtidos foram chamados de *gcs*-pET 28a e *gs*-pET-28a.

Sequenciamento

O DNA foi enviado ao Centro de Estudos do Genoma Humano na Universidade de São Paulo para sequenciamento. A amplificação foi realizada utilizando-se iniciadores para o promotor T7 (5'-TAATACGAC TCACTATAGGG-3') e para região terminadora T7 (5'-GCTAGTTAT TGCTCAGCGG-3').

Expressão heteróloga das proteínas

Após a confirmação da clonagem dos genes, os plasmídeos recombinantes *gcs*-pET 28a e *gs*-pET28a foram introduzidos em *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen) por meio de transformação, seguindo-se de plaqueamento em meio LB-ágar na presença de kanamicina. O vetor vazio (pET28a) foi empregado como controle. Foram selecionadas três colônias de cada transformação para a indução e expressão das proteínas. Cada colônia foi colocada em meio LB com kanamicina (100 µg/mL) e incubadas a 37 °C e a 200 rpm até que atingissem uma densidade óptica (OD₆₀₀) de 0,6 a 1,0. A expressão da proteína recombinante foi induzida por isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e as condições ótimas de expressão foram obtidas por ensaio em diferentes temperaturas (19°C, 20°C, 22°C, 25°C, 30°C e 37°C), concentrações de IPTG (1 mM; 0,5 mM; 0,1 mM e 0,05 mM) e tempos de indução (30 min, 1h, 2 h, 3 h, 5 h e por toda a noite) a 200 rpm.

Extração das proteínas recombinantes

Reagente BugBuster®

As culturas de células BL21-DE3 em LB foram centrifugadas por 15 min a 5000 xg, e após o sobrenadante descartado, ressuspendidas em reagente BugBuster® (Novagen), na

razão de 300 μ L para cada 1,5mL de cultura. Após 20 min de agitação à temperatura ambiente, o produto de lise obtido foi centrifugado a 15000 xg por 20 min, e as frações solúveis e insolúveis analisadas em SDS-PAGE.

Sonicação

Cultura de células previamente induzidas foram ressuspendidas em 15 mL de tampão de lise (20mM de Tris HCl pH 8,0; 500mM de NaCl e 0,2% de lisozima), ou tampão de ligação (1X = 500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7.9; 5 mM imidazol e 0,2% de lisozima) ou tampão 1 (25 mM HEPES pH 7,5; 500 mM NaBr; 2 mM β -mercaptoethanol; 1mM MgCl₂; 0,2% de lisozima e 5 mM imidazol) e incubadas a 37 °C por 30 min. Em seguida, foram submetidas a três ciclos de sonicação em banho de gelo, sal e etanol, com um processador ultra-sônico Vibra-CellVC130 (Sonics). Em pulsos de 7 s de duração, e intervalo de 1 s entre eles, num tempo total de 3 min, o tempo mínimo entre os ciclos era de 1 min para evitar aquecimento da amostra em amplitude entre 40 e 50.

Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

As proteínas foram analisadas em gel de poliacrilamida (N'N'-bis-metileno-acrilamida e acrilamida) sob condições desnaturantes e redutoras, na presença de SDS e β -mercaptoetanol. As amostras a serem analisadas foram fervidas por 5 min em tampão de amostra 5X (62,5 mM de Tris-HCl pH 6,8; SDS %; β -mercaptoetanol 5%; Azul de bromofenol 0,08% e Glicerol 30%) em seguida colocadas no gelo e depois aplicadas no gel. Para a eletroforese, utilizou-se tampão de corrida 1X (25 mM de Tris; 191 mM de Glicina e SDS 0,1%) sob voltagem inicial de 90 e final de 160 V. Após a eletroforese, o gel foi corado com Azul de Coomassie. Como padrão utilizou-se o marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen).

Purificação das proteínas recombinantes

Purificação de corpo de inclusão

As proteínas rGCSTc e rGSTc com caudas de histidina (His) nas extremidades N-terminais foram purificadas de corpos de inclusão por cromatografia de afinidade em coluna com Agarose-níquel *His-Bind Purification Kit*[®] (Novagen).

Para a purificação de ambas as proteínas de corpo de inclusão, foram induzidos 100 mL de cultura com 0,1 mM de IPTG a 37°C durante 16 h a 200 rpm. Após decorrido o tempo de incubação, a cultura foi centrifugada a 5000 xg por 15 min e o precipitado ressuspenso em tampão de lise (20mM de Tris HCl pH 8,0; 500mM de NaCl e 0,2% de lisozima) seguido de sonicação. A solubilização das proteínas foi realizada com uréia 6 M. Na coluna, foi adicionado 1 mL de resina em estoque em etanol, resultando em um volume final de 500 µL de resina assentada. Após várias lavagens com H₂O milliQ, a resina foi carregada com cinco (5 x 500 µL) volumes de NiSO₄, 400 mM (*Charge Buffer*), e ativada com três volumes de tampão de ligação e só então o extrato foi adicionado. Em seguida foram aplicados 30 volumes de tampão de ligação. As amostras foram eluídas com seis volumes de tampão de eluição (Uréia 6 M; Tris-HCl 20 mM pH 7,9; NaCl 500 mM e imidazol de 100 mM a 1M). Alíquotas foram recolhidas em cada etapa da purificação, para posterior análise em SDS-PAGE.

Purificação da fração solúvel

Para a purificação da fração solúvel da rGSTc, as bactérias transformadas foram induzidas (300 mL de cultura) com 0,05 mM de IPTG a 22°C durante 16 horas. A seguir, a cultura foi centrifugada a 5000 xg por 15 min, e as células ressuspenso em tampão de lise, tampão de ligação, ou tampão 1 seguido de sonicação. O extrato solúvel contendo a enzima recombinante foi aplicado em coluna de níquel (300 µL de resina assentada e preparada conforme instruções do fabricante) com afinidade por histidina (*His-Bind Purification Kit*[®], Novagen). Em seguida, a coluna foi lavada com tampão de ligação correspondente a 30 volumes de resina. As amostras foram eluídas com quatro volumes de tampão de eluição (Tris-HCl 20 mM pH 7,9; NaCl 500 mM e 1,0 M de imidazol). As alíquotas foram recolhidas em cada etapa da purificação para posterior análise em SDS-PAGE. As frações puras foram

dialisadas contra Tris-HCl 25 mM, a 4 °C e as enzimas foram usadas imediatamente ou estocadas a - 20 °C.

Imunização

Camundongos Balb/C machos com um mês de idade foram imunizados intradermicamente com rGCSTc ou rGSTc purificadas. A primeira dose consistiu de 5 µg da proteína recombinante por animal, homogeneizada com adjuvante completo de Freund na proporção de 1:1. Na segunda dose foi utilizada a mesma concentração de proteína, porém homogeneizada com adjuvante incompleto de Freund nas mesmas proporções, 15 dias após a primeira imunização. A terceira dose foi efetuada apenas com a mesma quantidade de proteína por animal diluída em PBS 1X. Os animais foram sacrificados 10 dias depois, e o soro recolhido foi armazenado em glicerol na proporção 1:1 a -20 °C. O soro pré-imune foi retirado 10 dias antes da primeira imunização, por via do sinus orbital.

Immunoblot

Para verificar a expressão das proteínas foram preparados extratos totais de *E. coli* e de epimastigotas de *T. cruzi*. Para tal, foi usado gel de poliacrilamida 10% ou 12%, onde a concentração final de proteínas por poço correspondeu a 1×10^7 células. Terminada a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond-C Extra*, Amersham), em um sistema resfriado utilizando tampão de transferência 1X (25 mM de Tris; 192 de glicina; 20% metanol e 0,1% de SDS). Para certificar que as proteínas foram transferidas, a membrana foi corada com Ponceau S. Confirmada a transferência, a membrana foi incubada em PBS 1X-5% de leite desnatado durante 1 h. Em seguida, a membrana foi incubada com o primeiro anticorpo, pré-imune ou imune, na diluição de 1:200 em PBS 1X-1% leite por 2 h à temperatura ambiente. Depois de três lavagens, cada uma de 5 min com PBS 1X, a membrana foi incubada com o segundo anticorpo α -IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (*Goat Anti-mouse IgG alkaline Phosphatase Conjugate*, Novagen), diluído 1:3000 durante 2 h. A membrana então foi incubada na presença de tampão da fosfatase alcalina por 10 min, e as bandas foram reveladas na presença do substrato da

enzima, NBT/BCIP (Promega). Como padrão utilizou-se o marcador *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio Rad).

Imunofluorescência

Para determinar a localização das proteínas nas formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, foi realizado o teste de imunofluorescência. As lâminas e lamínulas utilizadas no experimento foram lavadas com etanol 70%, seguida de água milli-Q. As lâminas foram carregadas positivamente com uma solução de poli-Lisina que permite a adesão das células (1×10^7 parasitos por lâmina). A cultura de parasitos foi centrifugada a 2000 xg durante 10 min, e em seguida os parasitos foram lavados em PBS 1X por três vezes e fixados em formaldeído 3,7%. Em seguida, os parasitos foram colocados sobre a lâmina carregada e permeabilizados com Triton X-100 0,1% durante 10 min e lavados com PBS 1X. Após a lavagem, a lâmina foi incubada com ENHANCEN (Invitrogen) por 30 min e em seguida realizou-se o bloqueio com PBS1X-5% leite durante 30 min. Em seguida as lâminas foram incubadas com o primeiro anticorpo de interesse, diluído em PBS 1X-1% leite na diluição de 1:40 e 1:80, durante 2 h. Após a incubação com anticorpo secundário conjugado com *Alexa Fluor 488* (Invitrogen), adicionou-se *ProLong® Gold antifade reagent with DAPI* (Invitrogen), e observou-se em microscópio Confocal.

Resultados

Os oligonucleotídeos usados para amplificação dos genes *gcsTc* e *gsTc* foram desenhados a partir das sequências Tc00.1047053507787.99 e Tc00.1047053508865.10 respectivamente, obtidas no banco de dados GeneDB (www.genedb.org). A sequência Tc00.1047053507787.99 corresponde ao gene completo da γ -glutamilcisteína sintetase de *T. cruzi*. Sua fase aberta de leitura possui 2082 pb e codifica uma proteína de 693 resíduos de aminoácidos com massa predita de 79,67 kDa. A sequência Tc00.1047053508865.10 corresponde ao gene completo da glutatona sintetase de *T. cruzi*, sua fase aberta de leitura possui 1608 pb e codifica uma proteína de 535 resíduos de aminoácidos com massa predita de 58,63 kDa.

A amplificação do gene da *gcsTc* e *gsTc* por PCR foi realizada a partir do DNA genômico de *T. cruzi* da cepa CL Brener (Fig.4). A reação em cadeia da polimerase com os iniciadores específicos descritos na metodologia resultou em produtos amplificados com tamanhos estimados de 2082 (*gcs*) e 1608 pb (*gs*), dados coerentes com aqueles atribuídos às sequências depositadas no banco de dados (GENBANK GeneID: Tc00.1047053507787.99-*gcsTc*; Tc00.1047053508865.10-*gsTc*).

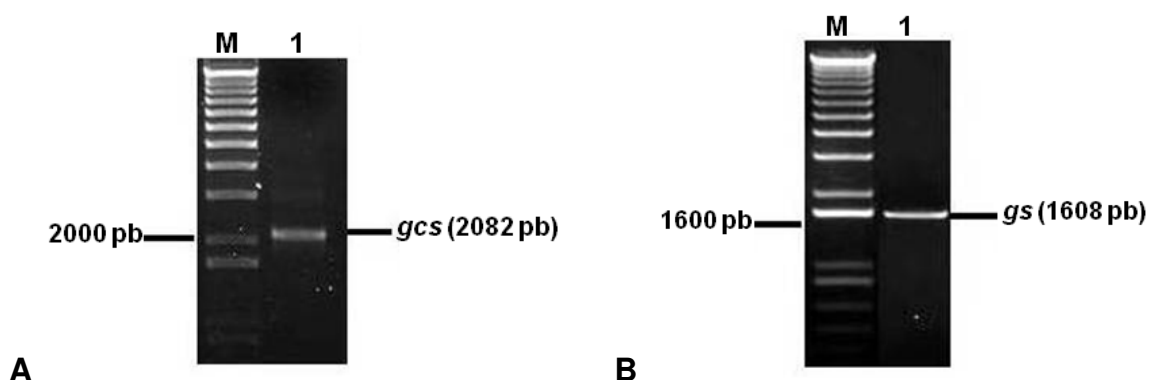


Figura 4. Amplificação dos genes da *gcs* e *gs* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando como molde DNA genômico de *T. cruzi*. Foto de gel de Agarose 0,8%. **M** – marcador *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). **(A) linha 1** – Amplificação do gene *gcs* (2082 pb). **(B) linha 1** – Amplificação do gene *gs* (1608 pb). A PCR foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso e sob as condições descritas na Metodologia.

Após a amplificação, os genes *gcsTc* e *gsTc* foram clonados no vetor T/A pCR 2.1 (Invitrogen). *E. coli* DH5 α transformada com o produto da ligação foi crescida em meio contendo ampicilina, X-Gal e IPTG com o objetivo de selecionar apenas aquelas colônias que apresentavam o inserto. As colônias brancas, que possuem o cassete da beta-galactosidase interrompido, foram submetidas à triagem por extração do DNA e teste de restrição enzimática.

Confirmada a presença do inserto, inoculou-se uma colônia em meio LB líquido contendo ampicilina, e o plasmídeo com o inserto foi extraído em larga escala. A presença do inserto no plasmídeo pCR 2.1 pôde ser confirmada por digestão dupla do plasmídeo com as enzimas *NdeI* e *XhoI* (Fig. 5).

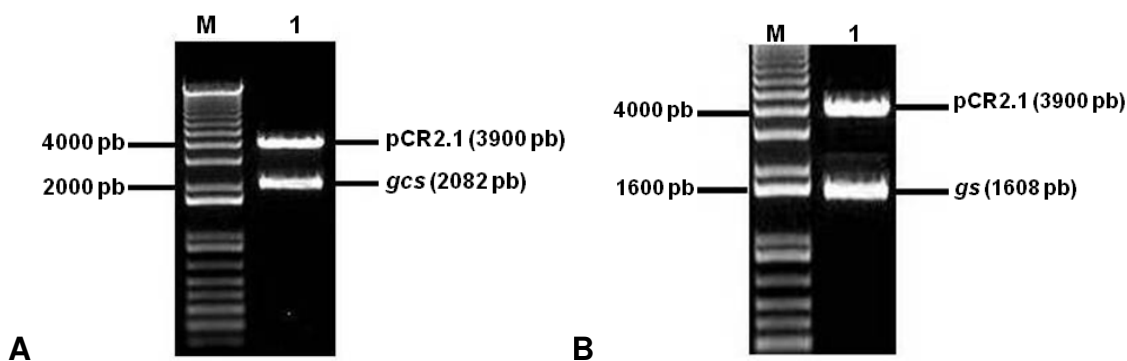


Figura 5. Análise de restrição enzimática e confirmação da clonagem dos genes no vetor de clonagem pCR2.1. Foto de gel de Agarose 0,8%. As clonagens dos genes foram confirmadas pela digestão dupla com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. **M** – marcador *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). **(A) linha 1** – *gcsTc* e pCR2.1 **(B) linha 1** – *gsTc* e pCR2.1.

Os fragmentos referentes aos insertos liberados da digestão, *gcsTc*-pCR2.1 e *gsTc*-pCR2.1, com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, foram ligados no vetor de expressão pET28a (Novagen). Os fragmentos da digestão eluídos do gel de Agarose foram corretamente ligados ao vetor de expressão pET28a, como indicado pela triagem dos plasmídeos extraídos e novamente digeridos com as enzimas *NdeI* e *XhoI* (Fig. 6), de todas as colônias encontradas na placa, havia apenas um clone positivo para *gcsTc*-pET28a, e dois para *gsTc*-pCR2.1 (dados não mostrados).

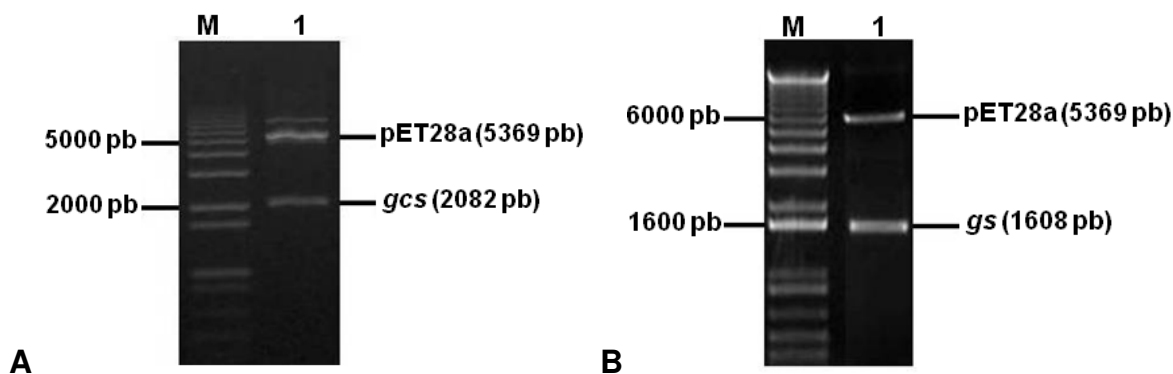


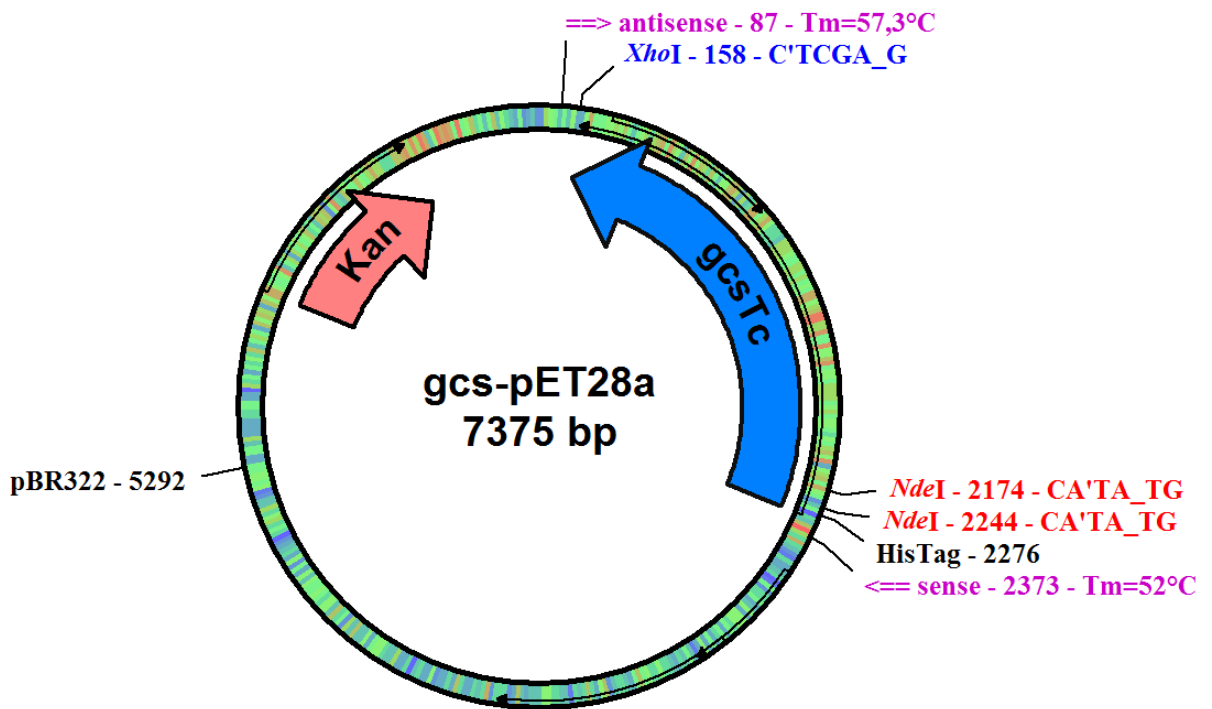
Figura 6. Análise de restrição enzimática e confirmação da clonagem dos genes no vetor de expressão pET28a. Foto de gel de Agarose 0,8%. As clonagens dos genes foram confirmadas pela digestão dupla com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. **M** – marcador *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). **(A) linha 1** – *gcsTc* e pET28a **(B) linha 1** – *gsTc* e pET28a.

O sentido e a fase de inserção da ligação dos insertos (*gcsTc* e *gsTc*) no pET28a foram confirmados pelo sequenciamento do vetor *gcsTc*-pET28a e *gsTc*-pET28a com os oligonucleotídeos aneladores para as regiões T7 promotora e terminadora. A análise dos resultados do sequenciamento indica que a fase aberta de leitura dos genes clonados codifica uma proteína de fusão com a cauda de poli-histidina cujas sequências são iguais às aquelas depositadas no banco de dados. A ligação *in silico* do fragmento sequenciado no vetor pET28a, bem como a tradução esperada de sua fase aberta de leitura, são identificadas na Fig. 7A e B.


```

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMGLLTTGGEPMRWGTDENNRAIPYVSSHGIQQFLTMRAGTKEEKIFPFY
WGEEVEHQLVVRVEGGKVKLSLNAADVIEQLTKSSQKDNVWHQEYGSFMVESVPGVPTYLEVDSLCSVE
ENIRRRCELLDSVAGENTFSLTLVTFPLMGVGFVTSKVEVPYRSRSLFVPDVCINQSHPRFNLTRNIR
LRRGHKVCIQVPIYIDTYTMEKTVDPRLNIDRTPYNMIDCSSTEVTEAKGEKFTINDSVISKEENNNS
SNNNNNKESNINSKYP SAEEMTHFYTPATHY YAYQYFKKSQMELVKQRYDACPCPVPVSVSHPCIYMDCM
AFGMGCNCLQVTMQLENETQARHVYDQLGVLCPFLFAMSSSTPFQKILCDSDVRWLTIAASVDDRKRE
EVPHIKSRYSFSVVFVSLTLPNLEEFNDEEFVINNNYLEVLKDGVDTRLAKHVAHLFIRDPLVVYDQ
MIDIDDTHTTEHFENIQSTNWQSVRLKPPSLDGNTGWRVEFRIMDVMP TPFENAAF SVFVPLLARAIK
YNPLFYTKMSIVDENMGYAHNRSPCRQKYVMRRDIFAKNISTDPSENSEFTVNEVFNGKDGEYYGLIPL
VRRYMEENMLSSSTLDGYLCFLSMRAAGEIPTAAEYLRNFVMRHPDYRHDSRLTERIAYDLVLHVRKLA
SGEVKDDLFLPMNKFMPKRSRE

```



GC% in 18 bp blocks

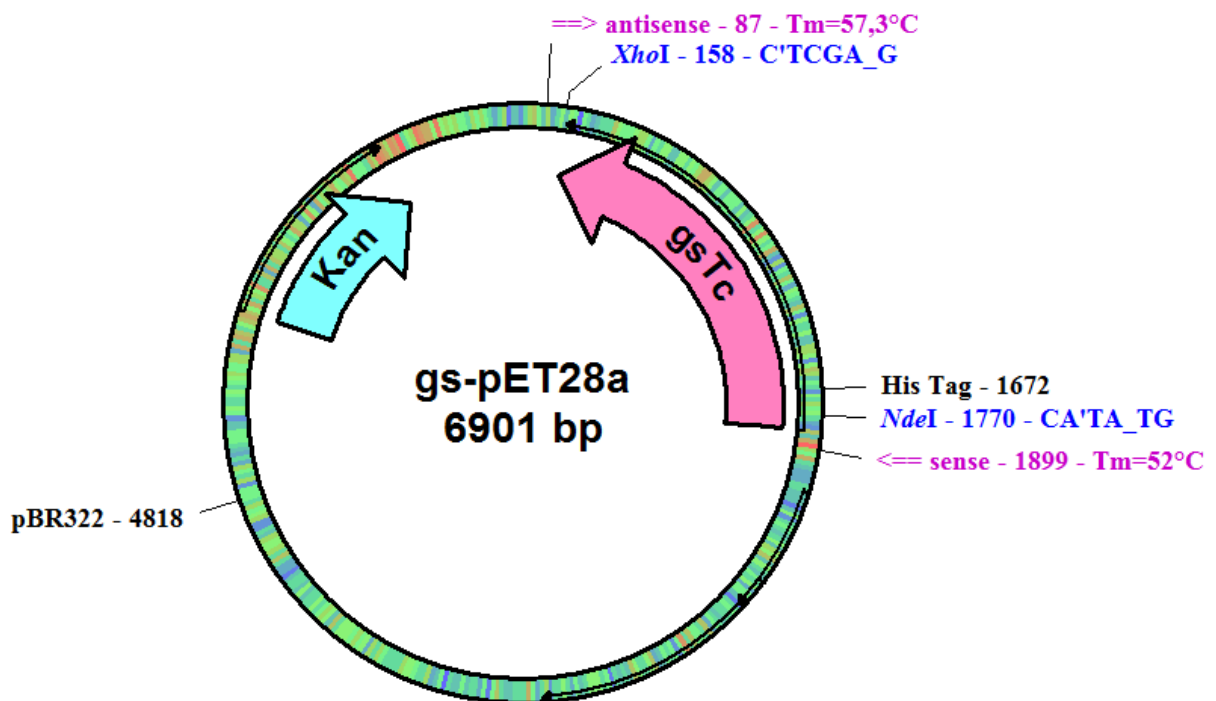


A

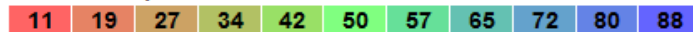
```

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMELLGDAEQLVAKCMMGLGTIQMAGHEDATTHLAVTLQPTTMRGEFDVL
CRRQLLWNEAVNNTARNFQFLLDALRETAASDTEFTGKLVNLRDVYLGTSFYQPLMLGIFRTDYMHDGA
AAAAASTVAETMEEDAAAWKNVEINTISSFAGLSPLVSDFHRQIAMYQRALGGGSAKNTADDHQNNEAM
PNLDNAGVLERSTAGKIVPEALAAVAWSSQQNFEAFRDAYGKEQQHCRLLDPIVLFIIQENERNTADQ
FALIFELLESHGIPSLRRTLRELQVSMKLHPVNPNGPPLAIVDGRYPVAVAYFRSTYVPADFPTKASWDTR
LAVEQSSAIKCP SIPYHLLTFKKLQQLFCDVGNLTP IAFCGDAVRALQLQTHFVPQYSLNPAEVLGDAV
QRVIDDALQHPARYVLKPQLEGGGNLIAGQAMQEVLRKKELTDPLLYNKVRREYIILMSRIEFPVRSGAFL
VNGKVVQLEKNICSELGIYGVILSDAGGCLLQACAGYVVRSKPADVDDGGVMAGVAALDSLALV

```



GC% in 17 bp blocks



B

Figura 7. Representação da ligação do resultado do sequenciamento no vetor *gcsTc*-pET28a (A) e *gsTc*-pET28a (B). As traduções esperadas para as fases abertas de leitura obtidas da ligação dos fragmentos respectivos nos sítios de clonagem do vetor pET28a encontram-se na caixa tracejada. Indicações em magenta apontam para sítios de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e suas respectivas temperaturas de fusão; em azul e vermelho os sítios de restrição utilizados para clonagem. Análises realizadas com o programa pDRAW32 (versão 1.1.107).

Quando comparadas às sequências dos fragmentos sequenciados referente à rGCSTc e rGSTc com as depositadas no banco de dados BLAST, verificou-se que muitos organismos possuem sequências homólogas à γ -glutamilcisteína sintetase e glutathione sintetase. Através de uma análise peptídica *in silico* foi possível calcular o grau de idêntidades entre essas sequências. rGCSTc e rGSTc compartilham muitos resíduos conservados com seus ortólogos em alguns organismos eucariotos e patogênicos, e uma identidade não significativa com seu ortólogo humano.

A GCS é bastante conservada nos cinetoplastídeos *T. brucei* e *L. major*. Entretanto a sequência de aminoácidos da rGCSTc possui de 36 a 45% de identidade com a provável subunidade catalítica da GCS de *T. brucei*, *S. pombe* e *H. sapiens*. Alguns resíduos invariantes entre essas sequências, inclusive nas já estudadas, indicam resíduos conservados provavelmente participantes do sítio ativo destas enzimas (Fig. 8). Comparando a sequência completa de aminoácidos da rGCSTc com a sequência peptídica da GCS desses eucariotos, obtêm-se valores de identidade de 67% com a sequência de *T. brucei* a 17% com aquela de *H. sapiens* (Tabela 1).

	10	20	30	40	50
T. cruzi	MGLLTTGG	PMRWGTDENNRAIPYVSSHGIQQFL	TMRAGTKEEKIFPFYW		
T. brucei	MGLLTTGG	QPLQWGTENNRAKEYVSAHGIQQFLWVYNKQKELP	DFPFLW		
L. major	MGLLTTGG	APIQWGTANSKAIPHVREHGIQQFLNVFKSKKDLHGMPFFW			
S. pombe	MGLLVLG	-TPLDW--PESKKYCDYVRENGIKQFLHMYDTYISKQDVL	LW		
H. sapiens	MGLLSQG	-SPLSW--EETKRHADHVRRHGILQFLHIYHAVKDRHKDVL	KW		
Clustal Consensus	**** *	*: *	..: *	:** *** :	. : *
	60	70	80	90	100
T. cruzi	GEEVEHQ	LVRVE--GGKVKLSLNAADVIEQLTK	-----SSQK		
T. brucei	GDEIEHQ	LVRLE--SRKVKLSLNAADVIKRLSQ	-----SSGE		
L. major	GEELEHQ	LIQLH--DDTVTLSTEGAEVMNKLR	-----ARPD		
S. pombe	GDEIECI	VVSMDDKSKKARVSLRQEDILNALIGGNSNKDTIEITSSTKPH			
H. sapiens	GDEVEY	MLVSFDHENKKVRLVLSGEKVLET	LQ-----EKGERTNPN		
Clustal Consensus	*:*:*	:: :	..:: *		: .
	110	120	130	140	150
T. cruzi	DN---	AVWHQ	EYGSFMVESVPGVPYTL	EVDSLCSVEENIRRC	CELLDSVA
T. brucei	ST---	AERWPEYGSFMVESLPGKPYSSNVDSLCSVEVMRRRYHMLDAAA			
L. major	NC---	AVWNPEYGSFMVESTPDHPYTL	SVESLDSVQDNIA	RRYHMLNEEA	
S. pombe	AQNAVPT	FHP	EYGRYMLESTPGAPYGSTL	KDFTFVEYNMRLRRKII	ENHL
H. sapiens	HP---	TLWRPEYGSYMI	EGT	PGQPYGGTMSEFNTVEANMRKRRKEATSIL	
Clustal Consensus	. . .	*** :*:* . * . **	...: *	*: *:	* .

```

          160          170          180          190          200
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      GENTFSLTLVTFPLMGVGGDFVTSDSKEVP----YRSLSLFPDVCINQSHP
T. brucei     GDNTFAVTLVTFPLMGVGGFTTSTETESP----CSQSLFVPDACINDSHP
L. major      PPGVVGTTFTVTFPLMGQGNFVHCSDKSSP----YSQSLFVPDACINQTHP
S. pombe      LPNELPLTITNFFRLGTPGFTDPEVEAN---GAISRSFFLPDDVIN-THV
H. sapiens    EENQALCTITSFPRLLGCPGFTLPEVKPNPVEGGASKSLFFPDEAIN-KHP
Clustal Consensus . *:.* :* .* . *:*.** ** .*
```

```

          210          220          230          240          250
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      RFTNLTRNIRLRRGHKVCIQVPIYIDTYTMEKTVDPRLNIDRTPYNMDDID
T. brucei     RFKALTNNIRLRRGRKVCIQVPMFIDRYTMERTVDPRVNIDLHPRNVEIV
L. major      RFANLTANIRLRRGQKVCILVPLYVDSRTMQDTPDPRLNIDLTPHNKIDIF
S. pombe      RFPTLTANIRQRRGRKVAMNVPVIFFDKNTIKPFHDPVTPWDRN-----
H. sapiens    RFSTLTRNIRHRRGEKVVINVPVIFKDKNTPSPFIET-----
Clustal Consensus ** ** *** **.* : **.: * * . :.
```

```

          260          270          280          290          300
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      CS-STEVTEAKGEKFTINDSVISKEENNNSSNNNNNKESNINSKYPSAEE
T. brucei     CTFSGEKTSSKGGKFSCTITPKRVPLENEAITN-----
L. major      HSRRENGRSMTEDELYAHTDASAALLVPSSSLDPRED-----YPVTET
S. pombe      -----LFPEDANARDGAALDN-----
H. sapiens    -----FTEDEASRASKPD-----
Clustal Consensus :. .
```

```

          310          320          330          340          350
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      MTHFYTPATHYHYAQQYFKKSQMELVKQRYDACPCVPVSVSHPCYIMDCMA
T. brucei     MTHLYTPVTHYHYAQQYFQNLQAERVKQRYQACPCVPVSVNHPCYIMDCMA
L. major      LKQLFTPAALYHYAQQYFTGQHREHMQERYNACNYPVTLVSHPCYIMDCMA
S. pombe      -----HIYDMSG
H. sapiens    -----HIYDAMG
Clustal Consensus *****.
```

```

          360          370          380          390          400
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      FGMGCNCLQVIMQLENETOARHVVDQLGVLCPFLFLAMSSSTPFQKGILCD
T. brucei     FGMGCNCLQVIMQLPNEAQRHVIYDQLGILCPFLFLALSSATPFQKGILCE
S. pombe      FGMGCCCLQVITFOAKSCDEARLLYDQLTPIPTLMLALSAGTPAFRGYLAD
H. sapiens    FGMGNCCLVITFOACSISEARYLYDQLATICPIVMALSAASPFYRGYVSD
Clustal Consensus ****.*:.* . :** :**** : * .:*.:.* :* :.:
```

```

          410          420          430          440          450
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      SDVRWLTIAASVDDRKREE---VP-----HIKSRYSDFSVFVSLTLPN
T. brucei     SDVRWLTITASVDDRKYEE---VP-----HIKSRYSISVSVSSTLPN
L. major      TDVRWLTIAGAVDDRRVEE---VP-----HILKSRYSISVVISDRTEN
S. pombe      QDCRWNVIAGAVDDRTEEMKTVP-----KSRYDSVDLYISNDKRN
H. sapiens    IDCRWGVISASVDDRTREERGLEPLKNNNYRISKSRYSIDSYLSKCG--
Clustal Consensus * ** .*:.:**** ** * *****. :.*
```

```

          460          470          480          490          500
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      LEEFNDEEFVINNNYLEVLKDGVDTRLAKHVAHLFIRDPLVVDQIMIDI
T. brucei     LEEFNDEVLRLNDSYNNLLTREGVDSRLATHIAHLFIRDPLVIYDQIMIDI
L. major      LEEFNDSQIAINRSYYELLKDSGVVRLANHIAHLFIRDPLVMYDKMIDI
S. pombe      LPEYNDVPVINOQCYDKLIKDCIDERLAKHMAHIFSRDPLVIFSDSILQ
H. sapiens    -EKYNDIDLTLIDKEIYEQLLOEGIDHLLAQHVAHLFIRDPLTLFEEKIHL
Clustal Consensus :.** .*: . : * :* ** *:.**.* *****:..*
```

```

          510      520      530      540      550
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      DDTHTEHFENIQSTNWQSVRLKPPSLDGNTGWRVEFRIMDVMPFPFENA
T. brucei     DDHTHVDHFENIQSTNWQTVRLKLPVLDSTLGWRVEFRVMDVMPFPFENA
L. major      DDTHTEHFDNIQSTNWQTVRFKPPPLGNDIGWRVEFRVMDIQPTPFENA
S. pombe      DNSVSNAHFENLNSTNWQSMRFKPPPPGSDIGWRVEFRSMEIQITDFENA
H. sapiens    DDANESDHFENIQSTNWQTMRFKPPPPNSDIGWRVEFRPMEVQLTDFENS
Clustal Consensus *: **:*::*****:;* * .. ***** *: * ***:

          560      570      580      590      600
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      AFSVFVPLLARAIKYNPLFYTKMSIVDENMGYAHNRSPCRQKYVMRR--
T. brucei     AYSVFVLLTRAIMRFGAVFYTKLSIVDENMGRAHNINPCQQHYIMRR--
L. major      AFAVFIPLLTKAIVNYKPCFYTKISIVDENMGRAHRINPCGEQYIMRK--
S. pombe      AYSIFVVMLSRAILSFNLNLYMPISLVDENMKAAHARDAIHRKKFWFR--
H. sapiens    AYVVFVLLTRVILSYKLDFLIPLSKVDENMKVAQKRDAVLQGMFYFRKD
Clustal Consensus *: :* :*:.*: : : : * ***** *: .. . . :

          610      620      630      640      650
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      ----DIFAK-----NISTDPSENSEFTVNEVFNGK--DGEYYGLIPL
T. brucei     ----DIFAS-----KVTTDPSENCELTVGEVINGK--PGEYYGLIPL
L. major      ----DIFAH-----KCTASDEETARMSIDEIFNGK--EGGFYGLIPL
S. pombe      ----CNPFPD-----ASTDDESGQFRQLTIDELFNGEHRENGFPGLITI
H. sapiens    ICKGGNAVVDGCGKAQNSTELAAEYTLMSIDTIINGK--EGVFPGLIPI
Clustal Consensus : . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

          660      670      680      690      700
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      VRRYME---EENMLSSTLDGYLCLFSLMRAAGEIPTAAEYLRNFVMRHPDY
T. brucei     VRRYLE---EENIQSDVVEGYLNFISKRCGEIPTAAQYLRNFVKKHPDY
L. major      VCRYLD---DEGKRSPLVNSYLKFLSMRASGRIPTPAQYMRKFVTTHPDY
S. pombe      VRSYLYSCNPDAKTICLIERIYIRLISQRANGQCLTAASWIRNFITTHPSY
H. sapiens    LNSYLENMEVDVDRCSILNYLKLKRRASGELMTVARWMREFIANHPDY
Clustal Consensus : * : : : * : : : * * * * * * * : : * : * : * : *

          710      720      730      740      750
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      RHD SRLTERIAYDLVLHVRKLGASGEVKDDLFLPMNKFMPKRSRE-----
T. brucei     RED SRLTEQIAHDVVNHVHQLACGGNASESMIGAYTLGSKRQREG-----
L. major      KHD SRLTDSIARDLVQRMHGLASNQIHDDDYLPISVFKATTRESVK-----
S. pombe      KQDSVVNDEINYDLIRRIAKIVDGDYDD-TLLG-----KCS-----
H. sapiens    KQDSVITDEMNYSLILKCNQIANELCEPELLGSAFRKVKYSGSKTDSSN
Clustal Consensus : . * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

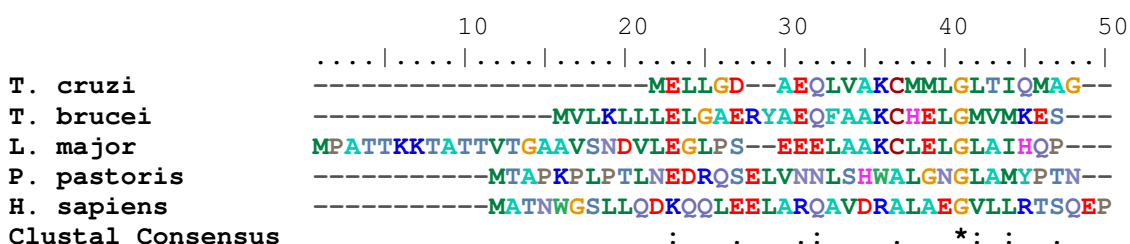
```

Figura 8. Alinhamento das sequências peptídicas previstas da tradução do gene *gcs* das espécies *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Homo sapiens*. O resíduo de cisteína conservado (indicado no retângulo) participa do provável sítio ativo da enzima. A sequência consenso é gerada automaticamente pelo programa ClustalW: (*) os resíduos na coluna são idênticos em todas as sequências; (:) substituição conservativa; (.) substituições semiconservativas.

Tabela 1. rGSTc compartilha identidades variadas com ortólogos presentes em eucariotos. O grau de identidade entre as sequências foi calculada pelo programa BLAST, e os valores expressos em porcentagens (%).

Número de acesso	Organismo	Identidade (%)
XP_816252	<i>Trypanosoma cruzi</i>	100
AAC47195	<i>Trypanosoma brucei</i>	67
XP_001682576	<i>Leishmania major</i>	58
CAA59379	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	45
NP001489	<i>Homo sapiens</i>	17

A sequência de aminoácidos que codifica a proteína rGSTc possui um grau moderado de identidade com as sequências de aminoácidos da GS de humanos (14%) e 57% de identidade com a sequência de *T. brucei* (Tabela 2). Apesar do baixo grau de identidade entre a rGSTc e GSHs há várias regiões na parte C-terminal da proteína que parecem ser altamente conservadas e assim pode ter uma função essencial para catálise e estrutura da enzima. Além disso, há uma abundância de resíduos de cisteína (nove) presentes na rGSTc quando comparada com a proteína de mamíferos, que só possui três cisteínas. Um destes resíduos de cisteína parece estar envolvido na atividade catalítica da enzima humana (GALI & BOARD, 1997), embora a análise estrutural da GS de mamíferos revelaram que este resíduo em particular não está em contato com qualquer um dos substratos durante a reação enzimática (POLEKHINA *et alii*, 1999). A abundância de resíduos de cisteína na rGSTc pode ter uma implicação funcional para sua atividade catalítica (Fig. 9).



```

          60          70          80          90          100
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      -HEDATHHLAVTLQPTMRRGEFDVLCRRQLLWNEAVNNTARNFQFL LDA
T. brucei     -AGPGRVPVPVTLQPSMISRGEFGTLCCMQPLWNEAVDNTARNFTFLRDA
L. major      -DYEITHPALSLRPFPMKADVLRQLYDRQLLWNEA INRTRSRNFEFLRDS
P. pastoris   FELHNTGYAPVTLFPTFPFRGQFEKALAVQEDFNELYAQVVKNQEWL GSI
H. sapiens    TSSEVVSYPFTLFPSPSLVPSALLEQAYAVQMDFNLLVD AVSQNAAFLEQT
Clustal Consensus  ..:* * . : * :* . :* :* .

          110        120        130        140        150
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      LRETAASDTEFTGKLVNILRDVYLGTSP-----YQPLMLGIFRTDYM H-
T. brucei     LQETAASDVNFTGKLLNMLQEVYLSGGP-----FQQLMLGIFRTDYM R-
L. major      MKSTAESDRSFTGRLLAILEKVYMTTPVGAKAPVYQPFMLGILRTDYM SS
P. pastoris   LEDLSQFDRDFTGKLWEIYKEAKKIGIV-----QPVSLGLFRSDYM VD
H. sapiens    LSSTIKQD-DFTARLFDIHKQVLKEGIA-----QTVFLGLNRS DYM FQ
Clustal Consensus : . * .**:* : ... * . **:* :***

          160        170        180        190        200
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      ----DGA AAAAAS TVAE TMEEDAAAWKNVEINTISSSFAGLSPLVSD FHR
T. brucei     ----EGVYDKMLSTTAS-----RWKNVEINTISCSFAGLSPLITEFH Q
L. major      VDPEESGSHLSSTEVSAAAAAGTARQWKNI EINTISCSFAGISPLVHKFHA
P. pastoris   TL-----SAPSF DGINGKIKQIEFNTVSVSFGGLSPKVAQLHR
H. sapiens    R-----SADGSP-ALKQIEINTISASFGLASRTPAVHR
Clustal Consensus                *::*:**:* **.*:.. . *

          210        220        230        240        250
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      QIAMYQRALGGG-----SAKNTADDHQNN EAMPNLDNAGVLERST
T. brucei     HIAAYLQVLQKA-----RGKEDDDGVENMSWIWKGKNC-RLERSV
L. major      YLHKFREAFMNVGDAAVVESTKAASLATPSVVAASPRQRESAYVTDEKHN
P. pastoris   YLNENGNYHNEG-----KLHFEDDEL PNSE
H. sapiens    HVLSVLSKTK-----EAGKILSNN
Clustal Consensus :

          260        270        280        290        300
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      AGKIVPEALAAVAWSSQONFEAFRDAYGKEQQ-----HCRLLD-
T. brucei     SGDVVPKAIAADAVRAWVEQQKFASLRASWEQFQONEVGSGEIHQLGVLD T
L. major      STVQVSAALAEAVAVWRNAVPSYSSFLRQYHQR TG-----VLLK-
P. pastoris   STVSLADGLAKAAAYNTSE SVE-----
H. sapiens    PSKGLALGIAKAWELYGSPN-----
Clustal Consensus . :. .:* * :

          310        320        330        340        350
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      -PIVLFIIQENERNTADQFALIFELLESHGIPSLRRTLRELQVSMK LHPV
T. brucei     APVVLVVVQENERNTADQYALLMRVLEEHRIRFIFRTLQELHLSLKLHSI
L. major      -PIVLAVVQENELNTADQYRLLLELLETHGVLSLRRTLAQLHETMRLEHA
P. pastoris   SSVVLVVVQNNERNVFDQRALEFELLKRHKVRSIRLRMEDISASIDIDEQ
H. sapiens    -ALVLLIAQEKERNIFDQRAIENELLARN-IHVIRRTFEDISEKGS LDQD
Clustal Consensus .:** : *::* * ** : .:* : : : : : . :.

          360        370        380        390        400
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
T. cruzi      -PNG-----PPLAIVDGRYPVAVAYFRSTYVPADFPT
T. brucei     SEQ-----PPLAVVDGHYPIAVAYFRSTYVPEDFPT
L. major      TICGNERDRSTETEEVLSEQLLPPFAVVDEKYVVAVAYFRSTYVPKDLPT
P. pastoris   TRRI-----RLKTTGEEVSVIYYRSAYAPSDFSN
H. sapiens    RR-----LFVDGQEI AVVYFRDGYMPROY S-
Clustal Consensus : ::* **.* * * : .

```

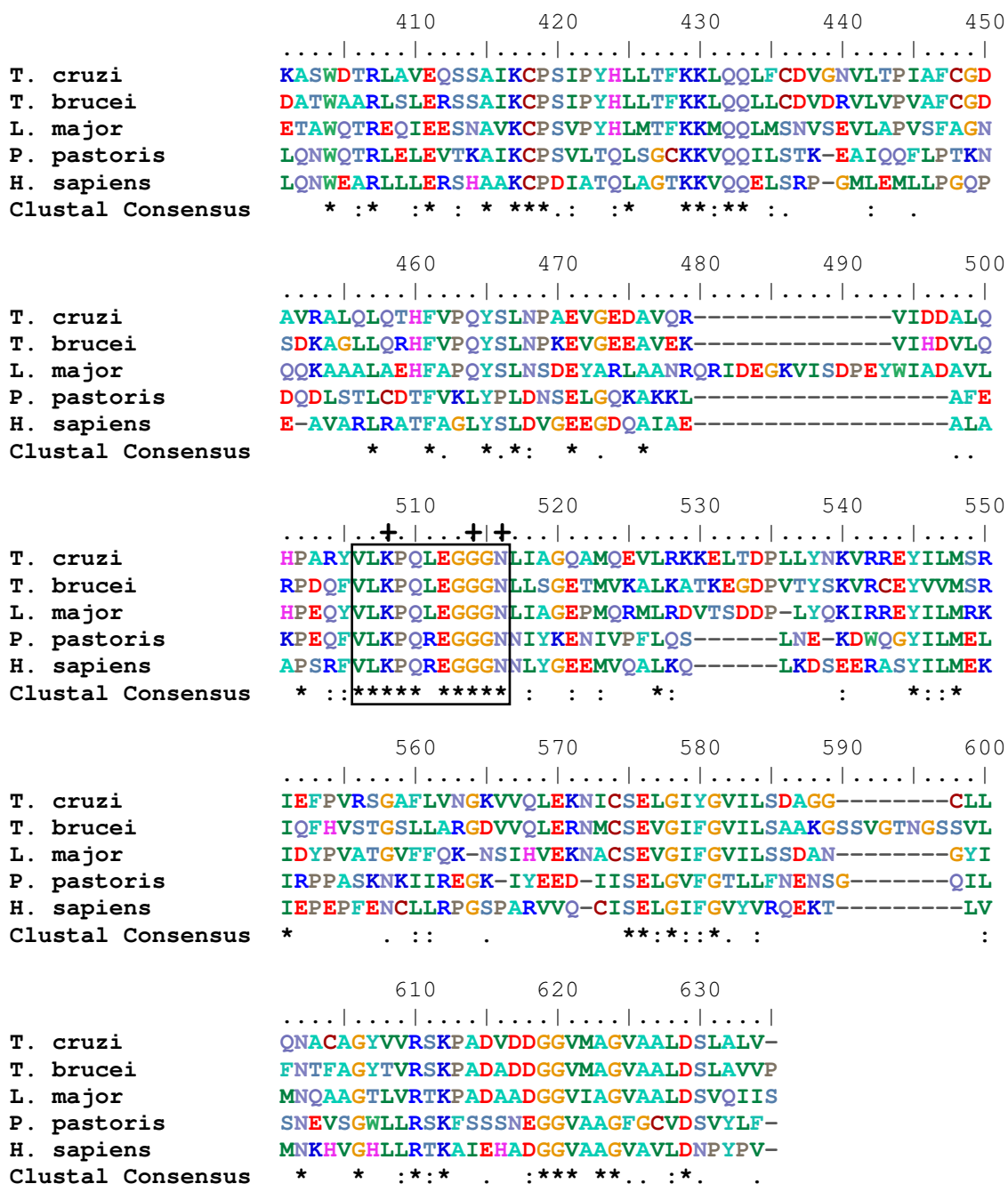


Figura 9. Alinhamento das sequências peptídicas preditas da tradução do gene *gs* das espécies *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Pichia pastoris* e *Homo sapiens*. A sequência consenso é gerada automaticamente pelo programa ClustalW: (*) resíduos na coluna são idênticos em todas as sequências; (:) substituição conservativa; (.) substituições semiconservativas. A caixa indica o *loop* conservado rico em glicina, as cruces e as setas indicam os resíduos responsáveis pela ligação do ATP e GSH, respectivamente, na GS de humanos que são conservados entre *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major* e *P. pastoris*.

Tabela 2. rGSTc compartilha identidades variadas com ortólogos eucariotos. O grau de identidade entre as sequências foi dada pelo programa BLAST, e os valores expressos em porcentagens (%).

Número de acesso	Organismo	Identidade (%)
XP_816252	<i>Trypanosoma cruzi</i>	100
AAC47195	<i>Trypanosoma brucei</i>	57
XP_001682576	<i>Leishmania major</i>	46
CAA59379	<i>Pichia pastoris</i>	31
NP001489	<i>Homo sapiens</i>	14

Após o sequenciamento e a confirmação de que os genes foram clonados perfeitamente no vetor de expressão pET28a , bactérias BL21DE3 foram transformadas com os plasmídeos *gcs*-pET28a e *gs*-pRT28a.

Foram selecionadas algumas colônias crescidas dessa transformação para teste de indução, a fim de otimizar a concentração de IPTG e determinar a temperatura ótima para que se obtivesse a proteína em boa quantidade na fração solúvel. Uma vez induzidas com 0,1 mM de IPTG, a 37 °C, culturas de bactérias BL21DE3 que carregavam o vetor *gcs*-pET28a produziram significativa quantidade da proteína de aproximadamente 80 kDa na fração insolúvel do extrato bacteriano, como constatado em SDS-PAGE (Fig. 10). A mesma proteína não foi detectada em culturas controle transformadas com o vetor de expressão vazio. Fazendo uma análise minuciosa da fração solúvel do extrato bacteriano induzido, observou-se uma banda no tamanho de aproximadamente 80 kDa presente no extrato induzido das três colônias, que não se faz presente no extrato induzido da colônia controle.

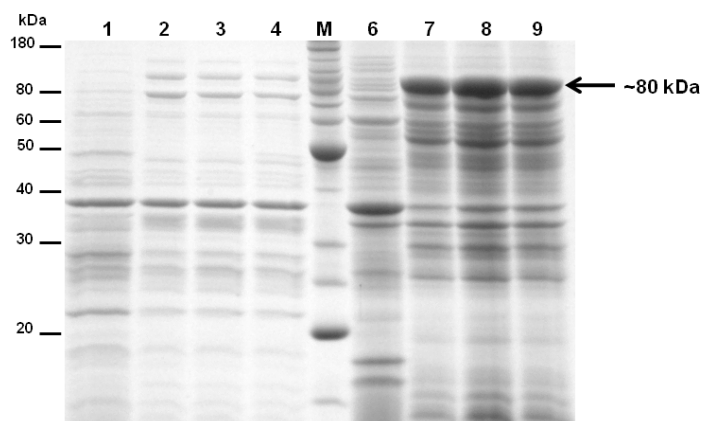


Figura 10. Análise em SDS-PAGE 10% da expressão heteróloga da rGCSTc a 37 °C. Três colônias transformadas em BL21(DE3) foram induzidas com 0,1mM de IPTG durante 3 h. **M** – Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen). Fração solúvel: pET28a vazio (1) , colônia 1 (2), colônia 2 (3), colônia 3 (4). Fração insolúvel: pET28a (6), colônia 1 (7), colônia 2 (8), colônia 3 (9).

A fim de verificar se essa banda representa a proteína esperada, realizou-se um *immunoblot* com soro anti-rGCSTc produzido em camundongo, no extrato solúvel e insolúvel. O anticorpo anti-rGCSTc reconheceu a proteína no extrato insolúvel e não reconheceu nenhuma proteína no extrato da colônia controle. Entretanto, o anticorpo reconheceu uma proteína não identificada nos extratos solúveis referente às colônias 1, 2 e 3 (Fig. 11). Essa proteína reconhecida pelo anticorpo pode ser a proteína esperada que foi degradada ainda na bactéria usada para a expressão. Para esse padrão de indução, a rGCSTc expressou-se exclusivamente como corpo de inclusão, no extrato insolúvel, e provavelmente não apresentando atividade. Para otimizar a expressão e tentar estabelecer o protocolo de indução para obtenção da proteína solúvel, outras condições de IPTG, temperatura e tempo de indução foram testadas.

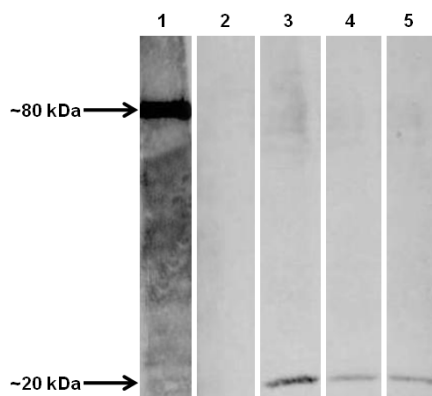


Figura 11. Immunoblot realizado com soro anti-rGCSTc produzido em camundongo. Fração solúvel das colônias 1, 2 e 3 da rGCSTc crescidas a 37 °C. Extrato insolúvel (1), Extrato total do pET28a vazio (2), Extrato solúvel da colônia 1 (3), Extrato solúvel da colônia 2 (4), Extrato solúvel da colônia 3 (5).

A expressão da proteína recombinante de aproximadamente 80 kDa, parece estar diretamente associada à temperatura de incubação das culturas, uma vez que não variando a concentração do agente indutor, e variando a temperatura e o tempo de indução, nota-se um acúmulo diferenciado no extrato solúvel de células mantidas a 30 °C, com 0,1 mM de IPTG, durante 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h e toda a noite de indução (Fig. 12).

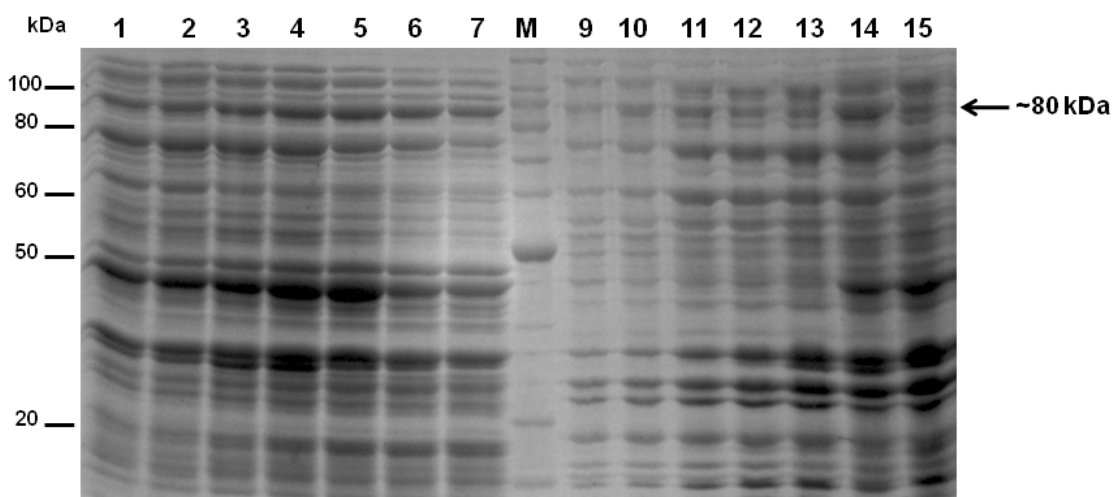


Figura 12. Análise em SDS-PAGE 10% da expressão heteróloga da rGCSTc induzida com 0,1 mM de IPTG a 30 °C. M – Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen). Fração solúvel: pET28a vazio (1), 30 min de indução (2), 1 h de indução (3), 2 h de indução (4), 3 h de indução (5), 5 h de indução (6), indução durante toda a noite (7). Fração insolúvel: pET28a vazio (9), 30 min de indução (10), 1 h de indução (11), 2 h de indução (12), 3 h de indução (13), 5 h de indução (14), indução durante toda a noite (15).

Para certificar que essas bandas visualizadas em SDS-PAGE, eram realmente a proteína esperada, realizou-se outro *immunoblot* com soro anti-rGCSTc produzido em camundongo, no extrato solúvel e insolúvel. O anticorpo anti-rGCSTc reconheceu a proteína no extrato insolúvel, não reconheceu nenhuma proteína no extrato da colônia controle, nem no extrato solúvel das várias induções (Fig. 13).

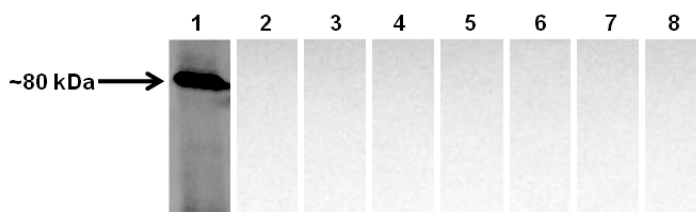


Figura 13. *Immunoblot* realizado com soro anti-rGCSTc produzido em camundongo na expressão heteróloga da rGCSTc induzida com 0,1 mM de IPTG a 30 °C. Extrato insolúvel da indução durante 5 h (1). Fração solúvel: pET28a vazio (2), 30 min de indução (3), 1 h de indução (4), 2 h de indução (5), 3 h de indução (6), 5 h de indução (7), indução durante toda a noite (8).

Novos experimentos foram realizados na tentativa de se obter a proteína rGCSTc solúvel. As colônias contendo o plasmídeo foram agora induzidas a 25 e 22 °C, cada uma com duas concentrações do agente indutor, a mesma concentração usada no experimento anterior (0,1 mM) e outra com a concentração reduzida à metade (0,05 mM), durante toda a noite (Fig. 14). Analisando a fração insolúvel observou-se perfeitamente a presença de uma banda de aproximadamente 80 kDa visivelmente expressa, no entanto essa banda parece não estar na fração solúvel.

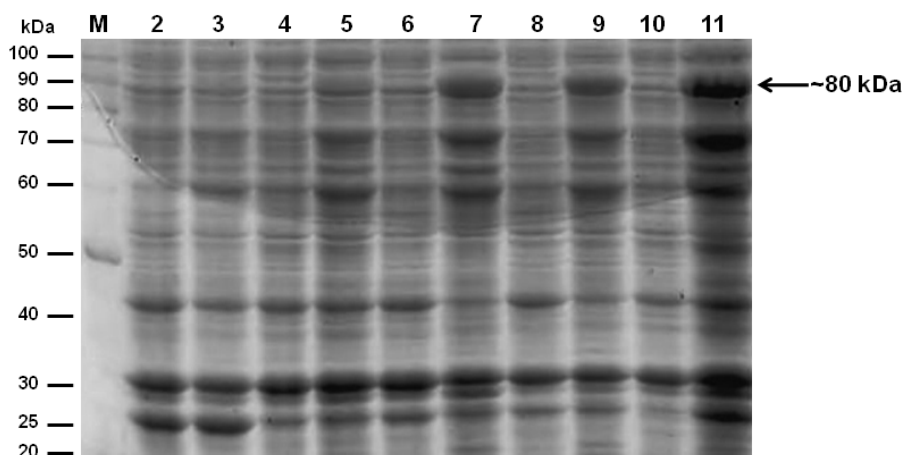


Figura 14. Análise em SDS-PAGE 10% da expressão heteróloga da rGCSTc. M – Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen). Fração solúvel pET28a vazia (2) e insolúvel (3), Indução a 22 °C: Fração solúvel induzido com 0,05 mM de IPTG (4) e insolúvel (5), Fração solúvel induzido com 0,1 mM de IPTG (6) e insolúvel (7). Indução a 25 °C: Fração solúvel induzido com 0,05 mM de IPTG (8) e insolúvel (9), Fração solúvel induzido com 0,1 mM de IPTG (10) e insolúvel (11).

Uma nova tentativa para a obtenção da proteína solúvel foi a expressão da proteína rGCSTc a 20 °C, uma vez que nessa temperatura as bactérias cresceriam lentamente e as proteínas expressas teriam um tempo maior para um dobramento completo e provavelmente apareceriam na fração solúvel. Usando 0,05 mM, 0,1 mM e 0,25 mM de IPTG as colônias foram induzidas durante 3 e 5 h (Fig. 15). A indução durante 5 h parece ter sido satisfatória para expressão das proteínas nas duas concentrações de indutor usadas. A banda de aproximadamente 80 kDa esperada está presente tanto nas frações solúveis quanto nas insolúveis, mas nota-se que a indução com 0,05 mM impediu a super-expressão da proteína na fração insolúvel e aumentou o nível da expressão na fração solúvel.

Novamente um *immunoblot* foi realizado no intuito de verificar a expressão destas proteínas. Surpresamente, em nenhum dos extratos a proteína esperada foi reconhecida com o anticorpo anti-rGCSTc, entretanto reconheceu outra proteína de aproximadamente 20 kDa

(Fig. 16). Essa banda reconhecida de tamanho não esperado pode ser possível degradação da proteína de aproximadamente 80 kDa. Um *immunoblot* novamente foi realizado com o mesmo extrato, agora sem condições redutoras e desnaturantes, observou-se, entretanto, o mesmo padrão de identificação (dados não mostrados).

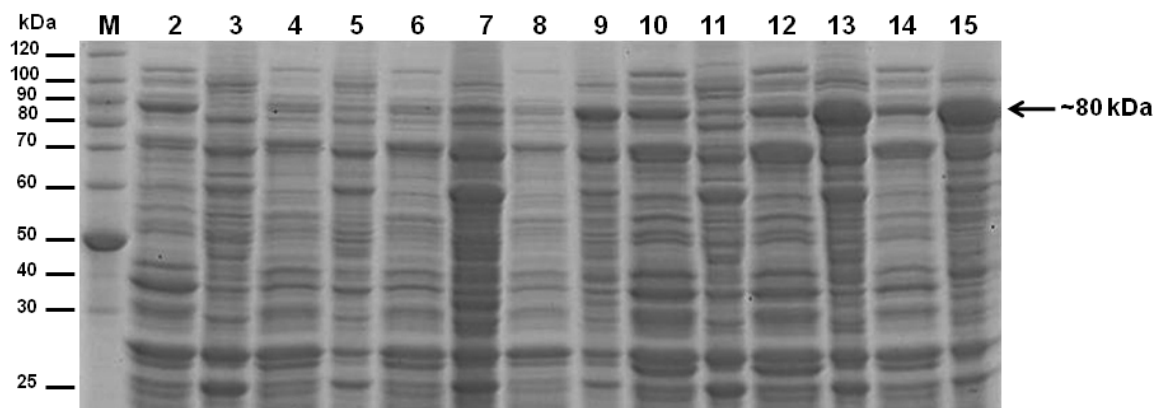


Figura 15. Análise em SDS-PAGE 10% da expressão heteróloga da rGCSTc a 20 °C. M – Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen). Indução do pET28a vazio fração solúvel (2) e insolúvel (3), 3 h de indução: Indução com 0,05 mM de IPTG, fração solúvel (4) e insolúvel (5), Indução com 0,1 mM de IPTG, fração solúvel (6) e insolúvel (7), Indução com 0,25 mM de IPTG durante, fração solúvel (8) e insolúvel (9); 5 h de indução: Indução com 0,05 mM de IPTG, fração solúvel (10) e insolúvel (11), Indução com 0,1 mM de IPTG, fração solúvel (12) e insolúvel (13), Indução com 0,25 mM de IPTG, fração solúvel (14) e insolúvel (15).

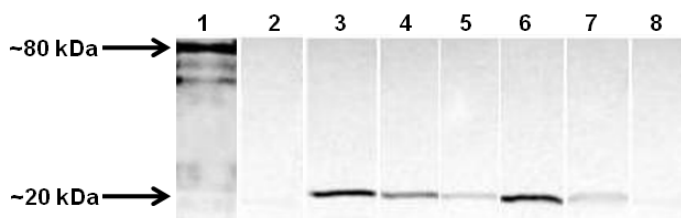


Figura 16. Immunoblot realizado com soro anti-rGCSTc produzido em camundongo nas frações solúveis das induções a 20 °C, 22 °C e 25 °C. Proteína purificada de corpo de inclusão (1); pET28a vazio (2); Indução a 20 °C: 0,1 mM de IPTG (3); 0,05 mM de IPTG (4); Indução a 22 °C: 0,1 mM de IPTG (5); 0,05 mM de IPTG (6); Indução a 25 °C: 0,1 mM de IPTG (7); 0,05 mM de IPTG (8).

Essas condições foram repetidas inúmeras vezes, e em todas novamente obtivemos o mesmo resultado. Outras tentativas, no entanto, foram realizadas, como o uso de reagente zwitteriônico durante a lise, mas o padrão de expressão continuou o mesmo. A outra tentativa foi usar sorbitol durante a indução no intuito de solubilizar as proteínas. Mesmo que no *immunoblot* não foi reconhecida nenhuma proteína no extrato solúvel, purificamos essas frações em cromatografia de afinidade ao níquel. Mais uma vez a banda correspondente à

proteína esperada não estava presente. Realizou-se também um *immunoblot* usando como anticorpo primário um soro *anti-His-tag* (Invitrogen), uma vez que a proteína recombinante é expressa com uma cauda de histidina, desta vez o anticorpo não reconheceu nenhuma banda na fração solúvel nem na fração insolúvel, nem mesmo a banda não identificada vista nos outros *immunoblots* (dados não mostrados).

A partir do momento em que não se obteve a proteína solúvel, realizou-se a purificação a partir dos corpos de inclusão da fração insolúvel, em condições desnaturantes, onde conseguimos a proteína pura e em grande quantidade (Fig. 17).

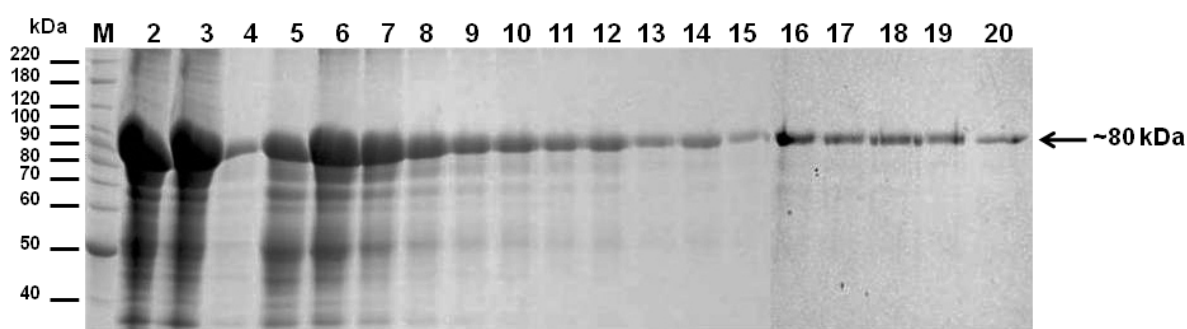


Figura 17. Purificação da proteína rGCSTc em cromatografia de afinidade em coluna de níquel. As colônias foram induzidas com 0,1 mM de imidazol a 37 °C durante a noite. A amostra foi sonicada em tampão de lise. **M** – Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen). Extrato total (**2**), Fração não ligada (**3**), Tampão de lavagem com 5 mM de imidazol (**4**), Eluição com 100 mM de imidazol (**5**) e (**6**), Eluição com 200 mM de imidazol (**7**) e (**8**), Eluição com 300 mM (**9**) e (**10**), Eluição com 400 mM (**11**) e (**12**), Eluição com 500 mM de imidazol (**13**) e (**14**), Eluição com 600 mM de imidazol (**15**) e (**16**), Eluição com 700 mM de imidazol (**17**) e (**18**), Eluição com 800 mM de imidazol (**19**) e (**20**).

A rGCSTc é imunogênica em camundongos, onde induziu a formação de anticorpos específicos, que reconheceram uma única banda de aproximadamente 80 kDa no extrato induzido de *E. coli* e uma banda de 79,67 kDa no extrato total de epimastigotas de *T. cruzi* (Fig. 18).

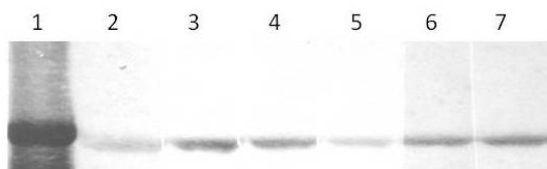


Figura 18. Immunoblot realizado com soro anti-rGCSTc produzido em camundongo. Extrato total de *E. coli* com o plasmídeo *gcs-pET28a* (**1**), Extrato total da forma epimastigota de *T. cruzi* (**2**) a (**7**). Soro imune dos camundongos 1 (**2**), 2 (**3**), 3 (**4**), 4 (**5**), 5 (**6**), 6 (**7**).

Para os primeiros ensaios de expressão da proteína rGSTc, culturas de bactérias BL21DE3 que carregavam o vetor *gs-pET28a* foram incubadas na presença de 0,1 mM de IPTG, a 37 °C durante 5 h. Neste ensaio, observou-se a super-expressão de uma proteína com um padrão de migração eletroforético compatível com aquele da proteína de interesse de aproximadamente 60 kDa, em conformidade com a massa teórica esperada de 58,6 kDa, na fração insolúvel do extrato. Todavia, não houve produção da proteína na fração solúvel do extrato. Culturas controle transformadas com o vetor de expressão vazio não apresentaram quantidades detectáveis dessa mesma proteína (Fig. 19).

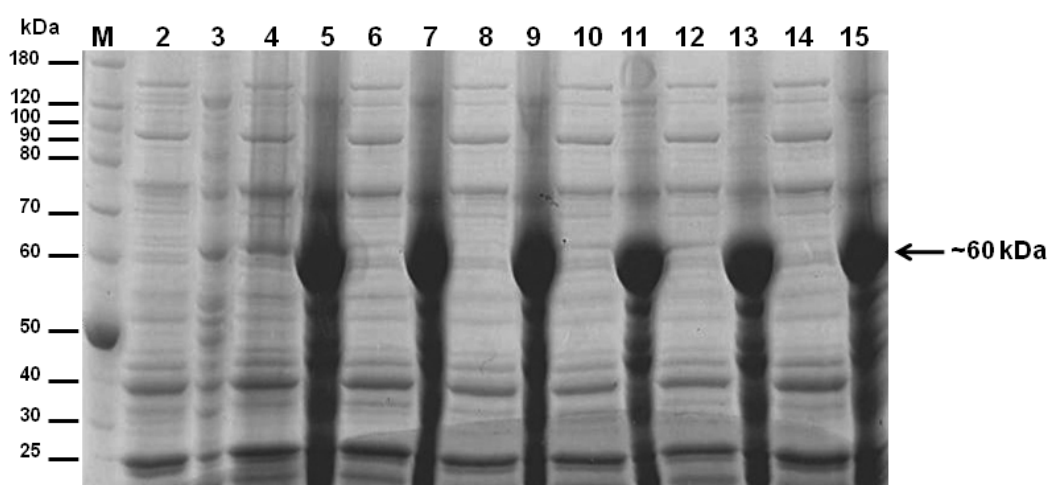


Figura 19. Análise em SDS-PAGE 10% da expressão heteróloga da rGSTc a 37 °C. Três colônias transformadas em BL21(DE3) dos clones 1 e 7 foram induzidas com 0,1mM de IPTG durante 5 h. M – Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen). Fração solúvel do pET28a vazio (2), insolúvel do pET28a vazio (3), Fração solúvel colônia da 1 do clone 1 (4) e insolúvel (5), Fração solúvel colônia da 2 do clone 1 (6) e insolúvel (7), Fração solúvel colônia da 3 do clone 1 (8) e insolúvel (9), Fração solúvel colônia da 1 do clone 7 (10) e insolúvel (11), Fração solúvel colônia da 2 do clone 7 (12) e insolúvel (13), Fração solúvel colônia da 3 do clone 7 (14) e insolúvel (15).

Para analisar a influência da temperatura e aperfeiçoar a expressão da proteína rGSTc, as colônias agora foram induzidas a 20 °C durante a noite com 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM e 0,5 mM de IPTG. A banda de aproximadamente 60 kDa aparece visivelmente no extrato insolúvel das induções dos clones positivos, e apesar de aparentemente não aparecer uma banda contundente no extrato solúvel (Fig. 20), o *immunoblot* confirmou a indução da proteína na fração solúvel dos extratos induzidos com 0,05 mM e 0,1 mM de IPTG (Fig. 21).

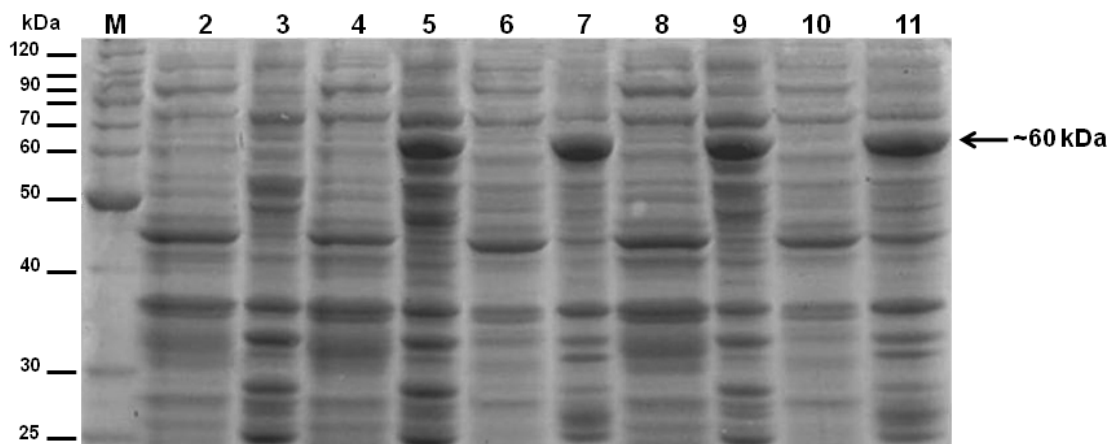


Figura 20. Análise em SDS-PAGE 10% da expressão heteróloga da rGSTc induzida com IPTG em diferentes concentrações a 20 °C durante toda a noite. M – Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen). Fração solúvel (2) e insolúvel (3) do controle (pET28a vazio), fração solúvel (4) e insolúvel (5) da indução com 0,05 mM de IPTG, fração solúvel (6) e insolúvel (7) da indução com 0,1 mM de IPTG, fração solúvel (8) e insolúvel (9) da indução com 0,25 mM de IPTG, fração solúvel (10) e insolúvel (11) da indução com 0,5 mM de IPTG.



Figura 21. Immunoblot realizado com soro anti-GSTc produzido em camundongo. Fração solúvel da colônia rGSTc crescidas a 20 °C. Extrato solúvel de *E. coli* após indução com 0,05 mM de IPTG (1), induzido com 0,1 mM (2), Extrato insolúvel (3).

Como a expressão da proteína solúvel ainda foi pouco detectada, e para melhor adaptarmos o protocolo de produção da proteína recombinante, foi necessário ajustar a temperatura e as concentrações de IPTG utilizadas para induzir as colônias transformadas com o vetor *gs-pET28a*. Utilizando-se 0,25, 0,1 e 0,05 mM de IPTG a 22 e 25 °C, notou-se que a rGSTc permanecia, em maior quantidade, insolúvel, mas ocorreu um pequeno aumento na sua expressão solúvel, o que viabilizaria a purificação da proteína nessas condições (Fig. 22).

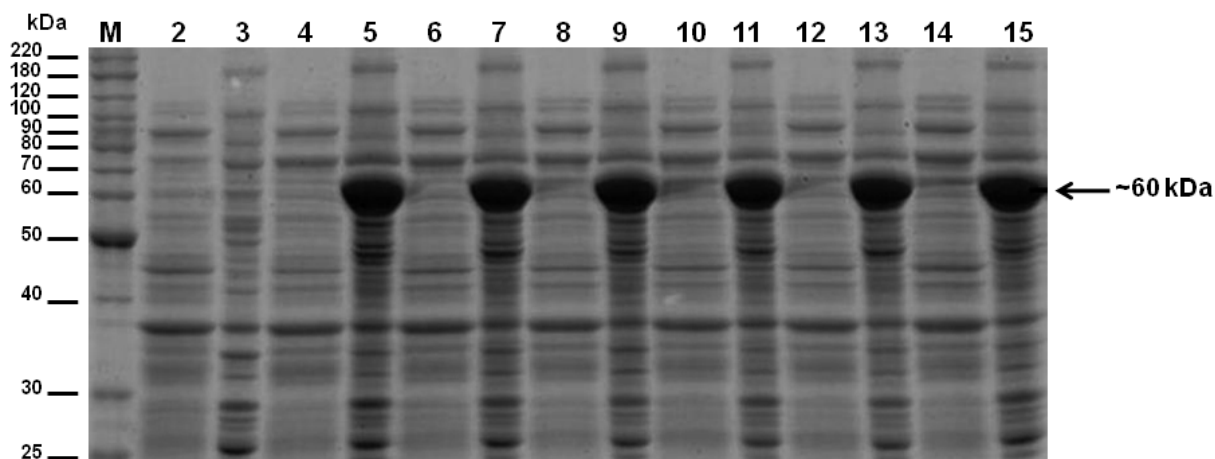


Figura 22. Análise em SDS-PAGE 10% da expressão heteróloga da rGSTc a 22 e 25 °C. M – Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen). Indução do pET28a vazio fração solúvel (2) e insolúvel (3), indução a 25 °C: fração solúvel (4) e insolúvel (5) da indução com 0,25 mM de IPTG, fração solúvel (6) e insolúvel (7) da indução com 0,1 mM de IPTG, fração solúvel (8) e insolúvel (9) da indução com 0,05 mM de IPTG, indução a 22 °C: fração solúvel (10) e insolúvel (11) da indução com 0,25 mM de IPTG, fração solúvel (12) e insolúvel (13) da indução com 0,1 mM de IPTG, fração solúvel (14) e insolúvel (15) da indução com 0,05 mM de IPTG.

A variação nas condições de indução da expressão nos possibilitou refinar o processo de obtenção da proteína recombinante, e, sendo assim, foram adotadas aquelas que resultaram em maior rendimento: temperatura de 22 °C, 0,05 mM de IPTG por 16 h. A confirmação deste resultado pode ser observado na Figura 23, pela realização de um *immunoblot* nas frações solúveis destas induções.

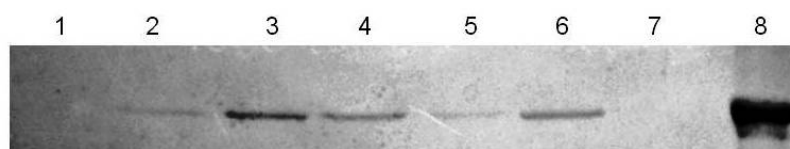


Figura 23. Immunoblot realizado com soro anti-rGSTc produzido em camundongo nas frações solúveis das induções a 22 °C e 25 °C. Indução a 22 °C: 0,25 mM de IPTG (1), 0,1 mM de IPTG (2), 0,05 mM de IPTG (3), Indução a 25 °C: 0,25 mM de IPTG (4), 0,1 mM de IPTG (5), 0,05 mM de IPTG (6), Extrato solúvel da indução do pET28a vazio (7), Extrato insolúvel da indução a 22 °C (8).

Uma vez descoberta a expressão da proteína na fração solúvel, prosseguimos com a purificação em larga escala, para realização dos próximos experimentos. A maioria do extrato da fração solúvel, obtida da lise celular das bactérias de culturas induzidas, não se ligou ao passar pela coluna de níquel. Ao ser visualizada em SDS-PAGE, a fração protéica não ligada à coluna de afinidade não apresentou uma diminuição expressiva de proteína com massa de 60 kDa, quando comparado com o extrato total. Contudo, o pouco de proteína que

havia se ligado na coluna desligou com apenas 5 mM de imidazol. Um *immunoblot* realizado nessas frações nos permitiu visualizar melhor a quantidade de proteína (Fig. 24).

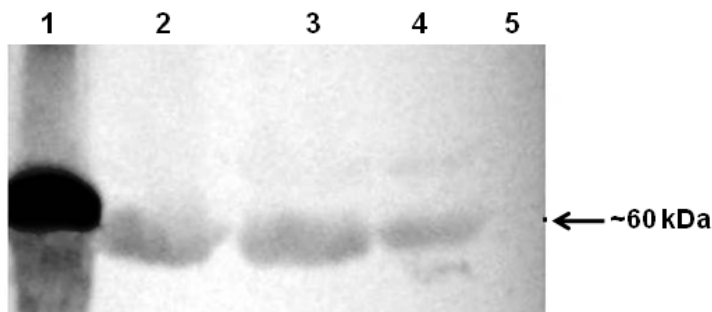


Figura 24. Immunoblot da purificação em cromatografia de afinidade em coluna de níquel, realizado com soro anti-rGSTc produzido em camundongo A cultura foi induzida com 0,05 mM de IPTG a 22 °C durante toda a noite. Proteína recombinante purificada do corpo de inclusão (1), Extrato total de bactérias (2), Fração não-ligada (3), Tampão de lavagem com 5 mM de imidazol (4), Tampão de eluição 1M de imidazol (5).

A tentativa de purificar a rGSTc foi repetida várias vezes, mudando o tampão de lise, a coluna de afinidade, pH e resina, no entanto não obtivemos sucesso. De posse destes resultados decidimos tentar a purificação a partir dos corpos de inclusão da fração insolúvel, em condições desnaturantes. A proteína em corpos de inclusão apresentou boa afinidade para a resina contendo níquel, o que possibilitou a obtenção da enzima com alto grau de pureza (Fig. 25).

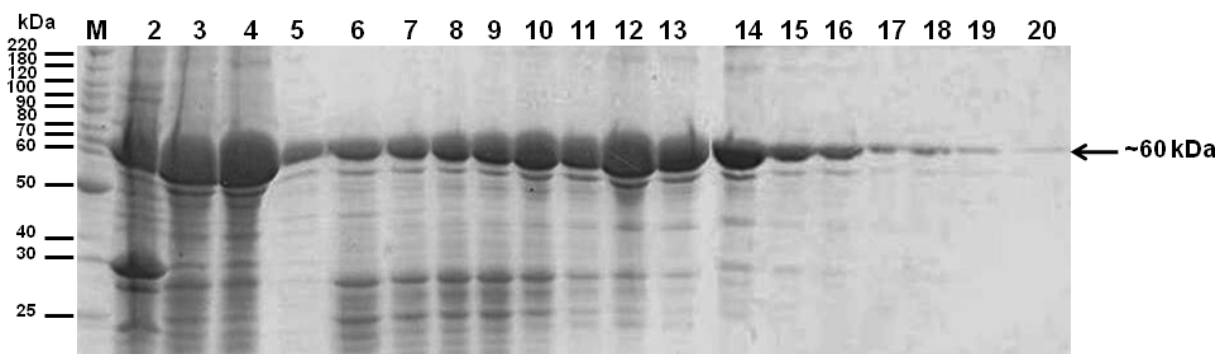


Figura 25. Purificação da proteína rGSTc em cromatografia de afinidade em coluna de níquel. As colônias foram induzidas com 0,1 mM de imidazol a 37 °C durante a noite. A amostra foi sonicada em tampão de lise. M – Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen). Precipitado da preparação dos corpos de inclusão (2), Extrato total (3), Fração não ligada (4), Tampão de lavagem com 5 mM de imidazol (5), Tampão de lavagem com 40 mM de imidazol (6), Eluição com 100 mM de imidazol (7) e (8), Eluição com 200 mM de imidazol (9) e (10), Eluição com 300 mM (11) e (12), Eluição com 400 mM (13) e (14), Eluição com 500 mM de imidazol (15) e (16), Eluição com 600 mM de imidazol (17) e (18), Eluição com 700 mM de imidazol (19) e (20).

Soros anti-rGSTc produzidos em camundongos Balb/C reconheceram uma única banda de aproximadamente 60 kDa no extrato total de *E. coli* e uma banda de 58,63 kDa no extrato total de epimastigotas de *T. cruzi* (Fig. 26).

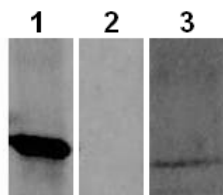


Figura 26. *Immunoblot* realizado com soro anti-rGSTc produzido em camundongo. Proteínas totais de *E. coli* (1) ou de *T. cruzi* (2 e 3) foram tratadas com soro pré imune (2) ou anti-rGSTc (3).

A localização da GSC e GS no *T. cruzi* foi avaliada por imunofluorescência para corroborar os resultados já obtidos da expressão das proteínas utilizando-se dos anticorpos testados por meio de *Immunoblot* (Figs. 18 e 26). As formas epimastigotas, tripomastigota e amastigotas foram permeabilizadas e incubadas com o anticorpo policlonal pré-imune ou anti-rGCSTc e anti-rGSTc seguido por um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 488. DAPI foi usado para marcar tanto o DNA nuclear como o cinetoplasto.

Nas formas epimastigota, amastigotas e tripomastigotas (dados não mostrados) as proteínas GCS (Figs. 27A e 28A - marcação em verde) e GS (Figs. 27B e 28B - marcação em verde) parecem estar concentrada em vesículas, apesar de observar a sua distribuição por todo o parasito. Não foram observadas marcações quando o soro pré-imune foi empregado nas mesmas condições experimentais (dados não mostrados).

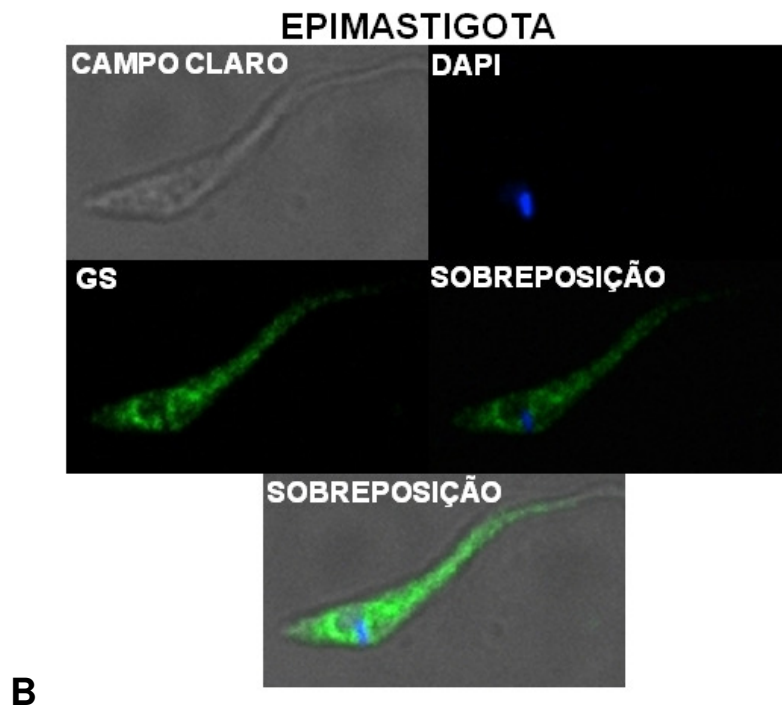
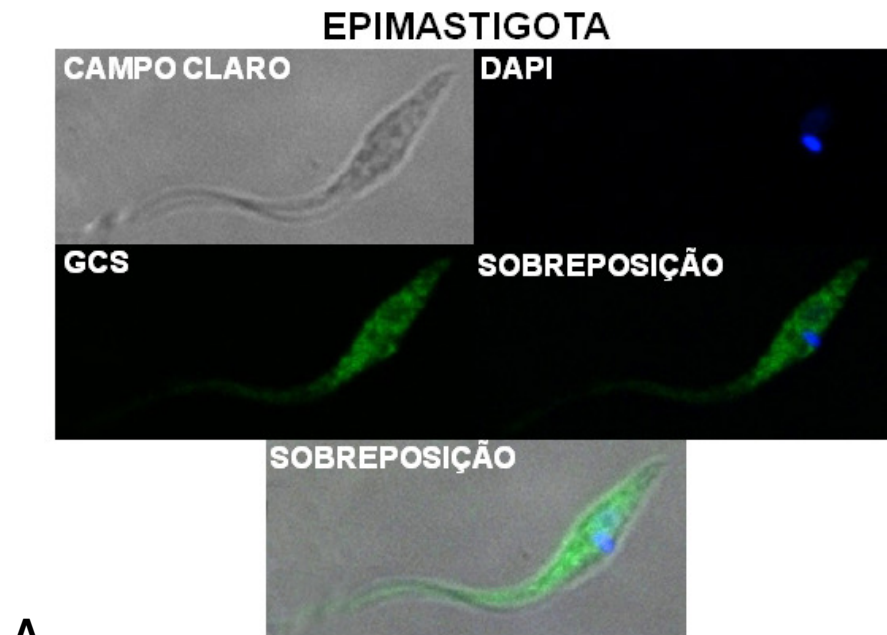


Figura 27. Imunofluorescência realizada em epimastigotas de *T. cruzi*. Anticorpo policlonal pré-imune ou anti-rGCSTc e anti-rGSTc seguido por um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 488 (verde), DAPI marca tanto o DNA nuclear como cinetoplasto. GCSTc (**A**), GSTc (**B**).

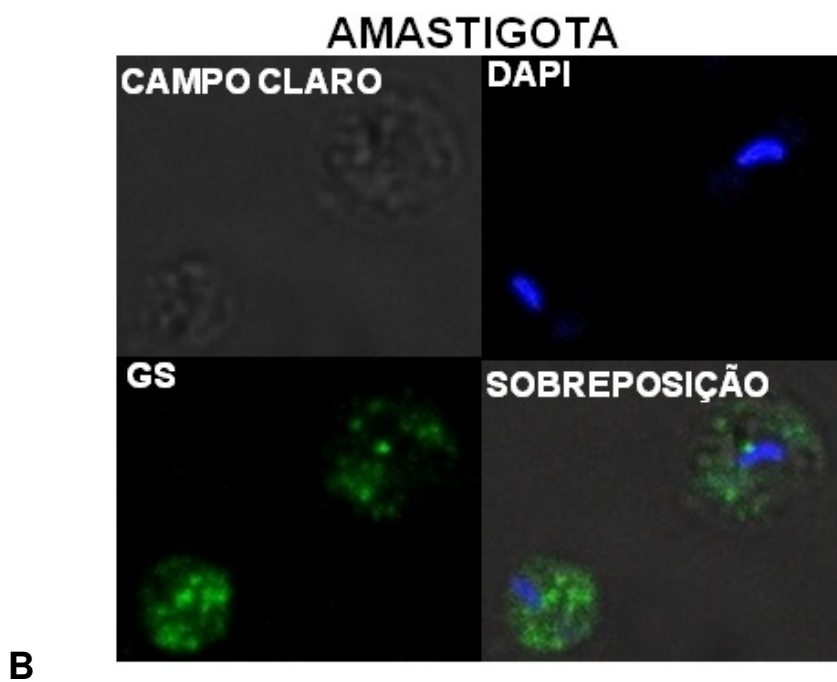
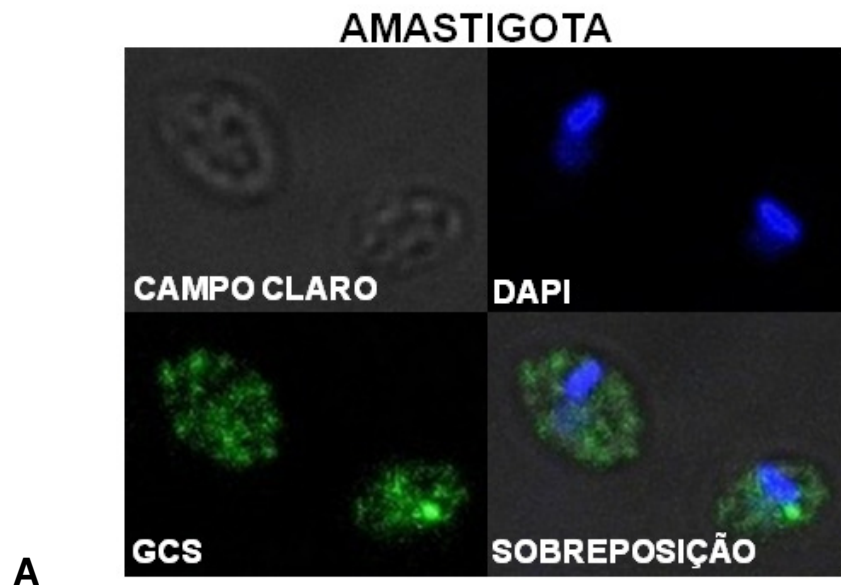


Figura 28. Imunofluorescência realizada em amastigotas de *T. cruzi*. Anticorpo policlonal pré-imune ou anti-rGCSTc e anti-rGSTc seguido por um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 488 (verde), DAPI marca tanto o DNA nuclear como cinetoplasto. GCSTc (A), GSTc (B).

Discussão

Todos os tripanosomatídeos possuem um ditiol único, a tripanotiona, uma espermidina conjugada à GSH, que juntamente com a sua flavoenzima, tripanotiona redutase, substituem o clássico glutathiona/glutathiona redutase dos sistemas de outras células. Como a tripanotiona redutase é essencial para a sobrevivência do parasito, as enzimas envolvidas na biossíntese da glutathiona e seu conjugado tripanotiona são também susceptíveis a representar importantes alvos para o desenvolvimento de novas drogas anti-parasitárias. Para manter os níveis de GSH adequadamente no organismo, ela é sintetizada por uma reação de duas etapas distintas, envolvendo duas sintetases ATP-dependentes: γ -Glutamilcisteína sintetase e Glutathiona sintetase. A fim de estudá-las o gene *gcs* e *gs* de *T. cruzi* foram clonados, os quais codificam um polipeptídeo de 693 e outro de 535 resíduos de aminoácidos, respectivamente.

A atividade da γ -glutamilcisteína sintetase já foi identificada em muitos organismos, incluindo bactérias, protozoários, fungos, plantas, insetos e mamíferos. Clonagem e estudos mostram um moderado a alto grau de identidade de sequência de aminoácidos da GCS entre os mamíferos, insetos, fungos e protozoários, mas não entre as enzimas de quaisquer plantas e bactérias. Apesar destas diferenças presume-se que GCS catalise uma reação de ligação em duas fases, mecanicamente similares, em todos eles.

A sequência de aminoácidos da rGSC de *T. cruzi* compartilha variados graus de identidade com homólogos de outros eucariotos: 67%, *Trypanosoma brucei*; 58%, *Leishmania major*, 45%, *Schizosaccharomyces pombe*; 17%, *Homo sapiens*. Como esperado, há maior grau de identidade entre os tripanosomatídeos patogênicos. O baixo grau de identidade com a enzima humana é bastante interessante, pois pode representar alvo específico para o desenvolvimento de quimioterápicos seletivos, o que resultaria em uma provável redução dos efeitos colaterais que são observados na terapia atualmente utilizada (KRAUTH-SIEGEL *et alii*, 1999).

A análise de sequência e de estrutura da enzima de *T. cruzi* com a de outros eucariotos já estudados é importante, pois nos permite fazer especulações de como a enzima poderia exercer sua atividade e/ou função. A cisteína conservada na sequência da proteína na maioria dos eucariotos parece estar dentro ou próximo ao sítio ativo, e as glicinas próximas também conservadas, parecem funcionar como sítio de ligação do ATP (LUEDER & PHILLIPS, 1996). Além dessa Cys e Gly, pode-se observar várias regiões bastante

conservadas entre essas enzimas. Uma mutação sítio dirigida realizada em três resíduos de glutamato que estão envolvidos na ligação de íons metálicos na enzima de *T. brucei*, que são conservados na rGSTc, implicou na ausência de atividade da enzima (ABBOTT *et alii*, 2001). Mutações no gene que codifica a γ -glutamilcisteína sintetase em *Leishmania* e *T. brucei* mostram que ele é realmente um gene essencial e um passo limitante na formação da GSH (HUYNH *et alii*, 2003; MUKHERJEE *et alii*, 2009).

A rGSTc também compartilha considerável identidade de sequência com seus ortólogos eucariotos, 57% com GSTb, 46% com GSLm, 31% com GSPp e 14% com GSHs. A análise estrutural comparativa *in silico* entre as GS destas espécies permitiu observar uma região altamente conservada nas proteínas eucarióticas, um loop rico em Gly sugerindo que contém uma sequência que é importante para a atividade enzimática (WANG & OLIVER, 1997). Esse *loop* fornece uma cobertura sobre a fissura do sítio ativo e, portanto, são candidatos para os movimentos durante a atividade catalítica (POLEKHINA *et alii*, 1999). Fyfe e colaboradores (2010) mostraram através de um alinhamento da sequência peptídica da GS que esse *loop* é 100% conservado entre outros 23 eucariotos.

Apesar da rGSTc compartilhar apenas 14% de identidade de sequência com a GSHs, existem alguns resíduos de aminoácidos importantes conservados entre elas. Mas um resultado interessante obtido é que uma mutação sítio dirigida nos únicos três resíduos de Cys existentes na GSHs que foram convertidos em alanina, (a mutação para alanina foi escolhida, pois esta é uma mudança mais conservadora em termos de tamanho e carga, e o resultado de qualquer alteração funcional, pode ser largamente atribuído à perda do grupo tiol), revelaram que, embora os mutantes de Cys294-Ala e Cys409-Ala não foram afetados ou retidos à atividade substancial, a mutação Cys422-Ala resultou em uma inativação quase completa da enzima, e esse resíduo não é conservado na rGSTc. Esse resultado sugere fortemente que a Cys-422 desempenha um papel importante na função da enzima, mas não dá qualquer indicação sobre se este efeito é resultado das alterações estruturais ou de um papel específico na área de catálise. Segundo Gali e Board (1997), um alinhamento das sequências de aminoácidos revelou conservação entre os resíduos Cys-294 de GSHs e GS de *Schizosaccharomyces pombe* e *Arabidopsis thaliana*. Essa conservação inicialmente sugeriu que este resíduo pode ser o mais significativo, entretanto, esta conclusão não é claramente apoiada pelos seus resultados experimentais. Esse resíduo de Cys também é conservado nas sequências de *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major* e *P. pastoris*.

A partir da inserção do fragmento de DNA que codifica a proteína no vetor de expressão pET28a, iniciou-se a expressão e purificação da proteína recombinante seguindo protocolos já estabelecidos para este tipo de vetor. O desenvolvimento de métodos de alto desempenho para a expressão e purificação de proteínas é complicado devido às diversas propriedades químicas das proteínas. A expressão heteróloga de proteínas fusionadas a uma cauda é uma estratégia bastante utilizada na produção de proteínas recombinantes (DREWES E BOUWMEESTER, 2003; TERPE, 2003). A purificação de proteínas por afinidade usando caudas fusionadas às suas sequências permite purificações por cromatografias simples. Apesar de apresentar muitas vantagens como facilitar a purificação e detecção de proteínas, a presença dessas caudas de afinidade podem afetar características importantes, interferir nas funções e alterar o comportamento das proteínas-alvo a serem estudadas (BUCHER *et alii*, 2002; CHANT *et alii*, 2005; SMYTH *et alii*, 2003). A escolha pelo sistema pET de expressão no contexto deste trabalho deveu-se à facilidade de purificação do produto de interesse. A independência da conformação da cauda de seis histidinas para a ligação na resina Ni-Agarose permite que a proteína de interesse seja purificada. Além disso, esta cauda é bem menor do que muitas outras, sendo pouco imunogênica e contribui pouco para a conformação da molécula.

A expressão das proteínas rGCSTc e rGSTc foram bem sucedidas, porém, a proteína rGCSTc permaneceu apenas na forma de corpos de inclusão, provável consequência dos altos níveis de expressão e pelo mau dobramento da proteína. Esta falha no enovelamento deve-se à exposição de resíduos hidrofóbicos, muitas vezes regulada pela taxa metabólica da bactéria ou pela ausência de processamento pós-traducional em sistemas de expressão procariontes e levam a formação de agregados insolúveis (RUDOLPH & LILIE, 1996; VENTURA & VILLAVERDE, 2006). Este fato levou à introdução de algumas modificações no protocolo original a fim de se obter a proteína na forma solúvel. Uma modificação que pode levar à produção da proteína de interesse na sua forma solúvel é a diminuição da temperatura de crescimento e da indução. A temperatura é uma variável deste sistema que afeta diretamente o nível de expressão e a solubilidade da proteína, logo, uma diminuição na temperatura leva a uma diminuição nos níveis de expressão ao longo do tempo, o que colabora com o enovelamento, além do que, a energia livre do sistema é menor em temperaturas menores, possibilitando a formação das estruturas secundárias e terciárias. A redução da temperatura de ativação da cultura bacteriana é muito utilizada para expressão de proteínas que se agregam ou que são de difícil expressão (MAKRIDES, 1996; SORENSEN &

MORTENSEN, 2005) e neste trabalho, a queda da temperatura, foi um fator determinante para a expressão da rGSTc na fração solúvel. Entretanto, mesmo com essa modificação no sistema de expressão não foi possível obter a rGCSTc solúvel. Outros agentes solubilizadores também foram testados, mas nenhuma modificação levou à solubilização da proteína (dados não mostrados).

Redução da temperatura e concentração de IPTG e aumento do tempo de indução possibilitaram boa expressão da rGSTc recombinante solúvel, mas sua purificação por meio de cromatografia de afinidade ao níquel não foi possível. Neste caso há a possibilidade da sequência de histidinas não estar exposta o suficiente para permitir ligação ao níquel da coluna. Dessa forma, a enzima passaria direto pela coluna, juntamente com todas as outras moléculas. Este é um dos problemas de expressão heteróloga de proteínas. Uma vez que não foi possível obter a proteína recombinante na forma solúvel, condição necessária para a realização dos ensaios bioquímicos e funcionais, foi empregada a lise desnaturante para a purificação de ambas as proteínas, a qual utiliza a uréia como agente desnaturante, capaz de solubilizar os corpos de inclusão. Sob desnaturação, a enzima apresentaria a cauda de histidina de forma acessível ao níquel da coluna, facilitando sua purificação.

Uma alternativa para solucionar este problema seria a mudança da cauda de histidina para a outra extremidade da sequência da proteína. Isso poderia favorecer o dobramento correto da proteína, deixando sua cauda de histidina exposta. Além disso, poderíamos utilizar outro vetor de expressão para tentar a expressão das enzimas. Uma sugestão seria a troca do sistema de expressão pelo sistema baculovírus ou *Pichia pastoris* (LOMBARDI *et alii*, 2010) como hospedeiro, outra saída seria o emprego do sistema de expressão usando tripanosomatídeos. O protozoário tripanosomatídeo *Crithidia fasciculata*, além de não ser patogênico aos humanos é facilmente cultivado em grandes quantidades e constitui um importante modelo para a expressão de proteínas (TETAUD, 2002).

Os anticorpos policlonais produzidos pelos animais imunizados foram eficientes no reconhecimento da proteína recombinante e da proteína no extrato total de epimastigotas de *T. cruzi* por *immunoblot*, no entanto, neste tipo de ensaio a proteína está na sua forma desnaturada, logo, os anticorpos policlonais reconhecem epítomos presentes na sequência primária da proteína. Para saber se os anticorpos policlonais reconhecem a forma nativa, foram realizados ensaios de imunofluorescência, os quais necessitam do reconhecimento da forma nativa da proteína pelo anticorpo. Tanto o soro anti-rGCSTc como o anti-rGSTc, reconheceram a proteína nativa nas formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas do

parasito. Como já descrito por Harlow e Lane (1988), nem sempre anticorpos produzidos pela imunização de antígenos expressos em sistema heterólogo de *E. coli* são eficientes no reconhecimento da proteína nativa, pois proteínas na sua forma nativa apresentam epítomos conformacionais ou descontínuos. Um anticorpo que reconhece a proteína na sua forma nativa é de grande interesse, uma vez que pode ser utilizado em diferentes metodologias para investigação da interação das proteínas.

Apesar das enzimas GCS e GS já terem sido estudadas em uma gama de organismos, a imunocitocalização foi divulgada apenas em *Plasmodium berghei*, que revelam a γ -glutamylcisteína sintetase localizada na região citoplasmática do parasito (SHARMA & BANYAL, 2009).

Hunter e colaboradores, (1994), disseram que o sistema tiol-redox baseado no tiol de baixa massa molecular N¹, N⁸-bis glutationil-spermidina e tripanotona redutase (TriR) é único nos Tripanosomatídeos. Como as enzimas γ -glutamylcisteína sintetase e glutathione sintetase são expressas em todas as formas do parasito e são essenciais para a formação da GSH, podemos inferir deste resultado que elas são realmente importantes para o parasito.

Conclusões

O sistema biológico depende de rígido controle do processo de oxidação proveniente do metabolismo. A oxidação pode resultar em danos irreparáveis em inúmeras moléculas importantes para a manutenção da fisiologia celular e sistêmica. Assim, há uma via metabólica voltada para manter o sistema reduzido, garantindo a vida celular e sistêmica, que nos Tripanosomatídeos parece ser única, e alguma interrupção causaria danos ao parasito. Nesse intuito, esse trabalho teve como objetivo estudar duas enzimas participantes da via de óxido-redução do *T. cruzi*, e os experimentos realizados nos permitiu saber que:

1. A sequência nucleotídica do gene *gcs* e *gs* de *Trypanosoma cruzi* codifica uma proteína 693 e 535 resíduos de aminoácidos de massa molecular 79,67 kDa e 58,63 kDa respectivamente;
2. As proteínas GCS e GS apresentam sequências altamente conservadas entre outros eucariotos já estudados, inclusive entre os tripanosomatídeos patogênicos;
3. As proteínas recombinantes foram expressas em sistema heterólogo de *E. coli*, a partir do vetor de expressão *gcs*-pET28a e *gs*-pET28a;
4. As proteínas foram purificadas sob condições desnaturantes, pois a rGCSTc só está presente na fração insolúvel do lisado bacteriano, e rGSTc da fração solúvel apresentou dificuldades em se ligar na coluna de afinidade;
5. As proteínas recombinantes purificadas de corpos de inclusão são imunogênicas em camundongos, o que abre espaço para novas perspectivas;
6. Os anticorpos produzidos apresentaram especificidade;
7. Os genes *gcs* e *gs* são transcritos e as proteínas são expressas nas formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*.

Referências

- ABBOTT, J. J.; PEI, .; FORD, J. L.; QI, Y.; GRISHIN, V. N.; PITCHER, L. A.; PHILLIPS, M. A.; GRISHIN, N. V. Structure Prediction and Active Site Analysis of the Metal Binding Determinants in γ -Glutamylcysteine Synthetase. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276, n. 45, Issue of November 9, p. 42099–42107. 2001.
- ABBOTT, J. J.; FORD, J. L.; PHILLIPS, M. A. Substrate Binding Determinants of *Trypanosoma brucei* Gamma-Glutamylcysteine Synthetase. **Biochemistry**. v.41, n.8, p.2741-2750. 2002.
- AMATO NETO, V. Etiological Treatment for Infection by *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 94, p.337-339. 1999.
- ANDRADE, H. M.; MURTA, S. M. F.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; NIRDÉ, P.; ROMANHA, A. J. Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Resistance to Benznidazole. **Journal of Proteome Research**. v.7, p. 2357-2367. 2008.
- ANDREWS, N. W.; COLLI, W. Adhesion and Interiorization of *Trypanosoma cruzi* in Mammalian cells. **J. Protozool**. v.29(2), p.264-269. 1982.
- ARIYANAYAGAM, M. R.; FAIRLAMB, A. H. Ovothiol and Trypanothione as Antioxidants in Trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.115, p.189-198. 2001.
- ATAMNA, H.; GINSBURG, H. Origin of Reactive Oxygen Species in Erythrocytes Infected with *Plasmodium falciparum*. **Eur J. Biochem**. v.250(3), p.670-679. 1997.
- BIRAGO, C.; MARCHEI, E.; PENNINO, R.; VALVO, L. Assay of γ -Glutamylcysteine Synthetase Activity in *Plasmodium berghei* by Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.25, p.759-765. 2001.
- BREKKEN, D. L.; PHILLIPS, M. A. *Trypanosoma brucei* γ -Glutamylcysteine Synthetase: Characterization of the Kinetic Mechanism and the Role of Cys-319 in Cystamine Inactivation . **J. Biochem**. v.273, p.26317-26322. 1998.

- BUCHER, M. H.; EVDOKIMOV, A. G.; WAUGH, D. S. Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein, **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v. 58, p. 392–397. 2002.
- BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M.; Cell Signalling and *Trypanosoma cruzi* Invasion. **Cellular Microbiology**. v.4, n.11, p.701-711. 2002.
- CARNEGIE, P. R. Structure and Properties of a Homologue of Glutathione. **Biochem. J.** v.89, p.471-78. 1963.
- CASTRO, J. A.; MECCA, M. M. de; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471-479, Aug. 2006.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Chagas disease (American trypanosomiasis), 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>, Acesso em: Dezembro de 2010.
- CHAGAS, C. Nova Tripanosomíase Humana. Estudos sobre a morfologia e o Ciclo Evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen.,n. SP., Agente Etiológico de Nova Entidade Mórbida do Homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 1, p.159-218. 1909.
- CHANT, A.; KRAEMER-PECORE, C. M.; WATKIN, R.; KNEALE, G. G. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. **Protein Expression and Purification**, v. 39, n. 2, p. 152-159. 2005.
- DAVIS, J. S.; BALINSKY, J. B.; HARRINGTON, J. S.; SHEPHERD, J. B. Assay, Purification, Properties and Mechanism of Action of γ -Glutamylcysteine Synthetase from the Liver of the Rat and *Xenopus laevis*. **J. Biochem.** v.133, p.667-678. 1973.
- DREWES, G.; BOUWMEESTER, T. Global approaches to protein–protein interactions, **Current Opinion In Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 199-205. 2003.
- DUMAS, C.; OUELLETTE, M.; TOVAR, J.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; TAMAR, S.; OLIVIER, M.; PAPADOPOULOU, B. Disruption of the Trypanothione Reductase Gene of *Leishmania* Decreases Its Ability to Survive Oxidative Stress in Macrophages. **Embo J.** v.16, p.2590-2598. 1997.

- FAHEY, R. C., NEWTON, G. L., ARRICK, B., OVERDANK-BOGART, T., ALEY, S. B. *Entamoeba histolytica*: a Eukaryote Without Glutathione Metabolism. **Science**. v.224, p.70-72. 1984.
- FAIRLAMB, A. H., HENDERSON, G. B., BACCHI, C. J., CERAMI, A. In Vivo Effects of Difluoromethylornithine on Trypanothione and Polyamine Levels in Bloodstream Forms of *Trypanosoma Brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.24, p.185-191. 1987.
- FAIRLAMB, A. H., BLACKBURN, P., ULRICH, P., CHAIT, B. T., CERAMI, A. Trypanothione: A Novel Bis(glutathionyl)spermidine Cofactor for Glutathione Reductase in Trypanosomatids. **Science**. v.227, p.1485-1487. 1985.
- FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and Functions of Trypanothione in the Kinetoplastida. **Annu Rev Microbiol.** v.46, p.695-729. 1992.
- FAUNDEZ, M.; PINO, L.; LETELIER, P.; ORTIZ, C.; LÓPEZ, R.; SEGUEL, C.; FERREIRA, J.; PAVANI, M.; MORELLO, A.; MAYA, J. D. Buthionine Sulfoximine Increases the Toxicity of Nifurtimox and Benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.49, n.1, p. 126-130. 2005.
- FAUNDEZ, M.; LOPEZ-MUNOZ, R.; TORRES, G.; MORELLO, A.; FERREIRA, J.; KEMMERLING, U.; ORELLANA, M.; MAYA, J. D. Buthionine Sulfoximine Has Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity in a Murine Model of Acute Chagas' Disease and Enhances the Efficacy of Nifurtimox. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. p. 1837-1839. 2008.
- FILOMENI, G.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M. R. Disulfide Relays and Phosphorylative Cascades: Partners in Redox-mediated Signaling Pathways. **Cell Death and Differentiation**. v.12, p.1555-1563. 2005.
- FYFE, P. K.; ALPHEY, M. S.; HUNTER, W. N. Structure of *Trypanosoma brucei* Glutathione Synthetase: Domain and Loop Alterations in the Catalytic Cycle of a Highly Conserved Enzyme. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.170, p.93-99. 2010.
- GALI, R. R.; BOARD, P. G. Identification of an Essential Cysteine Residue in Human Glutathione Synthetase. **Biochem. J.** v.321, p.207-210. 1997.
- GeneDB. Disponível em: <<http://www.genedb.org/gene/Tc00.1047053507625.99:mRNA?actionName=/QuickSearchQuery>> ,Acesso em: Fevereiro de 2008.

GeneDB. Disponível em: < <http://www.genedb.org/gene/Tc00.1047053508865.10:mRNA?actionName=/QuickSearchQuery> > ,Acesso em: Fevereiro de 2008.

GRANT, C. M.; MACIVER, F. H.; DAWES, I. W. Glutathione Synthetase Is Dispensable for Growth under Both Normal and Oxidative Stress Conditions in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Due to an Accumulation of the Dipeptide γ -Glutamylcysteine. **Molecular Biology of the Cell**. v.8, p.1699-1707. 1997.

GRIFFITH, O. W., MEISTER, A. Origin and Turnover of Mitochondrial Glutathione. **Proc. Natl. Acad. Sci.**v.82, p.4668-4672. 1985.

GRIFFITH, O. W. Biologic and Pharmacologic Regulation of Mammalian Glutathione Synthesis. **Free Radic. Biol. Med.** v.27, p.922-935. 1999.

HANNAERT, V.; BRINGAUD, F.; OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P.A.; Evolution of Energy Metabolism and its Compartmentation Kinetoplastida Kinetoplastid. **Biol. Dis. Biomed. Central**. v.2, p.11-30. 2003b.

HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory: USA. 1998.

HIBI, T.; NII, H.; NAKATSU, T.; KIMURA, A.; KAT, H.; HIRATAKE, J.; ODA, J. Crystal Structure of γ -Glutamylcysteine Synthetase: Insights into the Mechanism of Catalysis by a Key Enzyme for Glutathione Homeostasis. **PNAS**. v. 101, n. 42, p.15052-15057. 2004.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D.; SAVIOLI, L. Control of Neglected Tropical Diseases. **N. Engl J. Med.** v. 357, p.1018-27. 2007.

HUANG, C. S.; MOORE, W. R.; MEISTER, A. On the Active Site Thiol of γ -Glutamylcysteine Synthetase: Relationships to Catalysis, Inhibition, and Regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.85, p.2464-2468. (1988).

HUNTER, K. J., LE QUESNE, S. A., FAIRLAMB, A. H. Identification and Biosynthesis of N^[sup1],N^[sup9]-bis(glutathionyl)aminopropylcadaverine (homotrypanothione) in *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Biochem.** v.226, p.1019-1027. 1994.

HUYNH, T. T.; HUYNH, V. T.; HARMON, M.A.; PHILLIPS, M. A. Gene Knockdown of γ -Glutamylcysteine Synthetase by RNAi in the Parasitic Protozoa *Trypanosoma brucei*

Demonstrates That It Is an Essential Enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 41, Issue of October 10, p. 39794–39800. 2003.

JAIN, A.; MARTENSSON, J.; STOLE, E.; AULD, P. A. M.; MEISTER, A. Glutathione Deficiency Leads to Mitochondrial Damage in Brain. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.88, p.1913-1917. 1991.

JANOWIAK, B. E.; HAYWARD, M. A.; PETERSON, F. C.; VOLKMAN, B. F.; GRIFFITH, O. W. γ -Glutamylcysteine Synthetase-Glutathione Synthetase: Domain Structure and Identification of Residues Important in Substrate and Glutathione Binding. **Biochemistry**. v.45, p.10461-10473. 2006.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COOMBS, G. H. Enzymes of Parasite Thiol Metabolism as Drug Targets. **Parasitology Today**, v.15, n. 10. 1999.

KRIEGER, S.; SCHWARZ, W.; ARIYANAYAGAM, M. R.; FAIRLAMB, A. H.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; CLAYTON, C. Trypanosomes Lacking Trypanothione Reductase Are Avirulent and Show Increased Sensitivity to Oxidative Stress. **Mol Microbiol**. v.27, p.966-984. 2000.

KUROSAWA, K., HAYASHI, N., SATO, N., KAMADA, T., TAGAWA, K. Transport of Glutathione Across the Mitochondrial Membranes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.167, p.367-372. 1990.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 85-108.

LE QUESNE, S. A., FAIRLAMB, A. H. Regulation of a High-affinity Diamine Transport System in *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. **Biochem. J.** v.316, p.481-486. 1996.

LEVI, G. C.; LOBO, I. M.; KALLÁS, E. G.; AMATO NETO, V. Etiological Drug Treatment of Human Infection by *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.38, p.35-38. 1996.

LOMBARDI, A.; BURSOMANNO, S.; LOPARDO, T.; TRAINI, R.; COLOMBATTI, M.; IPPOLITI, R.; FLAVELL, S. U.; CERIOTTI, A.; FABBRINI, M. S. *Pichia pastoris* as a host for secretion of toxic saporin Chimeras. **The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 1, p. 253-265. 2010.

- LOW, H. P.; PAULIN, J. J.; KEITH, C. H. *Trypanosoma cruzi* Infection of BSC-1 Fibroblast Cells Causes Cytoskeletal Disruption and Changes in Intracellular Calcium Levels. **J. Protozool.** v.39(4), p.463-470. 1992.
- LUEDER, D. V.; PHILLIPS, M. A. Characterization of *Trypanosoma brucei* γ -Glutamylcysteine Synthetase, an Essential Enzyme in the Biosynthesis of Trypanothione (Diglutathionylspermidine). **The Journal of Biological Chemistry.** v.271, n. 29, Issue of July 19, p. 17485-17490. 1996.
- LUERSEN, K.; WALTER, R. D.; MÜLLER, S. The Putative γ -Glutamylcysteine Synthetase From *Plasmodium falciparum* Contains Large Insertions and a Variable Tandem Repeat. **Molecular and Biochemical Parasitology.** v.98, p.131-142.1999.
- LUERSEN, K.; WALTER, R. D. MULLER, S. *Plasmodium falciparum*-Infected Red Blood Cells Depend on a Functional Glutathione de novo Synthesis Attributable to an Enhanced Loss of Glutathione. **Biochem. J.** v.346, p.545-552. 2000.
- MAJERUS, P. W.; BRAUNER, M. J.; SMITH, M. B.; MINNICH, V. Glutathione Synthesis in Human Erythrocytes. **J. Clin. Invest.** v.50, p.1637-1643. 1971.
- MAKRIDES, S. C. Strategies for Achieving High-level Expression of Genes in *Escherichia coli*. **Microbiological reviews.** v. 60, p. 512-538. 1996.
- MARTENSSON, J., LAI, J. C. K., MEISTER, A. High-Affinity Transport of Glutathione is Part of a Multicomponent System Essential for Mitochondrial Function. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.87, p.7185-7189. 1990.
- MATHERS, C. D.; EZZATI, M.; LOPEZ, A. D. Measuring the Burden of Neglected Tropical Diseases: the Global Burden of Disease Framework. **PLoS Negl Trop Dis.** v.1, p.114. 2007.
- MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G. Rapid Isolation of DNA From Trypanosomatid Protozoa Using a Simple 'mini-prep' Procedure. **Mol Biochem Parasitol.** v.59, p.327-530. 1993.
- MEIERJOHANN, S.; WALTER, R. D.; MULLER, S. Glutathione Synthetase from *Plasmodium falciparum*. **Biochem. J.** v.363, p.833-838. 2002.
- MEISTER, A. Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 263, n. 33, Issue of November 25, p. 17205-17208. 1988.

- MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current Epidemiological Trends for Chagas Disease in Latin America and Future Challenges in Epidemiology, Surveillance and Health Policy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.104 (1), p.17-30. 2009.
- MUKHERJEE, A.; ROY, G.; GUIMOND, C.; OUELLETTE, M. The γ -Glutamylcysteine Synthetase Gene of *Leishmania* is Essential and Involved in Response to Oxidants. **Molecular Microbiology**. v.74(4), p.914–927. 2009.
- MULLER, S.; LIEBAU, E.; WALTER, R. D.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Thiol-based Redox Metabolism of Protozoan Parasites. **Trends in Parasitology**. v.19 n.7. 2003.
- NEWTON, G. L., JAVOR, B. γ - Glutamylcysteine and Thiosulfate are the Major Low-Molecular-Weight Thiols in *Haliobacteria*. **J. Bacteriol.** v.161, p.438-441. 1985.
- ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M. E. A. A novel *Trypanosoma cruzi* Heparin-binding Protein Promotes Fibroblast Adhesion and Penetration of Engineered Bacteria and Trypanosomes Into Mammalian Cells. **Cell**. v.67, p.411-421. 1991.
- OZA, S. L.; TETAUD, E.; ARIYANAYAGAM, M. R.; WARNON, S. S.; FAIRLAMB, A. H. A Single Enzyme Catalyses Formation of Trypanothione from Glutathione and Spermidine in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, n. 39, Issue of September 27, p. 35853-35861. 2002.
- PASTERNAK, M.; Lim, B.; WIRTZ, M.; HELL, R.; COBBETT, C. S.; MEYER, A. J. Restricting Glutathione Biosynthesis to the Cytosol is Sufficient for Normal Plant Development. **The Plant Journal**. v.53, p.999-1012. 2008.
- PEREIRA, M. C.; COSTA, M.; CHAGAS FILHO, C.; MEIRELLES, M. N. Myofibrillar Breakdown and Cytoskeletal Alterations in Heart Muscle Cells During Invasion by *Trypanosoma cruzi*: Immunological and Ultrastructural Study. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** v.25(4), p.559-569. 1993.
- POLEKHINA, G.; BOARD, P. G.; GALI, R. R.; ROSSJOHN, J.; PARKER, M. W. Molecular Basis of Glutathione Synthetase Deficiency and a Rare Permutation Event. **Embo J**. v.18, p.3204-3213. 1999.
- RAFTOS, J. E.; WHILLIER, S.; KUCHEL, P. W. Glutathione Synthesis and Turnover in the Human Erythrocyte: Alignment of a Model Based on Detailed Enzyme Kinetics with Experimental Data. **The Journal of Biological Chemistry**. Manuscript M109.067017. 2010.

- RAMIREZ, M. I.; RUIZ, R. C.; ARAYA, J. E.; SILVEIRA, J. F.; YOSHIDA, N. Involvement of the Stage-Specific 82-Kilodalton Adhesion Molecule of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes in Host Cell Invasion. **Infect. Immun.** v.61(9), p.3636-3641. 1993.
- RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. **Lancet.** v.375, p.1388-1402. 2010.
- REPETTO, Y.; OPAZO, E.; MAYA, J. D.; AGOSIN, M.; MORELLO, A. Glutathione and Trypanothione in Several Strains of *Trypanosoma cruzi*: Effect of Drugs. **Comp. Biochem. Physiol.** v. i15b, n.2, p. 281-285. 1996.
- REVESZ, L. The Role of Endogenous Thiols in Intrinsic Radioprotection. **Int. J. Radiat. Biol.** v.47, p.361-368. 1985.
- ROMÃO, P. R. T.; FONSECA, S. G.; HOTHERSALL, J. S.; NORONHA-DUTRA, A. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Glutathione Protects Macrophages and *Leishmania major* Against Nitric Oxide-Mediated. **Cytotoxicity Parasitology.** v.118, p.559-566. 1999.
- RUDOLPH, R.; LILIE, H. In Vitro Folding of Inclusion Body Proteins. **The FASEB Journal.** v. 10 (1), p. 49-56. 1996.
- SANTANA, J. M.; GRELLIER, P.; RODIER, M-H.; SCHREVEL, J.; TEIXEIRA, A. Purification and characterization of a new 120 kDa alkaline proteinase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 187, n. 3, p. 1466-1473, Sept. 1992.
- SANTANA, J. M.; GRELLIER, P.; SCHREVEL, J.; TEIXEIRA, A. R. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **The Biochemical Journal**, v. 325, p. 129-137, July 1997.
- SHARMA, S. K.; BANYAL, H. S. γ -Glutamylcysteine Synthetase from *Plasmodium berghei*. **Parasitology International.** v. 58, p. 145-153. 2009.
- SHIM, H., FAIRLAMB, A. H. Levels of Polyamines, Glutathione and Glutathione-spermidine Conjugates During Growth of the Insect Trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. **J. Gen. Microbiol.** v.134, p.807. 1988.

- SMYTH, D. R.; MROZKIEWICZ, M. K.; MCGRATH, W. J.; LISTWAN, P.; KOBE, B. Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags, **Protein Science**: a Publication of the Protein Society, v. 12, n. 7, p. 1313–1322. 2003.
- SMITH, K.; OPPERDOES, F. R.; FAIRLAMB, A. H. Subcellular Distribution of Trypanothione Reductase in Bloodstream and Procyclic Forms of *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.48, p.109-112. 1991.
- SORENSEN, P. H.; MORTENSEN, K. K. Soluble Expression of Recombinant Proteins in the Cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories.** v. 4 (1), p.1-8. 2005.
- TABOR, H., TABOR, C. W. Isolation, Characterization, and Turnover of Glutathionylspermidine from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** v.250, p.2648-2654. 1975.
- TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.; WITTNER, M. Chagas Disease. **Clin. Microbiol. Rev.** v.5(4), p.400-419. 1992.
- TEIXEIRA, A. R. L.; CÓRDOBA, J. C.; SOUTO-MAIOR, I.; SOLÓRZANO, E. Chagas' disease: lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n. 2, p. 146-158. 1990.
- TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 5, p. 523-533. 2003.
- TETAUD, E.; LECUIX, I.; SHELDRAKE, T.; BALTZ, T.; FAIRLAMB, A. H. A new expression vector for *Crithidia fasciculata* and *Leishmania*. **Molecular & Biochemical Parasitology.** v.120, p. 195-204. 2002.
- TEW, K. D. Glutathione-Associated Enzymes in Anticancer Drug-Resistance. **Cancer Research.** v.54, n.16, p.4313-4320. 1994.
- TOVAR, J.; WILKINSON, S.; MOTTRAM, J. C.; FAIRLAMB, A. H. Evidence That Trypanothione Reductase is an Essential Enzyme in *Leishmania* by Targeted Replacement of the tryA Gene Locus. **Mol Microbiol.** v.29, p.653-660. 1998a.
- TOVAR, J.; CUNNINGHAM, M. L.; SMITH, A. C.; CROFT, S. L.; FAIRLAMB, A. H. Down-regulation of *Leishmania donovani* Trypanothione Reductase by Heterologous

Expression of a Trans-dominant Mutant Homologue: Effect on Parasite Intracellular Survival. **Proc Natl Acad Sci.** v.95, p.5311-5316. 1998B.

VAN BUSKIRK, G. E.; GANDER, J. E.; RATHBUN, W. B. Bovine Lenticular γ -Glutamylcysteine Synthetase: Reaction Sequence. **Eur. J. Biochem.** v.85, 589-597. 1978.

VENTURA, S; VILLAVERDE, A. Protein Quality in Bacterial Inclusion Bodies. **Trends Biotechnol.** v. 24, n. 4, p. 179-185. 2006.

WANG, C. L.; OLIVER, D. J. Identification of a Putative Flexible Loop in Arabidopsis Glutathione Synthetase. **Biochem. J.** v. 322, p.241-244. 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases, 2010. Disponível em: < http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf >, Acesso em: Dezembro de 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis), 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>, Acesso em: Dezembro de 2010.

YOSHIDA, N. Molecular Basis of Mammalian Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências.** v.78, n.1, Mar, p.87-111. 2006.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* Infection by Oral Route How the Interplay Between Parasite and Host Components Modulates Infectivity. **Parasitology International,** v.57, n.2, p.105-109. 2008.

YOSHIDA, N.; ARAYA, J. E.; SILVEIRA, J. F.; GIORGIO S. *Trypanosoma cruzi*: Antibody Production and T Cell Response Induced by Stage-specific Surface Glycoproteins Purified From Metacyclic Trypomastigotes. **Exp. Parasitol.** v.77, p.405-413. 1993.

YOUNG, D.; FAN, M. Z.; MINE, Y. Egg Yolk Peptides Up-regulate Glutathione Synthesis and Antioxidant Enzyme Activities in a Porcine Model of Intestinal Oxidative Stress. **J. Agric. Food Chem.** v.58, p.7624-7633. 2010.