Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro

Clonagem e expressão de Oligopeptidase B-símile, X-Prolil dipeptidil aminopeptidase e Glutationa sintetase de *Trypanosoma cruzi*.

KEYLA CAROLINE DE ALMEIDA

Orientador: Prof. Dr. Jaime Martins de Santana

Co-orientadora: Profa. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos

Brasília, 2009.

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro

Clonagem e expressão de Oligopeptidase B-símile, X-Prolil dipeptidil aminopeptidase Glutationa sintetase de *Trypanosoma cruzi.*

KEYLA CAROLINE DE ALMEIDA

Orientador: Prof. Dr. Jaime Martins de Santana
Co-orientadora: Profa. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos

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

Brasília, 2009.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro da Universidade de Brasília, sob a orientação do Prof. Jaime Martins de Santana e co-orientação da Profa. Izabela Marques Dourado Bastos. Este trabalho teve o apoio financeiro da CAPES e do CNPq.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à Deus, minha maior inspiração; À minha mamãe Lázara, meu orgulho e exemplo de vida; Ao meu papai João, amor eterno; Ao meu amor, sinônimo de força, companheirismo e carinho; As minhas irmãs Kenia, Karla e "tia" Nara, queridas sempre; Aos meus sobrinhos lindos Layslly, Ysabella, Pedro Henrique e bebês; E a todos os meus grandes amigos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela superação de todos os momentos difíceis e por essa vitória.

Ao meu papai, apesar de não ter sua presença física, espiritualmente sei que sempre esteve próximo e que me inspirava. Eu te amo!

À minha mamãe, sempre tão presente mesmo estando longe. Obrigada por me dar apoio, por fazer as coisas serem mais simples do que sempre imaginei, por ser minha "pãe" e por fazer parte da minha vida. A senhora é muito importante para mim. Eu te amo muito!!!!

Ao meu amor e futuro esposo, sempre tão dedicado e prestativo. Obrigada por me ajudar a permanecer em Brasília, seu apoio foi determinante; pelas correrias de disciplinas, de experimentos e da dissertação; por me escutar sempre, mesmo após um dia inteiro de trabalho; por discutir meus experimentos apesar de trabalharmos em áreas distintas; por ser meu companheiro sempre. Je t'aime mon amour!!!!

Às minhas irmãs queridas Kenia e Karla que sempre me enviaram bons pensamentos. Kenia, obrigada pelos seus cuidados de segunda mãe, pelos seus bolos maravilhosos e pelas boas gargalhadas. Karla, obrigada pelo entusiasmo, apoio incondicional e espírito de pesquisadora e por todo amor. À minha irmã mais nova "tia" Nara, obrigada por acreditar em mim sempre, pelas nossas conversas e agora pelos nossos gêmeos. Amo vocês! Sinto falta da presença de cada uma de vocês!

Aos meus filhinhos do coração, Layslly, Ysabella, Pedro Henrique e bebê, vocês sempre me cobriram de carinho, tornando minha vida mais alegre e completa. Obrigada por serem tão lindinhos e me encherem de orgulho.

Aos meus tios e vovô Sérgio, que de alguma forma participaram de vários momentos importantes da minha vida. E às minhas queridas dindinhas Maria e Antônia, amor infinito.

À Consola, ao Fernando e ao Elber por todo carinho. Obrigada por me deixarem fazer parte dessa família tão maravilhosa e abençoada.

À minha grande amiga Flávia, obrigada por ter me acolhido tão bem quando cheguei e por me ajudar sempre, nos testes, nas promessas para clonarmos os nossos genes, nos dias de desânimo e também nas diversões porque ninguém é de ferro! De todo o meu mestrado, pode ter certeza, que a sua amizade foi o que eu mais ganhei. Obrigada por tudo e vamos continuando, porque como diz uma sábia... Morro e não vejo tudo!!!

Ás minhas amigas Ellen e Nashira pelo início de tudo. Vocês me ajudaram muito quando cheguei e nunca esquecerei. Obrigada.

Aos meus amigos do laboratório, Flavia, Teresa, Marina, Brina, Isabel, Raquel, Bruna, Dani, Thiago, Hugo, Vivi, Paula, ao Marcio vizinho de bancada sempre fazendo companhia nas primeiras horas do dia, Ana Camila companheira de trabalho, apesar de não termos feito um único teste juntas; Isaac, meu amigo e cantor dos momentos reanimadores de "Flash Back", Andre e Yanna, obrigada pelas excelentes conversas; À todos os que me ajudaram, valeu!!!!

Aos meus amigos de outros laboratórios, Adelson, Alice e todos os amigos que fiz durante os testes em Goiânia, recebam meu obrigada. À Janayna pela amizade sincera e única. Saudades!

Ao querido professor Jaime Martins de Santana, pela oportunidade, confiança, orientação, paciência e exemplo de competência e dedicação; Muito obrigada;

À professora Izabela Marques Dourado Bastos muito obrigada pelo apoio, pela compreensão, por todas as idéias inspiradoras e principalmente pela amizade;

Aos professores da banca examinadora por aceitarem nosso convite.

Enfim, caso tenha me esquecido de algum nome, com certeza foi por cansaço e não por menor importância. Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram ou participaram ao longo desses dois anos. Com certeza, a caminhada seria muito mais difícil sem vocês.

“Quem sabe pode muito. Quem ama pode mais”

Francisco Cândido Xavier.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grau centígrado
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
ATP	adenosina tri-fosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
cm	centímetro
Cys	cisteína
Da	Dalton
DEPC	pirocarbonato de dietileno
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
g	grama
h	hora
His	histidina
IgG	imunoglobulina G
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosideo
K	quilo
Kb	quilobase
M	molar
mA	miliampere
min	minuto
mM	milimolar
ml	mililitro
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT	nitro-azul-tetrazólio
ng	nanograma
nm	nanômetro
OD	densidade óptica
PBS	tampão fosfato 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,2
Pro	prolina
pb	pares de base
RNA	ácido ribonucléico
Rpm	rotações por minuto
G	gravidade
SDS-PAGE	eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
Ser	serina
Tris	tris-hidroximetil-etano
U	unidade
UV	ultravioleta
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
V	volts

ÍNDICE

INTRODUÇÃO 12

1. Doenças infecciosas tropicais 12
2. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas 12
3. Fatores de virulência e alvos de drogas em *T. cruzi* 14
   3.1. Proteases 15
   3.2. Enzimas metabólicas 20

OBJETIVOS 26

MATERIAIS E MÉTODOS 27

1. Análises de bioinformática 27
2. Cultivo e obtenção de *Trypanosoma cruzi* 27
3. Extração de ácidos nucléicos de *Trypanosoma cruzi* 27
4. Amplificação inicial dos genes *opbstc, xpdaptc, gstc* 28
5. Eletroforese em gel de Agarose 28
6. Clonagem e subclonagem dos genes *opbstc, xpdaptc, gstc* 28
7. Análises de restrição enzimática 29
8. PCR de colônia 31
9. Expressão heteróloga das proteínas recombinantes 31
10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 32
11. Purificação das proteínas recombinantes 32
12. Precipitação da rOPBsTc 33
13. Imunização, obtenção de anticorpos policlonais e imunodetecção 34
14. Imunofluorescência e citolocalização da rOPBsTc 35
15. RT-PCR 35

RESULTADOS 37

1. Não há homólogos de OPBsTc e X-PDAPTc em mamíferos 37
2. A GSTc compartilha pouca identidade d sequência com seu ortólogo em humanos 43
3. Clonagem e subclonagem dos genes *opbstc, xpdaptc* e *gstc* 46
4. Expressão heteróloga e purificação das proteínas recombinantes 50
5. Produção de anticorpo e expressão das proteínas em *T. cruzi.* 57
6. Transcrição dos genes *opbstc* e *xpdaptc* 59

DISCUSSÃO 61

CONCLUSÕES 69

PERSPECTIVAS 70

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 71

RESUMO

Após um século da descoberta da Doença de Chagas, ainda não existe medicamento efetivo para o seu tratamento, e os chagásicos continuam sucumbindo às manifestações crônicas dessa grave enfermidade. A possibilidade de descobrir uma enzima ou uma via metabólica crucial para o ciclo de vida do parasita não se resume apenas à satisfação da curiosidade humana, mas também é fundamental para o desenvolvimento de fármacos que sirvam para combater as mais diferentes doenças, entre elas, a Doença de Chagas. Essa dissertação de mestrado descreve o estudo de três proteínas de *Trypanosoma cruzi*: duas proteases classificadas como serino-protease com domínio α/β hidrolase, pertencente ao clan SC e família S9 e S15, respectivamente - Oligopeptidase B símile (OPBsTc) e X-prolil dipeptidil aminopeptidase (X-PDAPTc) e uma proteína da via metabólica redox - a Glutationa sintetase (GSTc). A OPBsTc é uma enzima putativa de 903 aminoácidos com massa molecular esperada de 103,4 kDa sendo altamente conservada entre os cinetoplastídeos e ausente em humanos. A proteína recombinante foi expressa em *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot e purificada da fração insolúvel para produção de anticorpos em camundongo. Os soros foram utilizados em técnicas de *Immunoblotting* e imunocitolocalização na tentativa de confirmar a expressão da protease. Infelizmente, não foi possível confirmar a expressão da OPBsTc em nenhuma das três formas do parasita: epimastigota, tripomastigota e amastigosta. Também realizamos uma RT-PCR a partir do RNA da forma epimastigota, mas o resultado foi negativo. A segunda protease foi a X-PDAPTc, esta serino-protease é largamente estudada em *Lactococcus lactis* e parece ser um fator de virulência em *Streptococci*. Análises em bancos de dados mostraram que a distribuição da X-PDAPTc é restrita e não apresenta ortólogos em mamífero, além disso, a enzima tem 677 aminoácidos com massa molecular esperada de 76,8 kDa. A enzima foi produzida em *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot e purificada da fração insolúvel para produção de anticorpos em camundongo. X-PDAPTc é expressa na forma epimatigosta do parasito. A GSTc tem importante participação na biossíntese da glutationa para manutenção do ambiente redox no parasito. Em relação ao seu ortólogo em humanos, foi observada homologia reduzida, o que pode torná-la um alvo promissor para desenvolvimento de drogas, assim como as duas proteases citadas acima. Essa enzima tem 535 resíduos de aminoácidos e massa molecular predita de 58,6 kDa. A GSTc foi expressa e utilizada para testes de imunização.

ABSTRACT

After a century of the discovery of Chagas' disease, there is still no effective medicine for its treatment, and patients still succumb to severe manifestations of the chronic disease. The possibility of discovering an enzyme or metabolic pathway crucial to the parasite life cycle is not only to satisfy the human curiosity, but it is also fundamental to the development of drugs used to combat many different diseases, including Chagas' disease. This master's thesis describes the study of three proteins of *Trypanosoma cruzi*: two proteases classified as serine-protease with α / β hydrolase domain that belong to SC clan and family S9 and S15, respectively - Oligopeptidase B like (OPBsTc) and X-prolil dipeptidil aminopeptidase (X-PDAPTc) and a redox metabolic pathway enzyme - Glutathione synthetase (GSTc). The OPBsTc is a putative enzyme of 903 amino acids and molecular mass of 103.4 kDa. It is highly conserved among kinetoplastids and it is absent in humans. The recombinant protein was expressed in *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot and purified from the insoluble fraction for production of antibodies in mice. The sera were used in immunoblotting and immunocytology techniques in an attempt to confirm the expression of the protease. Unfortunately, we could not confirm the expression of OPBsTc in any of the three forms of the parasite: epimastigote, trypomastigote and amastigoste. We also performed a RT-PCR from total epimastigote RNA, but the result was negative. The second protease was X-PDAPTc, this serine-protease is extensively studied in *Lactococcus lactis* and it seems to be a factor of virulence in *Streptococci*. Analysis in databases showed that the distribution of X-PDAPTc is limited and it does not have any orthologs in mammalian. In addition, the enzyme has 677 amino acids with molecular mass of 76.8 kDa. The enzyme was produced in E. coli BL21 Star (DE3) One Shot and purified from the insoluble fraction for production of antibodies in mice. X-PDAPTc is expressed in the epimastigote form of the parasite. The GSTc has an important participation in the biosynthesis of glutathione in order to maintain redox environment of the parasite. The human ortholog shows low homology which may make it a promising target for drug development like the two proteases mentioned above. This enzyme has 535 amino acid residues and a predicted molecular mass of 58.6 kDa. The GSTc was expressed and used for immunization tests.

INTRODUÇÃO

1. Doenças infecciosas tropicais

Apesar dos avanços observados em relação ao conhecimento básico sobre várias doenças infecciosas e ao processo de descoberta e desenvolvimento de novas drogas, as denominadas doenças infecciosas tropicais continuam causando altos níveis de morbidade e mortalidade nos países menos desenvolvidos ou em desenvolvimento, sendo consideradas agravos de saúde pública (Trouiller *et alii*, 2002).

Aproximadamente um bilhão de pessoas em todo mundo são afetadas por doenças tropicais negligenciadas, sendo a maioria de pessoas pobres e marginalizadas. Essas doenças receberam pouca atenção ao longo dos anos, no que diz repeito a sua magnitude, e ao impacto no desenvolvimento econômico e na qualidade de vida (OMS, 2006).

Essas doenças tropicais variam quanto à sua distribuição geográfica, porém continuam diretamente vinculadas às condições sócio-econômicas, tais como pobreza, desnutrição, falta de instrução, desemprego e precariedade de saneamento. Podem causar dor aguda ou crônica, deformidades, incapacidade e morte (OPAS, 2007; OMS, 2006). Nesse contexto as doenças tropicais negligenciadas de maior relevância são a Tuberculose, a Hanseníase, a Dengue, a Schistosomíase, e as doenças causadas por protozoários como a Malária, a Leishmaniose e as Tripanosomíases (Barret *et alli,* 2003; Cox, 2004; Dias *et alii.*, 2002).

2. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanosomíase Americana foi descrita inicialmente em 1909 pelo Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas e até a atualidade continua representando um dos maiores problemas de saúde da América Latina. É uma doença parasitária grave e potencialmente debilitante, causada pelo parasito protozoário *T. cruzi* e com origem no continente americano (OMS, 2007; Gascon *et alii.*, 2007; Massad, 2008).

No início do século XX, em um curto intervalo de tempo, o Dr. Carlos Chagas descreveu 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 da doença e posteriormente o aspecto clínico da fase crônica, principalmente a forma cardíaca, abrindo portas para as pesquisas sobre essa importante doença infecciosa (Bestetti *et alii.*, 2009; Pittella, 2009).

Estima-se que pelo menos treze milhões de pessoas da América Latina encontram-se infectadas pelo *T. cruzi* e que 100 milhões de pessoas encontram-se em risco de adquirirem a doença. Além disso, essa tripanossomíase apresenta uma incidência de cerca de duzentos mil novos casos por ano e existem milhões de pacientes chagásicos que necessitam de atenção médica específica (Lauria-Pires *et alii*, 2000; OMS, 2007; Briceno-Leon, 2009).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado inicia-se quando formas tripomastigotas metacíclicas, eliminadas nas fezes e urina do inseto vetor durante repasto, penetram na pele ou mucosas do vertebrado (Fig. 1). A forma tripomastigota pode potencialmente invadir qualquer tipo celular e aí se desenvolver. A fase inicial do processo de interação parasita-célula hospedeira requer a adesão do *T. cruzi* à superfície da célula alvo, envolvendo reconhecimento celular entre glicoproteínas e lectinas presentes na superfície de ambas as células. Em seguida à adesão, ocorrem modificações nas membranas do parasita e do hospedeiro, mecanismo que envolve ligante-receptor e atividade proteolítica. Ao contrário de células fagocíticas, a invasão de células não fagocíticas não requer projeções da membrana plasmática da célula hospedeira. Apesar disso, o parasita entra por depressões da membrana formando uma vesícula parasitófora num processo dependente de um mecanismo liberador de Ca^{2+} da célula hospedeira pelo parasita e o recrutamento de lisossomos desta para o local de adesão. Esse mecanismo é altamente complexo e envolve várias proteínas do parasito como GP82, gp35/50, oligopeptidase B e cruzipaína (Yoshida, 2006; Yoshida, 2008). Após a fusão de lisossomos à vesícula parasitófora (fagolisossomo), uma neuraminidase do parasita, ativada por pH ácido, promove dessialização de glicoproteínas da superfície interna da membrana do lisossomo (Hall *et alii,* 1992). Em sinergia, uma proteína do parasita, homóloga ao componente C9 do complemento, forma poros na membrana do fagolisossomo (Andrews *et alii,* 1990). Ainda por influência do ambiente ácido, os tripomastigotas no citoplasma diferenciam-se em amastigotas. Após sucessivas divisões binárias, os amastigotas transformam-se em tripomastigotas em um processo igualmente dependente de atividade enzimática do proteassoma. Por fim, a célula hospedeira rompe-se e libera tripomastigotas no meio extracelular. Desta forma os parasitos estão aptos para começar novo ciclo, infectando células vizinhas (Burleigh & Woolsey, 2002; Yoshida, 2006).

Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (OMS, 2009).

Após 100 anos de sua descoberta, a doença de Chagas continua incurável e desafiando os cientistas que buscam descobrir seus mecanismos patogênicos. Estudos de vários grupos indicam fortemente que a forma cardíaca crônica, desenvolvida por cerca de 30% dos pacientes infectados, seja o resultado sinérgico de mecanismos auto-imunes, aqueles determinados pelo próprio parasito e a presença de citocinas e quimiocinas inflamatórias (Bilate & Cunha-Neto, 2008; Elmunzer *et alli,* 2004). Em adição à acentuada morbidade e mortalidade da doença na America Latina, o Benzonidazol (Nbenzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) e o Nifurtimox (4[(5-nitrofurfurilideno)amino]-3-metiltiomorfolino-1,1-dióxido) são tóxicos e pouco eficazes no tratamento de pacientes crônicos, 5% de cura, (Fernandes *et alii*, 2009; Prata, 2001). Além disso, a análise proteômica cuidadosa revelou que o parasito desenvolve resistência multigênica ao Benzonidazol (Andrade *et alii,* 2008). Esse cenário indica fortemente a necessidade de se buscar novos meios de tratar a doença de Chagas.

3. Fatores de virulência e alvos de drogas em *T. cruzi*

Desde o primeiro contato do *T.* cruzi com a célula do hospedeiro mamífero até o desenvolvimento e progressão da doença de Chagas, existe uma intensa participação de diversas proteínas envolvidas nos mecanismos de interação patógeno-hospedeiro. Essas proteínas contribuem, por exemplo, para a adesão do parasito à célula hospedeira, para a sua entrada e internalização, bem

como para as adaptações do protozoário ao meio extra e intracelular encontrado dentro do inseto ou do hospedeiro mamífero (Buscaglia *et alii*, 2006; Buscaglia & Di Noia, 2003; Caler *et alii*, 1998; Sant'anna *et alii*, 2008).

Essas proteínas são essencias para a sobrevivência do patógeno no hospedeiro, influenciando na patogênese, características de fatores de virulência. Dessa forma tais proteínas podem representar alvos propícios para o desenvolvimento de quimioterápicos (Alcami, 2004; Yazdani *et alii*, 2006; Chang *et alii*, 2002). Como exemplo, encontram-se as proteases e proteínas metabólicas, foco desse estudo.

3.1. Proteases

A participação da atividade de proteases no mecanismo de infecção das células do hospedeiro mamífero pelo *T. cruzi* é bem documentada. Por exemplo, formas tripomastigotas do parasito quando tratadas com inibidores de proteases tais como leupeptina, STI e aprotinina tornam-se menos eficientes em infectar fibroblastos (Piras *et alii*, 1985). Outros resultados promissores foram observados com derivados de peptidil diazometano, os quais impedem a metacicloneogênese e a infecção de células hospedeiras mamíferas (Meirelles *et alii,* 1992). Portanto, as proteases em geral podem ser consideradas fatores de virulência de *T. cruzi*, assim como os são em outros patógenos.

Proteases ou peptidases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas de proteínas ou de fragmentos peptídicos causando modificações de seus substratos com conseqüências importantes para os sistemas biológicos, sendo amplamente distribuídas na natureza (Klemba & Goldberg, 2002). Aquelas que clivam ligações peptídicas internas são conhecidas como endopeptidases ou proteinases, enquanto as que removem resíduos de aminoácidos das extremidades dos substratos são chamadas de exopeptidases (carboxi e aminopeptidases) (Barrett & McDonald, 1986).

A atividade enzimática das proteases é altamente dependente do pH do microambiente em que a reação acontece, o que permite classificá-las em ácidas, alcalinas ou neutras. As proteases ácidas geralmente são encontradas em compartimentos lisossômicos ou vesículas associadas ao lisossomo e no trato gastrointestinal, já as alcalinas ou neutras não possuem compartimentalização específica (Barrett *et alii*, 1986; Alvarez *et alii*, 2008).

Além disso, as proteases podem ser classificadas baseando-se no mecanismo catalítico e na suscetibilidade comum a determinados inibidores em metalo-proteases, cisteíno-proteases, aspártico-proteases, serino-proteases, treonino-proteases e glutâmico-proteases (Barrett *et alii*, 1986; Fujinaga *et alii*, 2004; Lowe *et alii*, 1995).

As metalo-proteases possuem a presença de um cátion bivalente, geralmente zinco ou cálcio, no sítio ativo que pode direcionar a ligação peptídica a ser clivada e estabilizar a própria proteína, sendo geralmente inibidas por agentes quelantes. As cisteíno-proteases, amplamente distribuídas na natureza, possuem o sítio ativo formado geralmente pela tríade Cys-His-Asn. As atividades dos membros desta classe, papaína é protótipo, são inibidas por compostos que apresentam um grupo tiol bastante reativo, como o L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano (E-64). O sítio ativo das aspártico-proteases é formado geralmente por um par de resíduos de ácido aspártico (Asp-Asp) e inibido por pepstatina ou compostos de diazoacetil (Barret & Rawling, 1991).

Já as treonino-proteases possuem apenas seis famílias descritas e parece existir uma participação nucleofílica do resíduo de treonina N-terminal, mas os inibidores precisam ser melhor caracterizados (Lowe *et alii*, 1995). As glutâmico-proteases foram descritas recentemente e apresentam uma única família, cuja atividade catalítica parece iniciar-se com a ativação do resíduo de ácido aspártico. O composto 1,2-epoxi-3-(*p*-nitrofenoxi) propano (EPNP) é potente inibidor desta classe de proteases (Fujinaga *et alii,* 2004; Arrick *et alii*, 1981).

Em relação às serino-proteases, há 72 famílias e 17 subfamílias descritas, abrangendo uma grande quantidade de membros que possuem o sítio catalítico formado pela tríade de serina, ácido aspártico e histidina. Suas atividades são inibidas por diferentes compostos como diisopropilfluorofosfato (DFP) e fenilmetilsufonil fluoreto (PMSF), dentre outros (Bond *et alii*, 1987; Rawlings *et alii*, 2006).

3.1.1. Família S9 e S15 de serino-proteases

Dentro da classificação de serino-proteases, existem membros importantes do clã de serino-carboxipeptidases (SC), como no caso da família S9 e S15 (Fig. 2). Os membros da família S9 possuem estrutura tridimensional bastante conservada, apesar de sequências primárias divergentes. A tríade catalítica de Ser-Asp-His na porção C-terminal também é preservada, uma característica própria dos membros dessa família. Como as características bioquímicas, estruturais e funcionais diferem entre os membros, esta família foi subclassificada em A, B, C e D (Rawlings *et alii*, 1995). A família S9 é composta por proteases pertencentes às subfamílias S9A, como a prolil oligopeptidase e a oligopeptidase B; à S9B, como a dipeptidil peptidase e a proteína ativadora de fibroblasto (FAPα); à S9C como a acilamino-acilpeptidase e à S9D como a glutamil peptidase (Fig. 2). Membros da família S15, como a X-prolil dipeptil aminopeptidase, ainda são pouco estudados. A tríade catalítica é formada

pelos resíduos Ser-His-Asp e a principal característica catalítica é a liberação de dipeptídeos Xaa-Pro da porção amino terminal dos substratos (Chich *et alii*, 1992; Rigolet *et alii*, 2002; Fig. 2).

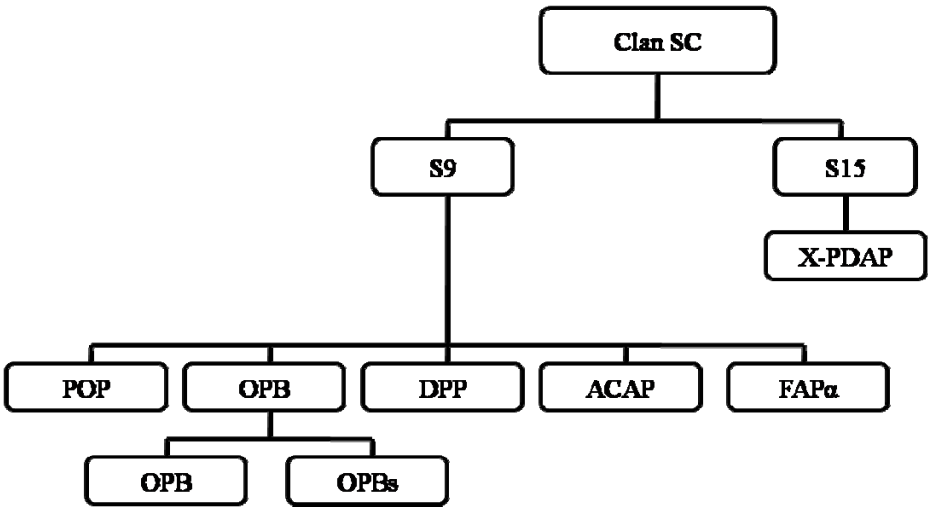

Figura 2. **Representação de alguns membros do clan SC.** POP – prolil oligopeptidase; OPB – oligopeptidase B; OPBs – oligopeptidase B símile; DPP – dipeptidil peptidase; ACAP – acilaminoacil peptidase; FAPα - proteína ativadora de fibroblasto; X-PDAP – X-prolil dipeptidil aminopeptidase.

As proteínas que compõem a família S9 estão relacionadas a diversas patologias. Por exemplo, a prolil oligopeptidase está associada à progressão da amnésia e ao desenvolvimento do mal de Alzheimer (Yoshimoto *et alii*, 1980; Moriyama *et alii*, 1998; Kato *et alii*, 1980; Shinoda *et alii*, 1995; Schulz *et alii*, 2002; Laitinen *et alii*, 2001). A prolil oligopeptidase de *T. cruzi* (POPTc80) está envolvida na entrada de formas trypomastigotas em células mamíferas não fagocíticas. Por isso, é considerada um fator de virulência importante e, consequentemente um potencial alvo para o desenvolvimento de drogas (Santana *et alii*, 1997; Grellier *et alii*, 2001; Bastos *et alii*, 2005; Burleigh *et alii*, 1995). A atividade de dipeptidil peptidase auxilia linfócitos a migrarem através dos tecidos (Kameoka *et alii*, 1993; Hanski *et alii*, 1985). A formação, o remodelamento e a manutenção de tumores epiteliais dependem da atividade da FAPα, uma enzima com atividade colagenolítica como a POPTc80 (Monsky *et alii*, 1994).

A X-prolil dipeptidil aminopeptidase, da família S15, é uma enzima ainda pouco estudada. Sabe-se, entretanto, que sua atividade tem participação efetiva na hidrólise de alguns peptídeos derivados da caseína em *Lactococcus lactis*, fornecendo resíduos de aminoácidos essenciais para esse

organismo ou alterando a composição peptídica de produtos fermentados do leite (Rigolet *et alii*, 2002). Desta forma, essa proteína parece, pelo menos neste caso, estar associada ao metabolismo. Em conjunto, esses dados mostram que o Clan SC de serino proteases medeiam atividades envolvidas nos mais diversos processos biológicos. A seguir, apresentaremos detalhes da X-prolil dipeptidil aminopeptidase e da oligopeptidase B de *T. cruzi,* objetos deste estudo.

3.1.2. Oligopeptidase B

A oligopeptidase B (OPB) foi inicialmente isolada de *Escherichia coli* apresentando uma especificidade semelhante à de tripsina por ter como substratos ligações peptídicas do lado carboxílico de resíduos básicos como lisina e arginina (Pacaud & Richaud, 1975). Essa serino-protease é classificada, como descrito anteriormente, no clã SC, família S9A ou prolil oligopeptidase (POP), mas diferentemente dos outros membros da família, é incapaz de clivar após prolina (Rawlings *et alii*, 2006). Apesar dessa característica ela compartilha semelhanças estruturais e resíduos da tríade catalítica (Barret & Rawlings, 1991). Essa proteína apresenta o domínio catalítico com um motivo α/β hidrolase e um domínio de sete folhas β, sendo bastante específica para clivagem dos resíduos básicos (Gerczei *et alii*, 2000; Polgar, 1997).

A expressão de OPB por alguns tripanosomatídeos como *T. cruzi, T. brucei, T. congolense, T. evansi* e *Leishmania major* está bem descrita na literatura (Burleigh *et alii*, 1995; Morty *et alii*, 1999a, 1999b, 2005). Apesar de poucos relatos sobre seus substratos naturais, acredita-se que a OPB seja capaz de clivar peptídeos com menos de 30 resíduos de aminoácidos (Morty *et alii*, 2002). Entretanto foi demonstrado que a oligopeptidase B de *Salmonella enterica* é capaz de degradar histonas com massa molecular de até 14 kDa (Morty *et alii*, 2002). As funções biológicas de OPBs são desconhecidas, exceto pelo fato de serem fatores de virulência em *T. cruzi* durante a infecção e de estarem relacionadas com patogenias periodentais em *Treponema denticola* (Fenno *et alii*, 2001).

A oligopeptidase B de tripanosomatídeos foi primeiramente descrita em *T. cruzi* (OPBTc) por Santana *et alii* (1992), como uma enzima de atividade restrita e neutra e, então, caracterizada como proteína citosólica de 80 kDa. Elegantes estudos realizados pelo grupo da Dra. N. Andrews demonstraram que a OPBTc está associada com o influxo transitório de Ca^{2+} em células de mamíferos, resultando em recrutamento de lisossomos para o sítio de invasão do parasito. A fusão de lisossomos é um processo necessário à entrada do *T. cruzi* nas células do hospedeiro e a continuidade do seu ciclo de vida (Burleigh & Andrews, 1995). A deleção do gene que codifica a oligopeptidase B resultou em

severa redução dessa capacidade de infecção (Caler *et alii*, 1998). Além disso, estudos recentes no nosso laboratório demonstraram que essa protease é também secretada e, apesar de antigênica durante o curso da infecção, não é inibida por anticorpos específicos (Fernandes *et alii*, 2005). Sobre sua estrutura e propriedades biofísicas pouco se sabe. Entretanto, estudos conduzidos em nosso laboratório indicam que a OPBTc apresenta estrutura dimérica estável às variações de pH e temperatura, mas particularmente sensível à força iônica (dados não publicados).

Análise da sequência do genoma de *T. cruzi* revelou um gene que codificaria outra oligopeptidase B (oligopeptidase B-símile, Tc00.1047053505939.20, GeneDB). Sua fase aberta de leitura possui 2712 pares de bases e codifica teoricamente uma proteína de 903 resíduos de aminoácidos com massa predita de 104,3 kDa (GeneDB, 2009), a qual denominamos OPBsTc (oligopeptidase B símile de *Trypanosoma cruzi*). Exceto o que pode ser associado pelo conhecimento da atividade da OPB, nada se conhece sobre a oligopeptidase B-símile de *T. cruzi* ou de outros organismos. Como a OPBTc é fator de virulência importante, é possível hipotetizar que a OPBsTc também tenha uma atividade associada à manutenção do ciclo de vida do *T. cruzi*.

3.1.3. X-Prolil Dipeptidil Aminopeptidase

A X-prolil dipeptidil aminopeptidase (X-PDAP) é largamente estudada em *L. lactis* sendo classificada como serino-protease com domínio α/β hidrolase, pertencente ao clan SC e família S15, como descrito anteriormente acima (Fig. 2). No que diz respeito ao sítio ativo da enzima, a X-PDAP compartilha características comuns com enzimas da família S9B (Dipeptidyl peptidase IV, DPPIV, por exemplo), apresentando a mesma especificidade para resíduos de prolina e com atividade na remoção de dipeptídeos Xaa-Pro da extremidade N-terminal de peptídeos (Rigolet *et alii*, 2002; Matos *et alii*, 1998).

A identificação da X-prolil dipeptidil aminopeptidase de *T. cruzi* (X-PDAPTc), também foi possível após o sequenciamento do genoma de *T. cruzi*. (GeneDB, 2009). O gene da X-PDAPTc (Tc00.1047053508699.120) apresenta fase aberta de leitura com 2034 pares de bases que codifica, teoricamente, uma proteína com massa molecular de 76,8 kDa e 677 resíduos de aminoácidos (GeneDB, 2009).

3.2. Enzimas metabólicas

O estudo de enzimas que catalisam reações metabólicas sempre fascinou os cientistas que cedo compreenderam que várias delas desempenham funções chaves de regulação, de síntese e de hidrólise de moléculas importantes para manutenção da vida dos organismos. Neste contexto, muitos trabalhos têm revelado características de enzimas associadas ao metabolismo de aminoácidos, açucares, nucleotídeos e de lipídeos (Hampton, 1970; Camargo, 1964; Nowicki *et alii*, 2008; Canepa *et alii*, 2009; Bacchi *et alii*, 1997). Como exemplos, citamos que inibidor da metiladenosina fosforilase e de esterol-14 desmetilase inibem o desenvolvimento e a diferenciação, respectivamente, de *T. cruzi in vitro* (Buckner *et alii*, 2003; Furuya *et alii*, 2000).

Assim como demonstrado nos trabalhos supracitados, o estudo dos mecanismos bioquímicos participantes do metabolismo do *T. cruzi* pode revelar promissores alvos bioquímicos para o desenvolvimento de fármacos, principalmente porque o parasito pode ter vias metabólicas diferentes das observadas no hospedeiro. Nesse sentido, o trabalho foi direcionado também para o estudo de uma enzima participante da via que regula o delicado equilíbrio oxidação/redução do parasito, a glutationa sintetase.

3.2.1. Via de sinalização redox através da glutationa

Em qualquer organismo, o controle da homeostasia redox celular é afetado por um excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (NOS), originadas como produtos do crescimento aeróbico ou do meio durante estímulos, caracterizando fenômenos de estresse oxidativo (Filomeni *et alii*, 2005). Dependendo do nível e da extensão desse estresse, as células podem desenvolver respostas adaptativas por um curto ou longo período, de acordo com vários fatores como, por exemplo, o período de exposição a ROS e NOS (Krauth-Siegel *et alii*, 2008). Os cinetoplastídeos possuem uma maquinaria única de tióis de baixas massas moleculares e de proteínas redox, distribuídos entre seus diferentes compartimentos celulares e que, aparentemente, garantem homeostase redox bem eficiente. Isto porque, em conjunto com outros mecanismos de evasão, os parasitos conseguem sobreviver à explosão oxidativa durante a infecção e adaptar-se perfeitamente às diferentes condições metabólicas do meio, impostas pelo seu ciclo de vida e pela resposta imune do hospedeiro (Krauth-Siegel *et alii*, 2008; Irigoin *et alii*, 2008).

Portanto, após o contato do *T. cruzi* com o hospedeiro, inicia-se a explosão oxidativa ou explosão respiratória do sistema imune inato, que consiste na somatória de todas as espécies reativas de

oxigênio e nitrogênio envolvidas na interação entre o hospedeiro e o patógeno, com ação antimicrobiana e que são produzidas por fagócitos ativados com citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, o interferon γ (IFN-γ) e o fator de necrose tumoral α (TNF-α). A atividade anti-microbiana ótima de macrófagos, células dendríticas e outros fagócitos é baseada na produção de ânions superóxidos e óxido nítrico pelas NADPH oxidases ativadas e pela Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS), respectivamente (Muller *et alii*, 2003). Dessa forma, o parasito protozoário, além de ter que eliminar seus próprios metabólitos tóxicos, ainda precisa sobreviver à hostilidade do ambiente resultante dessa explosão oxidativa (Irigoin *et alii*, 2008; Muller *et alii*, 2003).

Um sistema bastante eficiente presente em muitos organismos e que apresenta um papel fundamental no metabolismo redox e na proteção celular contra danos oxidativos, consiste na presença da glutationa (GSH), que é considerada um tampão tiol redox responsável por manter o ambiente celular reduzido, envolvida na detoxificação de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (N_2O_2) e na prevenção de danos oxidativos em proteínas, membranas e ácidos nucléicos (Meister *et alii*, 1983; Meierjohann *et alii*, 2002; Du *et alii*, 2009). A glutationa (GSH), um tripeptídeo tiol formado pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina, é o tiol mais abundante no meio intracelular. Esse peptídeo (γ-L-glutamil-L-cisteinil-glicina) é encontrado nos organismos em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) que é a forma dimerizada da GSH. A forma reduzida é observada em quantidade bem maior do que a oxidada, sendo que em mamíferos menos de 0,2% da glutationa total do organismo encontra-se oxidada (Birago *et alii*, 2001; Meister, 1988).

A biossíntese da GSH é catalisada pela ação consecutiva de duas enzimas dependentes de ATP: a γ-Glutamilcisteína sintetase (γ-GCS), produzindo glutamilcisteína e a glutationa sintetase (GS), levando à formação da glutationa (GSH) (Birago *et alii*, 2001). Portanto, essa síntese 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. A formação desta ligação peptídica necessita da ativação da carboxila γ realizada por ATP. Essa primeira reação é inibida em elevadas concentrações de GSH, sendo um passo limitante da reação total de síntese (Fig. 3). A segunda reação é catalisada pela glutationa sintetase, onde o ATP ativa a carboxila da cisteína para possibilitar que ela se condense com a amina da glicina (Birago *et alii,* 2001; Janowiak *et alii*, 2006; Meister, 1988; Tew, 1994; Fig. 3).

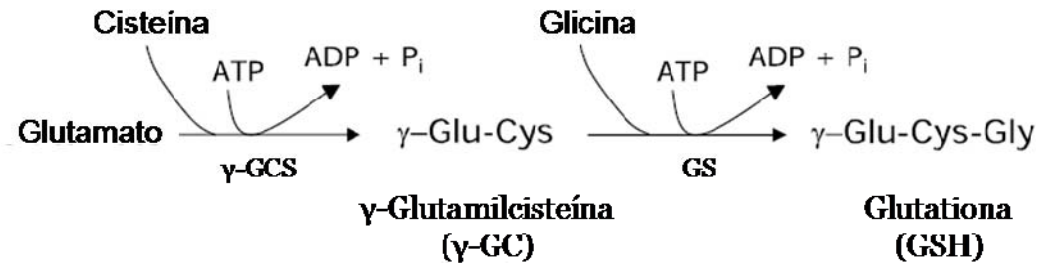

Figura 3. **Reações bioquímicas de síntese da GSH**. γ-GCS – γ-glutamil cisteína sintetase; GS – glutationa sintetase.

Essa enzima é sintetizada pela maioria dos organismos eucariotos e em alguns procariotos, como, por exemplo, cianobactérias, bactérias gram-negativas e bactérias láticas (Kim *et alii*, 2008; Luersen *et alii*, 2000). Estudos realizados com *Streptococcus agalactiae* e *Listeria monocytogenes* demonstraram a presença dos genes multidomínio que codificam a γ-glutamilcisteína sintetase e a glutationa sintetase, que assim como relatado anteriormente apresentam fundamental atividade catalítica na síntese da glutationa (Kim *et alii*, 2008; Janowiak *et alii*, 2006).

A GSH participa de importantes reações de óxido-redução como, por exemplo, quando utilizada pelas GSH peroxidases, atua reduzindo o peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos resultantes do metabolismo através da formação da GSSG, protegendo as células, membranas e ácidos nucléicos da oxidação; quando utilizada pelas GSH transidrogenases catalisam a formação e redução de pontes dissulfeto de proteínas através da transferência de grupos tióis, promovendo reciclagem de proteínas fundamentais. A reação catalisada pela GSH redutase é capaz de reduzir tiol transferases e peroxidases, tornando-as aptas para outras reações redox, contribuindo novamente para a homeostasia do microambiente celular (Meister, 1988).

Em contraste com o hospedeiro mamífero que conta com os mecanismos da glutationa (GSH)/glutationa redutase(GR) e também da tioredoxina/tioredoxina redutase para a manutenção da homeostasia tiol redox intracelular, os tripanosomatídeos não apresentam glutationa redutase e tioredoxina redutase (Leitsch, *et alii,* 2007). Portanto, o metabolismo desses parasitos depende de um ditiol particular denominado tripanotiona e a sua redutase correspondente, a tripanotiona redutase (Irigoin *et alii*, 2008).

3.2.2. . Tripanotiona e o mecanismo redox em *T. cruzi*

Os cinetoplastídeos diferem de outros organismos na sua abilidade em conjugar a glutationa com a espermidina para formar um novo cofator, a tripanotiona ([*N*1, *N*8-bis(glutationil)espermidina]), um ditiol de baixa massa molecular (Oza *et alii*, 2002). Esse ditiol consiste de duas moléculas de glutationa (GSH) ligadas covalentemente à espermidina através da tripanotiona sintetase (Fig. 4), o qual é mantido em estado reduzido pela ação da tripanotiona redutase, uma enzima homóloga à glutationa redutase (Irigoin *et alii*, 2008).

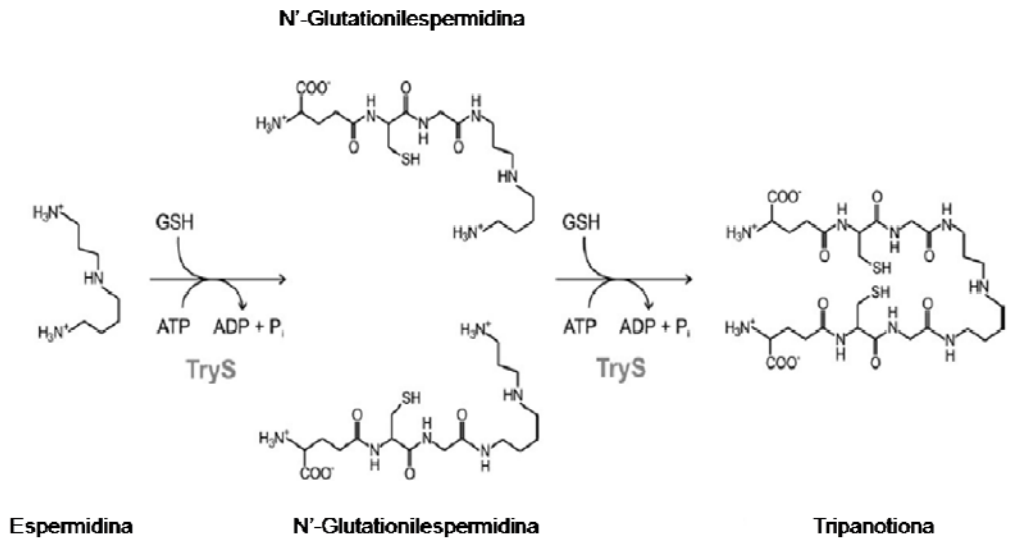

Figura 4. **Síntese da tripanotiona**. GSH – glutationa; TryS – tripanotiona sintetase.

Os tripanosomatídeos apresentam verdadeiros estoques celulares da tripanotiona para evitar o estresse oxidativo por radicais peróxidos resultantes da resposta imunológica do hospedeiro. Eles utilizam esse conjugado para manter o equilíbrio celular redox semelhante ao mecanismo redox da glutationa /glutationa redutase, contribuindo de maneira essencial para sua sobrevivência no hospedeiro (Abbott *et alii*, 2002).

Estudos demonstram o papel protetor da glutationa e da tripanotiona contra os efeitos citotóxicos causados pelo óxido nítrico e espécies reativas em células de mamíferos e de organismos patogênicos (Romao *et alii*, 1999; Denkers *et alii*, 2005). Além disso, a superexpressão de glutationa em protozoários geralmente está associada ao desenvolvimento de resistência ao tratamento (Repetto *et*

alii, 1996). Em adição, testes com um inibidor específico da γ-glutamilcisteína sintetase, o L-butionina sulfoximina (L-BSO), revelaram uma possibilidade de cura da infecção ou de prolongar a sobrevida de camundongos infectados por *T. brucei*, uma vez que ele é capaz de interferir na formação da tripanotiona, ocasionando uma maior exposição do parasito aos processos oxidativos do sistema imune e do meio, contribuindo para o controle da infecção (Abbott *et alii*, 2002; Arrick *et alii*, 1981).

3.2.3. Glutationa sintetase

Como descrito anteriormente, a glutationa sintetase (GS) catalisa a última etapa de biossíntese no ciclo γ-glutamil, apresentando um papel central na síntese da glutationa (Fig 3) (Meierjohann *et alii*, 2002). Portanto, a GS participa da união do intermediário γ-glutamilcisteína com a glicina, em uma reação dependente de ATP (Janowiak *et alii*, 2006). A glutationa está presente em praticamente todos os tecidos mamíferos e sua redução em humanos está correlacionada com várias patologias graves, como acidose metabólica severa, 5-oxoprolinúria, anemia hemolítica e disfunções neurológicas e sua ausência provavelmente seria letal (Dahl *et alii*, 1997; Shi *et alii*, 1996). Essa enzima também já foi descrita em organismos distintos, como fungos (Grant *et alii*, 1997), plantas (Pasternak *et alii*, 2008) e protozoários, mas sempre associada com função protetora contra o estresse oxidativo celular (Luersen *et alii*, 2000; Repetto *et alii*, 1996; Romao *et alii*, 1999). Nesse sentido, a glutationa sintetase de *T. cruzi* (GSTc) foi escolhida para o estudo no intuito de se verificar a sua participação como possível fator de virulência do parasito.

A GSTc (Tc00.1047053508865.10) apresenta fase aberta de leitura com 1608 pb que codifica uma proteína com 535 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 58,6 kDa. Teoricamente não apresenta peptídeo sinal, domínio transmembrânico, mas assim como esperado, o domínio de ligação do ATP está presente (GeneDB, 2009). Dessa forma, estudar essa proteína pode contribuir para um melhor conhecimento do mecanismo que garante ambiente redutor ao parasito.

Dentre as várias proteínas relevantes na biologia da doença de Chagas, a oligopeptidase B-símile (OPBsTc), a X-prolil dipeptidil aminopeptidase (X-PDAPTc) e a glutationa sintetase (GSTc) de *T. cruzi* foram escolhidas para este estudo na perspectiva de validá-las futuramente como alvos terapêuticos.

Outro aspecto relevante e que justifica a escolha dessas proteínas consiste na constatação por análises em bancos de dados que a X-PDAP e a OPBsTc não apresentam ortólogos em mamífero e que a GSTc não possui homologia significativa com a GS de humanos, tornando-se o estudo ainda mais

promissor para o desenvolvimento futuro de fármacos com elevada especificidade e efeitos colaterais reduzidos, o que seria extremamente desejado pelo meio científico, uma vez que existem ainda na atualidade, milhões de pacientes chagásicos que necessitam de atenção médica e tratamento específico (Lauria-Pires *et alii*, 2000; Brener *et alii*, 2000).

OBJETIVOS

A motivação de nossa proposta de trabalho tem por base o fato de que o avanço do conhecimento de mecanismos moleculares da biologia da interface patógeno-hospedeiro tem revelado fatores de virulência que podem ser explorados como alvos para o desenvolvimento de drogas para tratamento de doenças infecciosas. A caracterização molecular e funcional de fatores de virulência em *T. cruzi* envolvidos na infecção e sobrevivência no hospedeiro poderá revelar caminhos para a concepção racional de fármacos eficazes para o tratamento da doença de Chagas, grave problema de saúde pública.

O conhecimento científico, incluindo nossos dados, e a disponibilidade de tecnologias adequadas nos permitem propor o seguinte objetivo:

Caracterização molecular das enzimas oligopeptidase B-símile, X-prolil dipeptidil aminopeptidase e glutationa sintetase de *T. cruzi.*

Para realização deste objetivo, desenvolvemos as seguintes atividades:

1. Clonagem dos genes das enzimas em vetores de expressão heteróloga;
2. Purificação das respectivas enzimas recombinantes expressas em sistema heterólogo;
3. Produção de anticorpos específicos para cada proteína em camundongos;
4. Caracterização da expressão das proteínas nativas por meio de reações imunes;
5. Verificação da expressão dos genes em nível transcricional.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Análises de bioinformática

As análises de bioinformática foram realizadas através de buscas nos bancos de dados GeneDB (www.genedb.org), NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e MEROPS (http://merops.sanger.ac.uk/) para obtenção das sequências gênicas e protéicas da oligopeptidase B símile (Tc00.1047053505939.20; *opbstc*), da X-prolil dipeptidil aminopeptidase (Tc00.1047053508699.120; *xpdaptc*) e da glutationa sintetase (Tc00.1047053508865.10; *gstc*). As sequências de aminoácidos obtidas foram alinhadas com o auxílio dos programas BLAST e ClustalW.

2. Cultivo e obtenção de *Trypanosoma cruzi.*

Os epimastigotas foram cultivados no laboratório em meio Liver Infusion Tryptone (LIT) suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino inativado e gentamicina 100µg/mL em estufa a 28 ^{o}C. As formas tripomastigotas e amastigotas de cultura de células utilizadas nos ensaios de imunofluorescência foram cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. César Martins de Sá do laboratório de Microbiologia da Universidade de Brasília.

3. Extração de ácidos nucléicos de *Trypanosoma cruzi*

As culturas de *T. cruzi* epimastigotas da cepa CL- Brener foram utilizadas para extração do DNA genômico e do RNA total, de acordo com procedimentos adaptados de Blin e Stafford (1976) e conforme o protocolo do TRIzol (Invitrogen). O material foi aliquotado e armazenado no -20 ^{o}C para DNA e no -80 ^{o}C para RNA até o momento da utilização.

4. Amplificação inicial dos genes *opbstc, xpdaptc* e *gstc*

Inicialmente foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso para cada um dos genes em estudo (*opbstc, xpdaptc* e *gstc)* a partir de suas sequências de nucleotídeos depositadas em bancos de dados. Em relação ao gene *opbstc* foram inseridos os sitíos de restrição das enzimas XhoI no senso (5'-ATTCTA<u>CTCGAG</u>ATGGCCGCATTGTACCCGTG-3') e BamHI no anti-senso (5'-ATTCTA<u>GGATCC</u>CTATTTCTTGACTTTTTCTTTCC-3'). Para o gene *xpdaptc* tanto o iniciador senso (5'-ATTCTA<u>CATATG</u>CAGAAGGTTGTTGTCTCC-3') quanto o anti-senso (5'ATTCTA<u>CATATG</u>TCACATCCCTTCACGGTACAC-3') foram desenhados com a inserção do

sítio de restrição da enzima NdeI. Já para a clonagem do gene *gstc* foram desenhados dois pares de iniciadores. O primeiro com o sítio de BamHI no senso (5'-GGATCCATGGAACTCTTGGGGGACGC-3') e com sítio de XhoI anti-senso (5'-CTCGAGTTAAACAAGCGCCAGTGAATCGAGG-3'); o segundo com NdeI no iniciador senso (5'-CATATGGAACTCTTGGGGGACGC-3') e XhoI no anti-senso (5'-CTCGAGTTAAACAAGCGCCAGTGAAT-3'). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Prodimol.

Cada par de iniciadores foi utilizado separadamente em reações de polimerização em cadeia (PCR), contendo ainda DNA genômico molde 1 ng/µL, tampão da enzima 1X, dNTP 0,2 mM, 1,5 mM de $MgCl_2$ ou $MgSO_4$, dependendo da enzima utilizada e 1U de DNA polimerase (Taq DNA polymerase, Pfx DNA polimerase high fidelity ou Thermozyme DNA polimerase da Invitrogen).

O ciclo consistiu na desnaturação 94 ^oC por 2 min, seguida de anelamento dos oligos por 30 s a 56 ^oC para *opbstc* e *xpdaptc* e a 62 ^oC para *gstc.* Posteriormente a polimerização e extensão foram executadas a 72 ^oC ou 68 ^oC por 3 min, de acordo com as especificações da enzima utilizada. Foi realizado um total de 30 ciclos por reação e uma etapa final de extensão de 5 min. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de Agarose e o tamanho das bandas estimado com auxílio de marcador.

5. Eletroforese em gel de Agarose

As amostras resultantes da extração de DNA genômico, das reações de PCRs e das digestões com enzimas de restrição foram aplicadas em géis de Agarose a 0,7 ou 0,8% corados com brometo de etídeo 1µg/mL ou 0,1µg/mL. Utilizou-se o sistema de eletroforese horizontal na presença do tampão Tris-acetato 1X (TAE 1X; Tris 17,8 mM, Na_2EDTA 1 mM, pH8,0 e ácido acético 0,1%), sob voltagem constante entre 60 V e 100 V. As amostras, antes de serem aplicadas, foram dissolvidas em tampão de amostra 1X (Azul de Bromofenol 25%, Xileno Cianol 25%, Tris 50 mM pH 7,6 e glicerol 6%). O marcador 1Kb DNA ladder (500 pb até 12 Kb) da Invitrogen foi utilizado como padrão.

6. Clonagem e subclonagem dos genes *opbstc, xpdaptc* e *gstc.*

6.1. Ligação dos insertos nos vetores de clonagem

Após a verificação da amplificação inicial dos insertos no tamanho desejado, iniciou-se o processo de ligação desses insertos em seus respectivos vetores de clonagem, no objetivo de se obter o vetor recombinante. Para a ligação dos insertos *opbstc* e *gstc* foi utilizado o vetor de clonagem pCR2.1(Invitrogen) e para o *xpdaptc,* o vetor pGEM-T (Promega). Nas reações de ligação utilizou-se 80-100ng de inserto, 50ng do vetor de clonagem, 1U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e o tampão da enzima 1X. Na presença de todos os componentes para a reação incubou-se à 14 ^{o}C por 16 h.

Após o período estabelecido de incubação, metade do volume de ligação foi adicionada a 100 µL de *E. coli* da linhagem JM109 ou DH5α. Aguardou-se um intervalo de 30 min e o material foi incubado em banho-maria a 42 ^{o}C por 1 min, seguido de banho de gelo por 2 min. Posteriormente adicionou-se 800 µL de meio Luria-Bertani (LB) e o tubo permaneceu por 45 min no agitador a 200 rpm e 37 ^{o}C. Decorrido o tempo previsto, a amostra foi plaqueada em meio LB com ágar (LB-ágar) contendo ampicilina 100 µg/mL como antibiótico de seleção, X-Gal 80 µg/mL e IPTG 0,5 mM. As placas foram incubadas a 37 ^{o}C por 16 h. As colônias brancas resultantes desse experimento foram submetidas à triagem por PCR de colônia ou à extração do DNA plasmidial para realização de análises de restrição enzimática.

6.2. Subclonagem nos vetores de expressão

Após a confirmação da clonagem no vetor inicial, os genes foram extraídos do vetor de clonagem por digestão enzimática utilizando as enzimas de restrição específicas (Quadro 1) e posteriormente subclonados nos respectivos plasmídeos de expressão: pET19b (Novagen) para o *opbstc* e *xpdaptc* e pET28a+ (Novagen) ou pGEX4-T-3 (GE) para o *gstc.* A ligação do *opbstc* ou *xpdaptc* no pET19b foi realizada a 4 ^{o}C e 14 ^{o}C na proporção molar de 1:1 ou 1:3 de vetor: inserto, por 16h. Já a ligação do *gstc* no pET28a+ foi a 16 ^{o}C na proporção de 1:3 por 16 h e do *gstc* no pGEX4-T-3 foi realizada a 16 ^{o}C na proporção de 1:3 por 3 h. Após decorrido o tempo estabelecido, 50% da ligação foi utilizada para transformar bactéria como descrito acima. Em seguida os vetores recombinantes pET19b-*opbstc*, pET19b-*xpdaptc*, pET28a^{+}-*gstc* e pGEX4-T-3-*gstc* foram introduzidos por meio de choque térmico em outras cepas de *E. coli* para futura expressão heteróloga das proteínas.

7. Análises de restrição enzimática

Durante as fases de triagem da clonagem e preparação para a subclonagem dos insertos foram realizadas análises de digestão enzimática. Para os procedimentos de triagem, as colônias obtidas

inicialmente foram colocadas em contato com meio LB e com o antibiótico de seleção estabelecido pelo fabricante (Quadro1). Esse inóculo foi incubado sob agitação por 16 h a 37 ^{o}C e 200 rpm e, em seguida, foi realizada a extração do DNA plasmidial utilizando-se o kit de midprep *HiPure Plasmid DNA Purification* da Invitrogen. Esse material foi então submetido à digestão enzimática simples ou dupla a 37 ^{o}C por 3 h em média, utilizando as enzimas especificadas no Quadro 1. Os resultados obtidos nas digestões foram analisados por eletroforese em gel Agarose 0,8%.

Inserto	Vetor plasmidial	Antibiótico de seleção (100 µg/mL)	Enzimas de restrição
opbstc	pCR2.1	Ampicilina	XhoI e BamHI (Inv)
	pET19b		
xpdaptc	pCR2.1	Ampicilina	NdeI (Ferm e Inv)
	pET19b		
gstc	pCR2.1	Ampicilina	NdeI e XhoI (Inv)
	pET28a^{+}	Kanamicina	
	pCR2.1	Ampicilina	BamHI e XhoI (Inv)
	pGEX4-T-3		

Quadro 1. Parâmetros para clonagem e subclonagem dos insertos. Inv – Invitrogen; Ferm – Fermentas.

Já em relação à preparação dos insertos para subclonagem nos vetores de expressão, grande quantidade do DNA plasmidial extraído das colônias e digerido pelas enzimas de restrição específicas foram aplicados em géis de Agarose 0,8% mais extensos contendo concentração reduzida de brometo de etídeo (0,1µg/mL). Além disso, os vetores de expressão vazios que seriam utilizados nas ligações futuras também foram submetidos à mesma digestão enzimática com as enzimas correspondentes, bem como à eletroforese descrita anteriormente. Portanto, as bandas específicas correspondente aos insertos ou aos vetores de expressão vazios foram excisadas do gel e em seguida purificadas utilizando-se o kit de purificação *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* da GE Healthcare. À partir desse momento, o material estava preparado para ser utilizado nas reações de ligação dos insertos nos respectivos vetores de expressão e nas condições estabelecidas de temperatura, concentração molar e tempo. O pET19b digerido apenas com NdeI e o inserto *xpdaptc* purificado, antes de serem utilizados na ligação

foram defosforilados com 1U da fosfatase alcalina de camarão (Usb) e o tampão da enzima 1X. Essa reação foi realizada a 37 ^{o}C no banho-maria por 30 min e a enzima inativada em seguida a 85 ^{o}C por 15 min.

8. PCR de colônia

No intuito de confirmar a presença do gene nos prováveis clones obtidos após as transformações bacterianas, foram realizadas PCRs de colônias, cuja diferença em relação à PCR original consiste na utilização direta do DNA das colônias como molde ao invés de DNA extraído previamente.

A técnica consiste em palitar a colônia escolhida em água milli-Q ultra pura e lisá-las com Triton X-100 1% e aquecimento por 5 min a 95 ^{o}C. Posteriormente procede-se à realização da PCR normalmente utilizando 0,2 mM dos iniciadores específicos dos genes de interesse ou iniciadores controle (T7 terminador), tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTP, 1,5mM de $MgCl_2$ e 1U da Taq DNA polymerase (Invitrogen). O ciclo foi realizado de acordo com os procedimentos explicitados anteriormente e os resultados foram analisados por eletroforese em gel de Agarose 0,8%.

9. Expressão heteróloga das proteínas recombinantes

E. coli BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen), foi transformada com vetores recombinantes pET19b-*opbstc*, pET19b-*xpdaptc* e pET28a^{+}- *gstc* e os correspondentes vetores vazios e plaqueadas em meio LB-ágar com antibiótico de seleção (Quadro 1). *E. coli* C43 (DE3) foi empregada como hospedeira do vetor pGEX4-T-3-*gstc* e do vetor vazio pGEX4-T-3. As placas ficaram em estufa a 37 ^{o}C por 16 h e foram escolhidas algumas colônias para os experimentos de indução. Essas colônias selecionadas foram colocadas em tubos separados contendo meio LB e ampicilina ou kanamicina (100 µg/ml) e incubadas a 37 ^{o}C e 200 rpm até uma densidade óptica (OD_{600}) próxima a 0,7. À partir desse momento à cada tubo foi adicionado isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) em concentrações variando de 0,125 mM até 2 mM, em temperaturas de 18 ^{o}C a 37 ^{o}C, 200 rpm de rotação por até 16 h, no intuito de se estabelecer o melhor protocolo de indução. As amostras induzidas foram lisadas por Bug Buster (Novagen) ou por sonicação no gelo por 3 min com intervalos de 1 min, amplitude entre 40 e 50 e pulso 7 por 3 vezes e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras (SDS-PAGE).

10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Após a lise bacteriana realizadas por SDS 10% e fervura, por Bug Buster ou por sonicação, as amostras foram centrifugadas a 13000 g durante 10 min e separadas em fração solúvel e insolúvel. A fração insolúvel foi ressuspendida em água milli-Q em quantidade igual ao volume obtido da fração solúvel para permitir análise quantitativa das proteínas entre as duas frações. Em seguida realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida (acrilamida 29,2% e N'N'-bis-metileno-acrilamida 0,8%) sob condições desnaturantes e redutoras, na presença de SDS e β-mercaptoetanol, conforme método descrito originalmente por Laemmli (1970). Utilizou-se o sistema de eletroforese vertical, contendo o gel concentrador a 3,9% e o separador em concentrações de 8%, 10% e 12% de acordo com a massa molecular da proteína recombinante de interesse. Foram utilizados 20µL de cada fração acrescidos de 5µL de tampão de amostra 5X contendo Tris-HCl 250 mM pH6,8, SDS 10% (p/v), Glicerol 30% (v/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,04% (p/v). Essas frações foram fervidas por 5 min e aplicadas no gel. No sistema utilizou-se tampão de corrida com SDS 0,1%, Tris 25mM, Glicina 191mM e água destilada e voltagem constante de 80 V e 120 V. Como padrões moleculares foram utilizados os marcadores BenchMark Protein Ladder da Invitrogen e o marcador pré-corado Precision Plus Dual Color da BioRad. A visualização das bandas protéicas foi realizada por coloração com azul de Coomassie.

11. Purificação das proteínas recombinantes.

As proteínas rOPBsTc, rX-PDAPTc e rGSTc foram purificadas de corpos de inclusão por cromatografia de afinidade em coluna com resina *His-Bind* da Novagen, conforme instrução do fabricante . A solubilização de rOPBsTc foi realizada com guanidina-HCl 6 M e para rX-PDAPTc e rGSTc, com uréia 6 M. Esses compostos foram incorporados aos tampões de ligação, lavagem e eluição das proteínas da coluna de purificação.

Em relação à rOPBsTc, o protocolo de purificação desenvolvido no laboratório foi realizado em duas etapas. Inicialmente, 200 mL de cultura induzida foi centrifugada e o precipitado lisado com Bug Buster, homogeneizado e centrifugado por 10 min a 13000 g. O corpo de inclusão foi submetido a três lavagens sucessivas em 10 mL de solução Bug Buster:água destilada (1:10) seguidas de outras duas lavagens, 40 mL cada, com Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Em seguida o precipitado final foi ressuspendido em tampão de ligação 1 (NaCl 500 mM, guanidina-HCl 6 M e Tris-HCl 20 mM, pH 7,9) com imidazol

5 mM, homogeneizado vigorosamente e incubado no gelo por 2 h. Centrifugou-se o material e recuperou-se o sobrenadante que foi aplicado à coluna preparada conforme instrução do fabricante. A amostra foi aplicada à coluna e em seguida foram realizadas as lavagens com dez volumes de tampão de ligação 1 e dez volumes de tampão de ligação 1 contendo imidazol 60 mM. A proteína rOPBsTc ligada à coluna foi eluída no mesmo tampão contendo imidazol 500 mM, e armazenada a -20 ^{o}C até sua utilização.

A purificação da rX-PDAPTc e da rGSTc iniciou-se com a centrifugação separadamente de 200 mL de cultura a 13000 g por 10 min. A preparação do corpo de inclusão iniciou-se com sua ressuspensão em tampão de ligação 2 (NaCl 500 mM e Tris-HCl 20 mM pH7,9) com imidazol 5 mM seguida por sonicação no gelo durante 3 min com intervalos de 1 min, amplitude entre 40 e 50 e pulso 7, por 3 vezes. Este processo foi repetido três vezes. Após centrifugação, o precipitado foi ressuspendido no mesmo tampão contendo uréia 6 M e incubado no gelo por 1 h. Posteriormente foi submetido a centrifugação e cada sobrenadante foi coletado e aplicado às colunas previamente carregadas e calibradas de acordo com os procedimentos anteriores. Após lavagens no tampão 2 com uréia 6 M e imidazol 60 mM, rX-PDAPTc e rGSTc foram eluídas com concentrações crescentes de imidazol.

12. Precipitação da rOPBsTc

A proteína rOPBsTc foi precipitada, utilizando-se a mesma quantidade de amostra, em três protocolos, de acordo com procedimentos adaptados do Lab FAQs (Merck). O primeiro procedimento consistiu na adição do mesmo volume de TCA 100% à amostra, homogeneização por vórtex, incubação a -20 ^{o}C por 20 min seguida por centrifugação a 15000 g por 5 min. O sobrenadante foi removido, o precipitado lavado com solução de etanol:éter (1:1) ressuspendido em água destilada. Na precipitação com acetona, cinco volumes de acetona gelada (-20 ^{o}C) foram adicionados à amostra, homogeneizado por vórtex, incubada no -20 ^{o}C por 30 min e posteriormente centrifugada por 5 min a 15000 g. O sobrenadante foi descartado e após a secagem do precipitado, o mesmo foi ressuspendido em água destilada. No último experimento de precipitação, 3:1 (v/v) de metanol e clorofórmio foram adicionados à amostra sob agitação em vórtex. Adicionaram-se três volumes de água destilada e a amostra foi submetida a vórtex por mais 1 min. Em seguida, a amostra foi centrifugada nas condições acima e a fase superior descartada. O precipitado foi lavado com metanol, submetido à secagem e

ressuspendido em água. Os resultados obtidos em todos os procedimentos de precipitação foram verificados por SDS-PAGE 8%.

13. Imunização, obtenção de anticorpos policlonais e imunodetecção.

Para os experimentos de imunização foram selecionados, por proteína recombinante, cinco camundongos machos Balb/C com dois meses de idade que foram mantidos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Após retirada de sangue para recuperação dos soros pré-imunes, os camundongos foram imunizados com rOPBsTc, rX-PDAPTc ou rGSTc purificadas. A banda de gel SDS-PAGE corresponde à rGSTc-GST foi extraída, macerada e homogeneizada em PBS 1X. As imunizações foram realizadas em três etapas. Na primeira, cada camundongo recebeu uma dose contendo 5 µg da proteína recombinante na presença de adjuvante completo de Freund na proporção de 1:1. Após quinze dias, os camundongos receberam uma nova dose consistindo de 5 µg da proteína recombinante e adjuvante incompleto de Freund na proporção de 1:1. Aguardou-se 15 dias para realizar a última imunização que consistiu em 5 µg de proteína dissolvida em PBS 1X. Após 5 dias, o sangue dos camundongos imunizados foram retirados e os soro separados, diluídos em glicerol 1:1 (v/v) e estocado a -20 ^{o}C.

No intuito de se caracterizar os anticorpos anti-rOPBsTc e anti-rX-PDAPTc, foram preparados extratos totais bacterianos e de *T. cruzi* epimastigotas. O extrato bacteriano foi lisado utilizando-se Bug Buster e o extrato de *T.* cruzi foi preparado por lise com SDS 10% e fervura, contendo uma concentração final de 10^7 parasitos por poço do gel. Os extratos totais foram aplicados no gel de poliacrilamida 8 ou 10% e após a corrida, as proteínas foram transferidas eletroforeticamente para membrana de nitrocelulose. Após incubação com PBS-leite 5%, as membranas foram incubadas com os soros pré-imunes ou imune extraídos na diluição 1:200 ou 1:100 a temperatura ambiente, por 3 h em PBS-leite 1%. Após lavagem, as membranas foram incubadas com o segundo anticorpo GAM-AP (Goat Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase Conjugate da Novagen) por 1 h a temperatura ambiente. As bandas foram reveladas utilizando-se NBT/BCIP em tampão da fosfatase alcalina e a reação foi interrompida por lavagens com água destilada. As massas moleculares relativas das proteínas foram estimadas com o auxílio do marcador utilizado.

14. Imunofluorescência e citolocalização da rOPBsTc

As lâminas e lamínulas utilizadas foram previamente lavadas com água milli-Q ultra pura e depois com etanol 70%. As lamínulas foram carregadas utilizando-se uma solução de poli-Lisina para permitir a adesão do parasito e após a secagem em temperatura ambiente iniciou-se a sua preparação. Foram utilizadas culturas de epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas contendo 10^6 parasitos/lamínula determinados por contagem em câmara de Neubauer. Essas culturas foram submetidas à centrifugação por 4000 g durante 10 min, seguida de três lavagens sucessivas com PBS 1X filtrado em membrana de 0,22 µm. Posteriormente, as lamínulas previamente carregadas foram transferidas para placas de 24 poços e iniciou-se a incubação com os parasitos por 30 min a temperatura ambiente e em câmara úmida. Em seguida as lamínulas foram lavadas com PBS 1X filtrado por 3 vezes de 2 min cada, sob agitação. Os parasitos fixados nas lamínulas com formaldeído 3,7% foram permeabilizados com Triton X 100 0,1 % por 10 min a temperatura ambiente em câmara úmida e depois lavados com PBS 1X filtrado por 5 vezes de 2 min cada. Após incubação em PBS-leite 5%, as lamínulas contendo os parasitos fixados e permeabilizados foram incubadas com o soro pré-imune ou imune de interesse, diluídos em PBS 1X filtrado (1:100). Essa incubação permaneceu por 2 h a temperatura ambiente e em câmara úmida. Depois, as lamínulas foram lavadas 3 vezes de 2 min cada com PBS 1X filtrado e incubadas por 2 h com o segundo anticorpo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) diluído em PBS 1X filtrado (1:200) a temperatura ambiente em câmara úmida protegida da luz. Após o período de incubação as lamínulas foram lavadas com PBS 1X filtrado e incubadas com 4, 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) diluído em PBS 1X filtrado (1:1000) por 20 min. As lamínulas foram montadas nas lâminas contendo FluoroGuard antifade (BioRad) e armazenadas a 4 ^{o}C protegidas da luz. Para análise dos resultados foram utilizados o microscópio de fluorescência e o microscópio confocal.

15. RT-PCR

A reação de síntese do cDNA foi realizada em um tubo contendo 3 µL de RNA total, 1,0 µL do oligonucleotídeo T7 e 13,75 µL de água DEPC; os reagentes foram homogeneizados cuidadosamente, e os tubos incubados a 70 ^{o}C no banho-maria por 5 min e depois no gelo por 1 min. Após rápida centrifugação, adicionou-se 1,25 µL de dNTP, 5 µL de tampão 5X da enzima e 1 µL da trancriptase reversa M-MLV (Promega) e o tubo foi incubado a 37 ^{o}C por 1 h. O cDNA ficou armazenado a -20 ^{o}C.

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se 2 µL ou 4 µL do cDNA sintetizado anteriormente como molde e com os mesmos iniciadores específicos para o gene de interesse das PCRs iniciais ou iniciadores controle. Os reagentes e as condições foram iguais ao explicitado no ítem 4 para a amplificação dos genes *opbstc* e *xpdaptc*. Os produtos resultantes das reações de PCR foram aplicados em géis de Agarose 0,8% e o tamanho das bandas foi estimado de acordo com o marcador utilizado.

RESULTADOS

1. Não há homólogos de OPBsTc e X-PDAPTc em mamíferos

Análises do genoma do *T. cruzi* no banco de dados www.genedb.org revelou a existência de gene codificador para oligopeptidase B símile (OPBsTc), X-prolil dipeptidil aminopeptidase (X-PDAPTc) e glutationa sintetase (GSTc) (Tc00.1047053505939.20, Tc00.1047053508699.120 e Tc00.1047053508865.10 respectivamente). Os três genes parecem estar presentes em cópia única por genoma haplóide do parasito. Para saber sobre a existência de homólogos e o grau de identidades entre os mesmos, fez-se uma análise genética *in silico* a partir de informações presentes em bancos de dados. As sequências pertinentes foram comparadas por meio do programa BLAST e ClustalW. Os resultados obtidos mostram ausência de ortólogos de OPBsTc e X-PDAPTc em mamíferos; não há identidade significativa entre a GSTc e seu ortólogo humano, gene NM_0001178.2. Por outro lado, há alta identidade de sequencia entre os cinetoplastídeos.

A OPBs é conservada nos cinetoplastídeos *T. brucei, L. braziliensis, L. infantum* e *L. major,* incluindo a região próxima à tríade catalítica formada por serina, ácido aspártico e histidina (Fig. 5). A tabela 1 mostra que há pelo menos 74% e 86% de identidade e de similaridade, respectivamente, entre essas enzimas.

```
OPBsTc   MAALYPWVPASNVAYTLCRYFLNRFAPHARNICPLPFLDGPLPDEVPESLLLCGERTQSDPFKYMEDLFD 70
OPBsTb   MTALYPWVPTSNAMYAFGRRLVNRFFPQVRNVYPLTFLDGPLPEEVPQSFLLHGRNDQPDPFKYMEDLFD 70
OPBsLm   MAALFPWVPTSNLGYSLSRRAVNKWCPQLRTSYPLPMLDGPLPTEKPEGLELHGETQKPDPFRYMEDLFD 70
OPBsLi   MAALFPWVPTSNLGYSLSRRVVNKWCPQLRSSYPLPMLDGPLPTEKPEGLELHGETQKPDPFRYMEDLFD 70
OPBsLb   MAALFPWVPASNLGYSLSRKAVNKWCPQLRNSYPLPMLDGPLPTEKPEGLELHGEAQKPDPFRYMEDLFD 70
OPBsLa   MAALFPWVPTSNLGYSLSRRLVNKWCPQLRSSYPLPMLDGPLPIEKPEGLEIHAETQKPDPFRYMEDLFD 70

OPBsTc   RRTQSYVRSEQHHYAFIDSKFDFKHTKARLWAELDSKVVVTSREGGFDKGEERIGDFVYFTRVVPGGDSN 140
OPBsTb   RRTQSYVRQEQRHFTLVDSKFDFKHNKARLWAELDAKVVITSREGGFDKGEERIGDYIYFTRVVPGGDPN 140
OPBsLm   RNTQEYTKKEMQHFSLISSKFDFRHSKGRLWAELDAKVVVSSREGGYDKGEERIGDYVYFTRVVPGHDSN 140
OPBsLi   RNTQEYTKKEMQHFSLISSKFDFRHSKGRLWAELDAKVVVSSREGGYDKGEERIGDYVYFTRVVPGHDSN 140
OPBsLb   RNTQEYAKKEMQHFSLISSKFDFRHSKGRLWAELDAKVVVSSREGGYDKGEERIGDYVYFTRVVPGHDSN 140
OPBsLa   RNTQDYTKKEMQHFSLISSKFDFRHSKGRLWAELDAKVVVSNREGGYDKGEERIGDYVYFTRVVPGNDSN 140

OPBsTc   AIGFYRKRYGQVDLLAEELINPTSLQQHFGYEKCHVGICRVSDDGRYVAYTLSVEGGDRYICHVRSIDNA 210
OPBsTb   AIGFYRKRFGEVDLLAEELINPSALQQHFGYAHCNVGVCRVSQDGKYLAYTLSVGGGDRYICHVRSIDNA 210
OPBsLm   AIGFYRKRFGEVDLLAEELINPLFLQQHFGYKDCSIGICRVSEDGRYLAYTLSVEGGDRYLCHIRSVDNA 210
OPBsLi   AIGFYRKRFGEVDLLAEELINPLFLQQHFGYKDCSIGICRVSEDGRYLAYTLSVEGGDRYLCHIRSVDNA 210
OPBsLb   ATGFYRKRFGEVDLLAEELINPLLLQQHFGYKDCSIGVCRVSDDGRYLAYTLSVEGGDRYLCHIRSIDNA 210
OPBsLa   AIGFYRKRFGEVDLLAEELINPLSLQQHFGYKDCSIGVCRVSEDARYLAYTLSVEGGDRYLCHIRSVDNA 210

OPBsTc   SLFHVIRGRNIVSIEFGSGDYFYFTESNDLNRPYTVIMQQIRPGILPPPVELYREDDEQFFVDVHKTKDN 280
OPBsTb   SLFHVIRGRNIVSIEFGSDNQFYFTESNELNRPNAVIMQEIRPGVLPPPVELYRDDDEQFFVDVRKTKDN 280
OPBsLm   TLFHVIRGTNIVSIEFGSGNQFFYTESNELNRPHRVMMQEIRPGILEPPVEIYRDDDEQFFVDVRKTKDN 280
```

```
OPBsLi   TLFHVIRGTNIVSIEFGSGNQFFYTESNELNRPHRVMMQEIRPGILEPPVEIYRDDDEQFFVDVRKTKDN 280
OPBsLb   SLFHVIRGTNIVSIEFGSGSQFFYTESNELNRPHRVMMQEIRPGILEPPVEIYRDEDEQFFVDVRKTKDN 280
OPBsLa   SLFHVIRGTNIVSIEFGSGNQFFYTESNELNRPHRVMMQEIRPGILEPPVEIYRDDDEQFFVDVRKTKDN 280

OPBsTc   AYIIITSDSKLKSSALVLPASFPKVSRELQAFFRDGRPVEIAGKENWNWLEHYDGHFIMVVADQGPNHRV 350
OPBsTb   AYIVITSDSKVKCSALVLPASFPKIPREMQAFFPDARPVEIAGKGSWNWLEHYMGHFLMVVGDRGPNHRV 350
OPBsLm   KYVTITSDSKVNCNALVVPASFPAIPTPLKSFFKEGKPLEIAGKSGWNWLDHYNGNFVMVTSDKGPNYRV 350
OPBsLi   KYVTITSDSKVNCNALVVPASFPVIPTPLKSFFKEGKPLEIAGKSGWNWLDHYNGSFVMVTSDKGPNYRV 350
OPBsLb   RFVTITSDSKVNGNALVVPASFPIIPTPLKSFFKEGKPVEIAGKSGWNWLEHYNGNFLMVTSDKGPNYRV 350
OPBsLa   KYVTITSDSKVNGNALVVPASFPLIPTPLKSFFKEGKPVEIAGKSGWNWLDHYNGNFVMVTSDKGPNYRV 350

OPBsTc   VYAREEVVLKHGMRAEWKELVPYRDDVQIVDMDLFQGRIVLYEVHFAFERINHIHIIKCDKGLDDAARQA 420
OPBsTb   VYAREEVVLKYGMDAEWKELVPHRDDVQIVDIDLFHDHIVLYESHFAFERINHIRIIKCGKGIDDTARRS 420
OPBsLm   VYIRDEVALAYGKEAEWKELVPHRDNVQIDDVDLFHGRIILHESHFAFERIQHIRVIKCDGGLDAAAQTP 420
OPBsLi   VYIRDEVALAYGKEAEWKELVPHRDNVQIDDVDLFHGRIILHESHFAFERIQHIRVIKCDGGLDAAAQTP 420
OPBsLb   VYIRDEVALAYGKEAEWKELVPHRNDVQISDVDLFQGRIILYESHFAFERIQHIRVIRCDGGLDAAAQTP 420
OPBsLa   VYIRDEVALAYGKEAEWKELVPHRDNVQIDDVDLFHGRIILHESHVAFERIQHIRIIKCDGGLDTAAQTP 420

OPBsTc   RKDDLVLHFPPLTSVTPGLNKNFNQDSMSFVYSSICQPSRDCVFSFDSKMTAEKSWVCSSESLFTQHQSE 490
OPBsTb   RADDLVIHFPPLACVTPGLNKNFDQDSISFVYSSLCQPSKDCVFNFNSEMTSGKCRMCSPEAIFTQRQSE 490
OPBsLm   RSEDVVLHFPPLSTVTPGLNKNFRQKAMSFVYSSLIQPPRDCVFNFDSDITSSQARLCASEALFTQRQSE 490
OPBsLi   RSEDVVLHFPPLSTVTPGLNKNFRQKAMSFVYSSLIQPPRDCVFNFDSDITPSQARLCASEALFTQRQSE 490
OPBsLb   RIEDVVLHFPQLTTVTPGLNKNFGQEAMSFVYSSLIQPPRDCVFNFSSDITSTQARLCTSEALFTQRQSE 490
OPBsLa   RSEDVVLHFPPLSTVTPGLNKNFRQKAMSFIYSSLIQPPRDCVFNFDSDITSSQARLCASEALFTQRQSE 490

OPBsTc   QLTPWDYMWPYSIYRDLCLSPDGTQIPITICHRRDAFVQEATDFEAQPNTPKHCLIYVYGSYGEVPSMHF 560
OPBsTb   QFTPWDYMWPYTIYRDVCVSKDGTQVPITICHRRDAFVQEATDFEAQPNTPKHCFIYVYGSYGEVPSMHF 560
OPBsLm   HFTPWDYMWPYSIYRDVCVSEDGTEIPITICQRRDAFIQEATDFEAQPNTPKHCLIYVYGSYGEVPSMHF 560
OPBsLi   HFTPWDYMWPYSIYRDVCVSEDGTEIPITICQRRDAFIQEATDFEAQPNTPKHCLIYVYGSYGEVPSMHF 560
OPBsLb   HFTPWDYMWPYSIYRDVCVSEDGTEIPITICQRRDAFIQEATDFEAQPNTPKHCLIYVYGSYGEVPSMHF 560
OPBsLa   HFTPWDYMWPYSIYRDVCVSEDGTEIPITICQRRDAFIQEATDFEAQPNTPKPCLIYVYGSYGEVPSMHF 560

OPBsTc   QLAPYMWMLRRRWTVVFAHVRGGGELPNWGEQGKGKNKINAVHDFIACCEHMIKMGYTKPELMVAAGNSA 630
OPBsTb   QLAPYMWMLRRRWTVAFAHVRGGGELPNWAEQGRGEKKINAVHDFIACCEHMVNMGYTKPELMVAAGNSA 630
OPBsLm   QLAPYMWMLRRRWTVAFAHVRGGGELPNWAQLGKGENKIKSIQDFIACCEHMVDMGYTKPELMVAAGASA 630
OPBsLi   QLAPYMWMLRRRWTVAFAHVRGGGELPNWAQLGKGENKIKSIQDFIACCEHMVDMGYTKPELMVAAGASA 630
OPBsLb   QLAPYIWMLRRRWTVAFAHVRGGGELPNWAQLGKGENKIKCIKDFIACCEHMVDMGYTKPELMVAAGASA 630
OPBsLa   QLAPYMWMLRRRWTVAFAHVRGGGELPNWAQLGKGENKIKSIQDFIACCEHMVDMGYTKPELMVAAGASA 630

OPBsTc   GCVPIAAAMNMRGCGLFGNALLRSPFLDIINTMIDPDLPLSLAERDDWGDPLHNAEDYARLTQYDPYLNI 700
OPBsTb   GCVPIAAAMNMRGCGLFGNVLMRSPFLDVISTMVDPDLPLSLAEQDDWGDPLNSPKDYTRLLHYDPYHNI 700
OPBsLm   GCVPIAAAMNMRGCGLFGNVLMRSPFLDIINTMIDSNLPLSIAEREDWGDPLNNKRDLDLLKQYDPYYNL 700
OPBsLi   GCVPIAAAMNMRGCGLFGNVLMRSPFLDIINTMIDPDLPLSLAEREDWGDPLNNKRDLDLLKQYDPYYNL 700
OPBsLb   GCVPIAAAMNMRGCGLFGNALMRSPFLDIINTMIDPDLPLSLAEREDWGDPLNNKRDLDLLKQYDPYYNV 700
OPBsLa   GCVPIAAAMNMRGCGLFGNVLMRAPFLDIINTMIDPDLPLSLAEREDWGDPLNNKRDLDLLKQYDPYYNV 700

OPBsTc   NDRVTYPGMMISTCLDDDRVPPWNTLKYVAKLRQQRRRKGTDPVARPLVLRVRSSGGHYCWGDTENICEE 770
OPBsTb   NDRVTYPGMMVSVCLDDDRVPPWNSLKYVAKLRQQRRRKGVDPVEKPLILRVRSSGGHYIWNDTENLCEE 770
OPBsLm   NDRVTYPGMMISACLDDDRVPAWNALKYVAKLRQQRTRKDVDPVARPLVLRMRPSGGHYFWGDTENICEE 770
OPBsLi   NDRVTYPGMMISACLDDDRVPAWNALKYVAKLRQQRTRKDVDPVARPLVLRMRPSGGHYFWGDTENICEE 770
OPBsLb   NDRVTYPGMMISVCLDDDRVPAWNALKYVAKLRQQRTRRDVDPVARPLVLRMRPSGGHYLWGDTENICEE 770
OPBsLa   NDRVTYPGMMISVCLDDDRVPAWNALKYVAKLRQQRTRKDVDPVARPLVLRMRASGGHYFWGETENICEE 770

OPBsTc   LSFLCSQLDLEGPGKVLNDMDIMTHMHNLTATGAMDHDDQEKVFLKWDNWERERIDYHVKLHNFDWEPNF 840
OPBsTb   LSFLCSQLDLEGPGKVLNDMDIMTHMHNLTVTGAMDHDDQEKVFLKWDNWERERIDYHVKLHNFDWEPNF 840
OPBsLm   LAFLCSQLDLEGPGKMLNDMDVMTHMHNLTVTGAMDHDDQQKVFLKWDNWERERIDYHVKLNSFNWEPNF 840
OPBsLi   LAFLCSQLDLEGPGKMLNDMDVMTHMHNLTATGAMDHDDQQKVFLKWDNWERERIDYHVKLNSFNWEPNF 840
```

```
OPBsLb   LAFLCSQLDLEGPGKVLNDMDIMTHMHNLTTTGAMDHDDQQKVFLKWDNWERERIDYHVKLNSFNWEPNF 840
OPBsLa   LAFLCSQLDLEGPGKTLNDMDVMTHMHNLTATGAMDHDDQQKVFLKWDNWERERIDYHVKLNSFNWEPNF 840

OPBsTc   RKLKAEKEPFFWVPNEQEMQQRKVDEMFHARERDKREEAKSEAKVGSTGRAAGGNKWKEKVKK-- 903
OPBsTb   RKLKAEKQPFFWVPTDSELHQSKVDEMFRAKERDIRERGKSEAKTGSTGRAMGENKWASENGR-- 903
OPBsLm   RAVKARKEPFFWVPTDSELDQKKVDEIFRAKERDARESVRSGAKVGGFGRATGRNLYQEEQRGKP 905
OPBsLi   RTVKARKEPFFWVPTDSELDQKKVDEIFRAKERDARESVRSGAKLGSFGKATGRNLYREEQRGKP 905
OPBsLb   RKVKAQKEPFFWVPTDSDLDQKKVDEMFRAKERDARESARSGAKVGSLGKATGRNLYQGEQRGKP 905
OPBsLa   RKVKAQKEPFFWVPTDSELDQKKVDELFRAKERDARESVRSGAKLGSFGKATGRNLYQEEQRGKP 905
```

Figura 5. **As sequências de resíduos de aminoácidos das oligopeptidases símiles de cinetoplastídeos patogênicos são conservadas.** Tc – *Trypanosoma cruzi* (XP_810007.1)*;* Tb - *Trypanosoma brucei* (XP_846117.1)*;* Lb – *Leishmania braziliensis* (XP_001561968.1)*;* Li – *Leishmania infantum* (XP_001463116.1)*;* Lm – *Leishmania major* (XP_001680803). Negrito, resíduos de aminoácidos idênticos; Cinza claro, similares; Vermelho, aqueles que compõem a tríade catalítica.

Comparando a sequência completa de aminoácidos de OPBsTc com oligopeptidases de *L. braziliensis, L. infantum, L. major* e *L. amazonensis* obtêm-se valores médios de 74% de identidade e de 86% de similaridade. Como esperado, a maior homologia foi observada quando a OPBsTc foi alinhada com sua ortóloga de *T. brucei,* verificando-se uma identidade de 81% e similaridade de 89% (Tabela 1).

Tabela 1

Oligopeptidase B símile de *T. cruzi* (OPBsTc) compartilha alta percentagem de identidade com aquelas de outros cinetoplastídeos

Número de acesso	Cinetoplastídeo	Identidade (%)	Similaridade (%)
XP_846117.1	*Trypanosoma brucei*	81	89
XP_001561968.1	*Leishmania braziliensis*	75	87
XP_001463116.1	*Leishmania infantum*	74	86
ABQ23351.1	*Leishmania amazonensis*	74	86
XP_001680803	*Leishmania major*	74	86

As sequências utilizadas na análise foram obtidas no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). O alinhamento foi realizado com o ClustalW, utilizando as sequências completas.

O alinhamento entre as sequências protéicas da OPBsTc (Tc00.1047053505939.20) e a oligopeptidase B de *T. cruzi* (OPBTc; Tc00.1047053511557.10), já bem caracterizada na literatura (Burleigh & Andrews, 1995), foi realizado para conferir o grau de identidade e similaridade. Como resultado verificou-se que a OPBsTc apresenta uma extensão de aproximadamente 105 aminoácidos na porção C-terminal e que sua sequência completa, quando comparada com a OPBTc apresenta uma homologia reduzida, com identidade de 19% e similaridade de 31% (Fig. 6). A OPBsTc, assim como a OPBTc, possui os aminoácidos que formam a tríade catalítica, Serina, Ácido Aspártico e Histidina, característica das serino-proteases, sendo as duas proteases classificada dentro da mesma família. Porém, de acordo com as informações depositadas no GeneDB, a OPBsTc e a OPBTc apresentam, teoricamente, características bioquímicas e biofísicas distintas.

```
OPBsTc  MAALYPWVPASNVAYTLCRYFLNRFAPHARNICPLPFLDGPLPDEVPESLLLCGERTQSDPFKYMEDLFD 70
OPBTc   -------------------MKCGPIATPKDHEVVFGYVEG----ENRGNNAMNPPRRRNDPLFWLRDDSR 47

OPBsTc  RRTQSYVRSEQHHYAFIDSKFDFKHTKARLWAELDSKVVVTSREGGFDKGEERIGDFVYFTRVVPGGDSN 140
OPBTc   KNPEVIAHLKLEQAYFEERTADIKDFSETIFKEYISHIKETDISAPY-----RYDGYTYYTREVEG-LSY 111

OPBsTc  AIGFYRKRYGQVDLLAEELINPTSLQQHFGYEKCHVGICR-VSDDGRYVAYTLSVEGGDRYICHVRSIDN 209
OPBTc   KIHCRVPLGMTPGKSEDEQVILDENKLAEGKPFCMVHEVKPAPPDHNLVAYSVDYIGNEMYTIRFTDNAV 181

OPBsTc  ASLFHVIRGRNIVSIEFGSGDYFYFTESNDLNRPYTVIMQQIRPGILPPPVELYREDDEQFFVDVHKTKD 279
OPBTc   TDVVEGTNG----QILWGPNASCFFYMTKDAAERDYKIWRHIIGRPQSEDVCLYTENDLLFSTAMAISGD 247

OPBsTc  NAYIIITSDSKLKSSALVLPASFPKVSRELQAFFRDGRPVEIAGKENWNWLEHYDGHFIMVVADQGPNHR 349
OPBTc   GSTLIIGSGSFETTESQLLDLRKGNGHTTLEMVRPREKGVRYDVELHG-----TENLLILTNKDNCMNGK 312

OPBsTc  VVYAREEVVLKHGMRAEWKELVPYRDDVQIVDMDLFQGRIVLYEVHFAFERINHIHIIKCDKGLDDAARQ 419
OPBTc   VVLATRNTPSDWEN-----IIVPHSEDVFIGEIGVFAKFAVLSGRRGGLTRV-----WTMPVGSDGLFRS 372

OPBsTc  ARKDDLVLHFPPLTSVTPGLN--KNFNQDSMSFVYSSICQPSRDCVFSFDSKMTAEKSWVCSSESLFTQH 487
OPBTc   GAFVQEVSFDEPVFTAFPVFSHMKMYDTETLRVSYTSMSTPTT----WFDLHVVNGTRTIVKVREVLGNF 438

OPBsTc  QSEQLTPWDYMWPYSIYRDLCLSPDGTQIPITICHRRDAFVQEATDFEAQPNTPKHCLIYVYGSYGEVPS 557
OPBTc   DAK---------NYTCRRLFATAPDRTKIPLSIVH----------DVSLDMSKPHPTVLYAYGSYGVCVE 489

OPBsTc  MHFQLAPYMWMLRRRWTVVFAHVRGGGELP-NWGEQ-GKGKNKINAVHDFIACCEHMIKMGYTKPELMVA 625
OPBTc   PEFSVK-YLPYLDRGVIYVIAHVRGGGEMGRAWYEVGAKYLTKRNTFSDFIACAEYLIEIGLTTPSQLAC 558

OPBsTc  AGNSAGCVPIAAAMNMRGCGLFGNALLRSPFLDIINTMIDPDLPLSLAERDDWGDPLHNAEDYARLTQYD 695
OPBTc   EGRSAGGLLIGAVLNMR-PDLFRVALAGVPFVDVMTTMCDPSIPLTTGEWEEWGNPNE-YKFFDYMNSYS 626

OPBsTc  PYLNINDRVTYPGMMISTCLDDDRVPPWNTLKYVAKLRQQRRRKGTDPVARPLVLRVRSSGGHYCWGDTE 765
OPBTc   PVDNVR-AQDYPHLMIQAGLHDPRVAYWEPAKWASKLRALKTD------SNEVLLKMDLESGHFSASDRY 689

OPBsTc  NICEELSFLCSQLDLEGPGKVLNDMDIMTHMHNLTATGAMDHDDQEKVFLKWDNWERERIDYHVKLHNFD 835
OPBTc   RYWREMSFQQ--------AFVLKHLNARTLLRR------------------------------------ 714
```

```
OPBsTc  WEPNFRKLKAEKEPFFWVPNEQEMQQRKVDEMFHARERDKREEAKSEAKVGSTGRAAGGNKWKEKVKK 903
OPBTc   ------------------------------------------------------------------- 714
```

Figura 6. **As sequências de resíduos de aminoácidos da OPBsTc e da OPBTc apresentam pouca homologia entre si.** OPBsTc (XP_810007.1); OPBTc (XP_809967.1); Negrito denota resíduos de aminoácidos idênticos; Cinza claro, os similares; Vermelho, aqueles que compõem o sítio catalítico das enzimas.

Em relação à X-PDAPTc e seus ortólogos, através da sequência completa de aminoácidos observa-se uma identidade de 54% para *L. braziliensis* e de 55% para *L. infantum* e *L. major*. Curiosamente essa análise não revelou presença de proteína com identidade significativa de sequência em *L. amazonensis* e em *T. brucei*. (Fig. 7; Tabela 2). Observando o alinhamento entre a X-PDAP de *L. lacctis* e *H. walsbyi* e a X-PDAPTc, verifica-se que os aminoácidos serina, ácido aspártico e histidina do sítio ativo encontra-se em posições diferentes das observadas em relação aos ortólogos em cinetoplastídeos (Fig. 7).

```
X-PDAPTc  ----------------------------------------MQKVVVSTLPNKVKTIENVFIELRDATRLS 30
X-PDAPLm  ----------------------------------------MRRVCTDLPHPTQFVEHIYITLNDNIRLA 29
X-PDAPLi  ----------------------------------------MRRVCTDLPHPTQFVEHVYITLKDNIRLA 29
X-PDAPLb  ----------------------------------------MRRVCLDSPHPTRFVEHIYIELKDKICLV 29
X-PDAPHw  ---------------------------------------------MASQSTYGVHAELNVRIETRDGIELA 26
X-PDAPLl  MRFNHFSIVDKNFDEQLAELDQLGFRWSVFWDEKKILKDFLIQSPTDMTVLQANTELDVIEFLKSSIELD 70

X-PDAPTc  CRLWLPAD----DVPR---PAILEYIPYRKRDGTRGRDEPMHGYFAGHGYAAVRVDMRGS-------GES 86
X-PDAPLm  ARLFMPKD----ASSEHRYPAILEYIPYRKRNGTRIRDEPMHGFFAGHGYVAVRVDMRGA-------GES 88
X-PDAPLi  ARLFMPKD----ASSEHRYPAILEYIPYRKRNGTRIRDEPMHGFFAGHGYVAVRVDMRGA-------GES 88
X-PDAPLb  ARLFMPKD----ASSEKRYPAILEYIPYRKRNGTRTRDELMHGFFAGQGYVSVRVDMRGA-------GES 88
X-PDAPHw  TDIYRPADPQTGEPVDESRPVLLDRTPYDRTGGRLRHG----EWYASRGYVVAIQDVRGR-------FDS 85
X-PDAPLl  WEIFWNITLQLLDFVPNFDFEIGKATEFAKKLNLPQRDVEMTTETIISAFYYLLCSRRKSGMILVEHWVS 140

X-PDAPTc  DGLM----HDEYLQQEQDDAMEVIEWISRQKWCNGNVGMMGKSWGGFNSLQVAVRRPPALKAIITVG--- 149
X-PDAPLm  DGLL----LDEYLKQEQDDALEVIDWISKQPWCTGDVGMMGKSWGGFNSLQVAARRPPALRAIIVLG--- 151
X-PDAPLi  DGLL----LDEYLKQEQDDALEVIDWISKQPWCTGDVGMMGKSWGGFNSLQVAARRPPALRAIIVLG--- 151
X-PDAPLb  DDLL----LDEYLKQEQDDALEVIDWISKQPWCTGDVGMMGRSWGGFNSLQVAARRPPALRAIVVLG--- 151
X-PDAPHw  DGEF----YIHAN--EAKDGADTVDWLSKREYCDGQVATLGTSYGAWVQSALATQDPNNLAGMFVNM--- 146
X-PDAPLl  EGLLPLDNHYHFFNDKSLATFDSSLLEREVVWVESPVDTEQKGKNDLIKIQIIRPKSTEKLPVVITASPY 210

X-PDAPTc  ----------FTDNRFTDGIHWQGGCLLNDNFWWGSIVLAYQARPIDPEIVGDRWKEMWLQRLENMPVNI 209
X-PDAPLm  ----------FTHNRFTDDIHWKGGCLLNDNFWWGCIMQGFQSCPPDGDIVGDRWKEMWLERLDKMPLNA 211
X-PDAPLi  ----------FTHNRFTDDIHWKGGCLLNDNFWWGCVMQGFQSCPPDGDIVGDRWKEMWLERLDKMPLNA 211
X-PDAPLb  ----------FTHNRFTDDIHWKGGCLLNDNFWWGCLMQGFLSCPPDSDIVGDRWKDMWLERLGKMTLNA 211
X-PDAPHw  ----------GAANGRKKTFRHNGAFELRWLCWALTLGGGFAHESLADPDIQQQFADVDVREILADSPIK 206
X-PDAPLl  HLGINEKANDLALHEMNVDLEKKDSHKIHVQGKLPQKRPSETKELPIVDKAPYRFTHGWTYSLNDYFLTR 280

X-PDAPTc  ------------ADWAEHQKYDDYWKHGSVCENYDSIQIPVMAVDGWADGYTNAVFNLLSNLKVPRKGFV 267
X-PDAPLm  ------------ADWAEHQRYDAYWQHGSIQEDYSSIQVPVLLIDGWADSYTNALFHLLEGLKGPCKAIC 269
```

```
X-PDAPLi   ------------ADWAEHQRYDAYWQHGSIQEDYSSIQVPVLLVDGWADSYTNALFHLLEGLKVPCKAIC 269
X-PDAPLb   ------------ADWAEHQRYDAYWQQGSIQEDYSSIQVPVLLVDGWADSYTNALFHLLEELKVPCKAIC 269
X-PDAPHw   ------------RGESPLATLPGYEQWT-----FDIMETGNTSTDLWKNPGLNFERHYDNSADVP-TVYA 258
X-PDAPLl   GFASIYVAGVGTRGSNGFQTSGDYQQIYSMTAVIDWLNGRTRAYTSRKKTHEIKATWANGKVAMTGKSYL 350

X-PDAPTc   GPWAHVYPQDGVPQPAMGFLQE-AVKWWDHWLKG-TENNVMDGPMIQVWMEHEMKPSVHRPVSEGHWVGV 335
X-PDAPLm   GPWAHVYPQDGTPLPRMNFLRA-AKDWWDYWMKGMTANDVASWPVLQVYIEDSLPPCTIKPMAPGKWVAM 338
X-PDAPLi   GPWAHVYPQDGTPLPRMNFLRA-AKDWWDYWMKGMTTNDVASWPVLQVYIEDSLPPCTTKQMAPGKWVAM 338
X-PDAPLb   GPWAHVYPQDGTPLPQMNFLRA-ATD-WDYWMKGITDNNVPSWPALQAYIEDSLPPCTSKPVAPGKWVAM 337
X-PDAPHw   GGWYDSYTG----------------ATCDNFVELGNRKDADHYLLMGPWTHLARLPGGHDHSDALLFPPL 312
X-PDAPLl   GTMAYGAATTGVDGLEVILAEAGISSWYNYYRENGLVRSPGGFPGEDLDVLAALTYSRNLDGADYLKGND 420

X-PDAPTc   EAWPSKDVTEETMRLECGRIVDFA--HAVRQEPASVLLRTPLNHGLLAGEWMGAGVSGETPADQRMDDGM 403
X-PDAPLm   DKWVNAEVPTVMYGLGAGRFLTEMGKDGATTATGTVMVHTPLNHGLISGEWMGVGTIGESAGDQRIDNGL 408
X-PDAPLi   DKWVNAEVPTVVYGLGAGRLLTEIGKDGATTATGTVMVHTPLNHGLISGEWMGVGTIGENAGDQRIDNGL 408
X-PDAPLb   DKWVNAEAPTVAYGLGAQRFLTEISKDGANMATCTVMVRTPLNHGLMSGEWMGAGVLGETAGDQRIDNGL 407
X-PDAPHw   S-WEHPTAGDLAFGDAAARKYRETRLRFFDQ-------YLQGGDGWKTQPRVEYFLMGTGDG-HRTDDGL 373
X-PDAPLl   EYEKRLAEMTTALDRKSGDYNQFWHDRNYLINSDQVRADVLIVHGLQDWNVTPEQAYNFWQALPEGHAKH 490

X-PDAPTc   AMVFDAAELQHELEILGRPILEVELTCDKPKAMLFAQLSDVSPDGAVSRISFGVKNVTQAA--GDQRIEY 471
X-PDAPLm   AVTYTSAPLTAAMDILGQPIFSVTLTCDRPKGFLFAQMCDIAPDGAATRITYGIKNLVHCGPEGDRAIAL 478
X-PDAPLi   AVTYTSAPLTAAMDILGQPTFSVTLTCDRPKGFLFAQLCDIAPDGAATRITYGIKNLVHCGPEGDRAIAL 478
X-PDAPLb   AVTYTSAPLTASMDILDQPTFSVRQTCDQPKGLLFAQLCDIAPGGAATRITYGMKNLVHCGPEGDRAIAL 477
X-PDAPHw   LFHGGEWRNADTWPPEGTEMTRYYIHNDG-------TLSSMKPKADVSTTTFNFDPTDPVPTIGGNTSSY 436
X-PDAPLl   AFLHRGAHIYMNS--WQSIDFSETINAYFSAKLLDRDLNLNLPPVILQENSKEQVWSAVSKFGGDDQLKL 558

X-PDAPTc   LQEGKRVRVRVLLNYCAHRFTKGHRIRLSLANSQWPMFWVSPEINTLSLDLSTATLRLPTYR--GPAIAG 539
X-PDAPLm   VQPGQAVQVTVKMDFCGYCIPAGHSVSLSLANNYWPMVWCSPGDTTLLLDATTAVFRVPVLHPSATIVPG 548
X-PDAPLi   VQPGQAVQVTVTMDFCGYCIPAGHSVSLSLANNYWPMVWCSPADTTLLLDAATAVFRVPVLHPSAIIVPG 548
X-PDAPLb   VQPGQAVQVTVKMDFCGYCVPAGHSVSLLLANNYWPMVWCSPANTTLLLDAATAVFLLPVLHPSAAIVPG 547
X-PDAPHw   LTYEPRDESVRAHPLGDRNIIDFAGRGGYDQRTDQDTFGATPPYGPLADRDDVLTFRTPPLEQPVDIAGP 506
X-PDAPLl   PLGKTAVSFAQFDNHYDDESFKKYSKDFNVFKKDLFENKANEAVIDLELP-SELTINGPIELEIRLKLND 627

X-PDAPTc   PNPQPETAAPTPLTVLRAGFVDRSITYDIVKDEWTC-ITDGVG-GVFGDGVYRFDEIGTAVEHNLRRELR 607
X-PDAPLm   PDSIPEVAASTPMTVMAPGRVERSVSYEIVLDTWTC-VTSVVG-GVFGEGIPRLDDIDTTLEHSLRRELT 616
X-PDAPLi   PNSIPEVAPSTPMTVMAPSHVERSVSYEIVLDTWTC-VTNVVG-GVFGEGIPRLDDIDTTVEHSLRRELT 616
X-PDAPLb   PDPIPEVAASTPMTVISPGYVDRFVSYDIVRDTWTC-VTSGVG-GVFGEGIFRFDDIDTTLEHNLRRELT 615
X-PDAPHw   IRVRIYGETDGQDTDFTAKLIDEYPASETHPDGYALNISDSICRGRYRGYRQEPDLLEPGVVYEFYMEPY 576
X-PDAPLl   SKGLLSAQILDFGPKKRLEDKARVKDFKVLDRGRNFMLDDLVELPLVES---PYQLVTKGFTNLQNKDLL 694

X-PDAPTc   LSNKDPLSARYDIKQKMKMGRPGWEADIDIDTRQTCDANYLYVTAEIQAKMNDEIVFEKNWSRRVYREGM 677
X-PDAPLm   LSNRDPLSARYTINQKFKVSRPHCVTDVNITSTQHCDADYLYIQSKIKAAHNDEGVFEKSFCRRVRREAI 686
X-PDAPLi   LSNRDPLSAHYTINQKFKVSRPHCVTDVNITSTQHCDADYLYIQSNIKAAHNDEGVFEKSFCRRVRREAI 686
X-PDAPLb   LSNRDPLSAHYTVTQKVKVNRPRCVTDVNITSTQHCDAEYLYIRSTIKATYNDEEVFEKNLFRRVRREAI 685
X-PDAPHw   DTANRFKQDHRIRLDISSSNWPRFDVNQNTGGRLYGDTNPRVAENTIYHSNEYATHIELPVWSANT---- 642
X-PDAPLl   TVSDLKADEWFTLKFELQPTIYHLEKADKLRVILYSTDFEHTVRDNRKVTYEIDLSQSKLIIPIESVKK- 763
```

Figura 7. **As sequências de resíduos de aminoácidos das X-PDAP são conservadas em cinetoplastídeos patogênicos.** Tc – *Trypanosoma cruzi* (XP_812655.1)*;* Lb – *Leishmania braziliensis* (LbrM28_V2.2130 – www.genedb.org)*;* Li – *Leishmania infantum* (XP_001470234.1)*;* Lm – *Leishmania major* (XP_001684477)*;* Hw – *Haloquadratum walsbyi* (YP_657694.1); Ll – *Lactococcus lactis* (NP_268206). Negrito, resíduos de aminoácidos idênticos; Cinza claro, similares; Vermelho, aqueles que compõem a tríade catalítica.

Tabela 2

X-Prolil dipeptidil aminopeptidase (X-PDAPTc) compartilha identidade com ortólogos em cinetoplastídeos, mas está ausente em *T. brucei* e *L. amazonensis.*

Número de acesso	Cinetoplastídeo	Identidade (%)	Similaridade (%)
LbrM06.V2.0320	*Leishmania braziliensis*	54	71
LinJ06.0340	*Leishmania infantum*	55	72
LmjF06.0340	*Leishmania major*	55	73

As sequências utilizadas na análise foram obtidas no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). O alinhamento foi realizado com o ClustalW, utilizando as sequências completas.

2. A GSTc compartilha pouca identidade de sequência com seu ortólogo em humanos.

Utilizando-se a sequência de aminoácidos da glutationa sintetase de *T. cruzi* (GSTc) e o programa BLAST, foram encontradas quatro outras sequências homólogas entre si em *T. brucei, L. major, L. infantum* e *L. braziliensis.* Essa busca não revelou presença de proteína com identidade significativa de sequência em *L. amazonensis* (Fig. 8).

Em *Leishmania* ssp, com excessão da *L. amazonensis,* as sequências de resíduos de aminoácidos da glutationa sintetase é bastante conservada, com valores de identidade de 74% e 91%. Quando se compara essa espécie com *T. brucei* é possível observar um valor médio de 41% de identidade. Já a GSTc compartilha 57% de identidade de sequência com a GS de *T. brucei*, 46% com aquelas de *L. braziliensis* e *L. major* e 47% com a sequência de resíduos de aminoácidos da GS encontrada em *L. infantum* (Fig. 9). A glutationa sintetase em humanos quando comparada com a GSTc demonstra uma similaridade de apenas 26% (Fig. 8).

```
GSTc  ----------------------------------------------------MELLGD--AEQLVAKCMM 16
GSTb  ---------------------------------------------MVLKLLLELGAERYAEQFAAKCHE 24
GSLm  ---------------------------------MPATTKKTATTVTGAAVSNDVLEGLPSEEELAAKCLE 37
GSLi  ---------------------------------MPATTT-TATATTSTAVPNYVLEGLPSEEELAAKCLE 36
GSLb  ---------------------------------MATTAT-----TTAATAADDILEGLPSEEELAAKCLQ 32
```

```
GSAt   ELRQGLNPSSFLFQNPKTLRNQSPLRCGRSFKMESQKPIFDLEKLDDEFVQKLVYDALVWSSLHGLVVGD 70
GSHp   ---MATNWGSLLQ--------------------------------DKQQLEELARQAVDRALAEGVLLRT 35

GSTc   LGLTIQMAGHEDATTHLAVTLQPTTMRRGEFDVLCRRQLLWNEAVNNTARNFQFLLDALRETAASDTEFT 86
GSTb   LGMVMKES-AGPGRVPVPVTLQPSMISRGEFGTLCCMQPLWNEAVDNTARNFTFLRDALQETAASDVNFT 93
GSLm   LGLAIHQP-DTYEITHPALSLRPFPMKADVLRQLYDRQLLWNEAINRTSRNFEFLRDSMKSTAESDRSFT 106
GSLi   LGLVIHQP-HTYEITHPALSLRPFPMKADVLYQLYDRQLLWNEAINRTSRNFEFLRDSMKSTAESDRGFT 105
GSLb   LGLAMRQP-PTYHVTHPALSLRPLPMKVEVLRELYGLQLLWNEAINRTARNFEFLRDSMRSTAESDRDFT 101
GSAt   KSYQKSGNVPGVGLMHAPIALLPTAFPEAYWKQACNVTPLFNELIDRVSLDGKFLQDSLSRTKKVD-VFT 139
GSHp   SQEPTSSEV----VSYAPFTLFPSLVPSALLEQAYAVQMDFNLLVDAVSQNAAFLEQTLSSTIKQD-DFT 100

GSTc   GKLVNILRDVYLGTSP------YQPLMLGIFRTDYMH--DGAAAAAASTVAETM-------------EED 135
GSTb   GKLLNMLQEVYLSGGP------FQQLMLGIFRTDYMR--EGVYDKMLSTTAS------------------ 137
GSLm   GRLLAILEKVYMTTPVGAKAPVYQPFMLGILRTDYMSSVDPESGSHLSSTEVSA----------AAAAGT 166
GSLi   GRLLSILEKVYMTTPVGAKAPVYQPLMLGILRTDYMSSVDPESGSHLSSAEVAA----------AVAAGT 165
GSLb   GRLLSILERVYMTTPDRAKAPVYQPLMLGIFRSDYMSSADSESSSPVSPAEAAASVTLSGAAAAAVATET 171
GSAt   SRLLDIHSKMLERNKK-------EDIRLGLHRFDYMLDEETN---------------------------- 174
GSHp   ARLFDIHKQVLKEGIA-------QTVFLGLNRSDYMFQRSADGSP------------------------- 138

GSTc   AAAWKNVEINTISSSFAGLSPLVSDFHRQIAMYQRALGGGSAKNTADDHQNNEAMPN----------LDN 195
GSTb   --RWKNVEINTISCSFAGLSPLITEFHQHIAAYLQVLQKARGKEDDDGVENMSWIWG----------KGN 195
GSLm   ARQWKNIEINTISCSFAGISPLVHKFHAYLHKFREAFMNVGDAAVVESTKAASLATPSVVAASPRQRESA 236
GSLi   ARQWKNIEINTISCSFAGISPLVQRFHAYLHKFREAFMNVGAAAAVEGTKAASYAAPSVVATSPRQRESA 235
GSLb   ARQWKNIEFNTISCSFAGLSPLVQQFHAYLQKFREADMNAGAAADLEHVEASSPSTSSVVAASPHQHASA 241
GSAt   --SLLQIEMNTISCSFPGLSRLVSQLHQSLLRSYGDQIGIDSERVPI----------------------- 219
GSHp   --ALKQIEINTISASFGGLASRTPAVHRHVLSVLSKTK--EAGKILS----------------------- 181

GSTc   AGVLERSTAGKIVPEALAAVAAWSSQQNFEAFRDAYGKEQQ---------HCRLLD--PIVLFIIQENE 254
GSTb   C-RLERSVSGDVVPKAIADAVRAWVEQQKFASLRASWEQFQQNEVGSGEIHQLGVLDTAPVVLVVVQENE 264
GSLm   YVTDEKHNSTVQVSAALAEAVAVWRNAVPYSSFLRQYHQRTG-------------VLLKPIVLAVVQENE 293
GSLi   YVTDEKHNSGVQVSAALAEAVAAWRDAVPYSSFLRQYQQRTG-------------VALKPIVLAVVQENE 292
GSLb   YVPDQMHNSAVQVPAALAKAVAAWRSAVPCAGFLRQYQHRTG-------------VRLKPIVLVVVQKNE 298
GSAt   ------NTSTIQFADALAKAWLEYSNPR------------------------------AVVMVIVQPEE 252
GSHp   ------NNPSKGLALGIAKAWELYGSPN------------------------------ALVLLIAQEKE 214

GSTc   RNTADQFALIFELLESHGIPSLRRTLRELQVSMKLHPV-------------------PNGPPLAIVDGRY 305
GSTb   RNTADQYALLMRVLEEHRIRFIFRTLQELHLSLKLHSIS------------------PEQPPLAVVDGHY 316
GSLm   LNTADQYRLLLELLETHGVLSLRRTLAQLHETMRLEHATLCGNERDRSTETEEVLSEQLLPPFAVVDEKY 363
GSLi   LNTADQYKLLLELLETHGVLSLRRTLAQLHETMQLEHATLCGNEHDCSTETKEDLSEQLQPPFAVVDKKY 362
GSLb   MNTADQYKLLLELLETHRVLSLRRTLAELHETMRLEHANLGESSCNHSTETKEVVSEQLQPPFLVVEGKY 368
GSAt   RNMYDQHLLSSILREKHNIVVIRKTLAEVEKEGSVQEDE------------------------TLIVGGQ 298
GSHp   RNIFDQRAIENELLAR-NIHVIRRTFEDISEKGSLDQDR------------------------RLFVDGQ 259

GSTc   PVAVAYFRSTYVPADFPTKASWDTRLAVEQSSAIKCPSIPYHLLTFKKLQQLFCDVGNVLTPIAFCGDAV 375
GSTb   PIAVAYFRSTYVPEDFPTDATWAARLSLERSSAIKCPSIPYHLLTFKKLQQLLCDVDRVLVPVAFCGDSD 386
GSLm   VVAVAYFRSTYVPKDLPTETAWQTREQIEESNAVKCPSVPYHLMTFKKMQQLMSNVSEVLAPVSFAGNQQ 433
GSLi   VVAVAYFRSTYVPKDLPTETAWQTRERIEESNAVKCPSVPYHLMTFKKMQQLMSNVSEVLAPVSFDGDQQ 432
GSLb   VVAVTYFRSTYVPQDLPTDAAWQTREWIEESNAVKCPSIPYHLMTFKKMQQLMSNVSEVLAPVSFAGDQQ 438
GSAt   AVAVVYFRSGYTPNDHPSESEWNARLLIEESSAVKCPSIAYHLTGSKKIQQELAKPG--VLERFLDNK-E 365
GSHp   EIAVVYFRDGYMPRQYSLQN-WEARLLLERSHAAKCPDIATQLAGTKKVQQELSRPG--MLEMLLPGQPE 326

GSTc   RALQLQTHFVPQYSLNPAEVGEDAVQR--------------VIDDALQHPARYVLKPQLEGGGNLIAGQA 431
GSTb   KAGLLQRHFVPQYSLNPKEVGEEAVEK--------------VIHDVLQRPDQFVLKPQLEGGGNLLSGET 442
GSLm   KAAALAEHFAPQYSLNSDEYARLAANRQRIDEGKVISDPEYWIADAVLHPEQYVLKPQLEGGGNLIAGEP 503
GSLi   KAAALAEHFVPQYSLNEDEYARLATNRQRIDEGKVINDPEHWIADAVLRPERYVLKPQLEGGGNLIAGEP 502
GSLb   KAAALAEHFVPQYSLNNDEYGRSVKNQQCNDKDKVIDDPEYWIADAVEHLERYVLKPQLEGGGNLIAGEA 508
GSAt   DIAKLRKCFAGLWSLDDSE----------------------IVKQAIEKPGLFVMKPQREGGGNNIYGDD 413
```

```
GSHp   AVARLRATFAGLYSLDVGEEGDQ------------------AIAEALAAPSRFVLKPQREGGGNNLYGEE 378

GSTc   MQEVLRKKELTDPLLYNKVRREYILMSRIEFPVRSGAFLVNGKVVQLEKNICSELGIYGVILSDAGG--- 498
GSTb   MVKALKATKEGDPVTYSKVRCEYVVMSRIQFHVSTGSLLARGDVVQLERNMCSEVGIFGVILSAAKGSSV 512
GSLm   MQRMLRDVTSDDP-LYQKIRREYILMRKIDYPVATGVFFQKNSIHV-EKNACSEVGIFGVILSSDAN--- 568
GSLi   MQRMLRDVTSDDP-VYKKIRREYILMRKIDYPVATGVFFQRNRIHVLERNACSEVGIFGVILSSDAN--- 568
GSLb   MQRLLRDTKSDDP-LYQKIRREYILMRKIHCPVMKGIFFRQNQIHVVESNVSSELGIYGVTLSSDAN--- 574
GSAt   VRENLLRLQKEGE----EGNAAYILMQRIFPKVSNMFLVREG-VYHKHQAIS-ELGVYGAYLRSKDE--- 474
GSHp   MVQALKQLK-DSE----E-RASYILMEKIEPEPFENCLLRPGSPARVVQCIS-ELGIFGVYVRQEKT--- 438

GSTc   -----CLLQNACAGYVVRSKPADVDDGGVMAGVAALDSLALV--------------------- 535
GSTb   GTNGSSVLFNTFAGYTVRSKPADADDGGVMAGVAALDSLAVVP-------------------- 555
GSLm   -----GYIMNQAAGTLVRTKPADAADGGVIAGVAALDSVQIIS-------------------- 606
GSLi   -----GYIINQAAGSLVRTKPADVTDGGVVAGVAALDSVQIIS-------------------- 606
GSLb   -----QYIMNEAAGSVVRAKPADVADGGVMAGIAALDSVQLIDEAPHEVAWSGASAVADERYP 632
GSAt   ------VIVNEQSGYLMRTKIASSDEGGVAAGFGVLDSIYLI--------------------- 510
GSHp   ------LVMNKHVGHLLRTKAIEHADGGVAAGVAVLDNPY----------------------- 472
```

Figura 8. **As sequências de resíduos de aminoácidos da GSTc e glutationas sintetases de cinetoplastídeos compartilham similaridades, mas homologia reduzida com a GSHp.** GSTc – *Trypanosoma cruzi* (XP_810415.1)*;* Tb - *Trypanosoma brucei* (XP_846023.1)*;* Lb – *Leishmania braziliensis* (XP_001563377.1)*;* Li – *Leishmania infantum* (XP_001464275.1)*;* Lm – *Leishmania major* (XP_001687690.1)*;* At - *Arabidopsis thaliana* (CAA90515.1); Hp – *Homo sapiens* (NP_000169.1). Negrito, resíduos de aminoácidos idênticos; Cinza claro, similares.

Portanto, de posse dos resultados de bioinformática ressaltados e de informações importantes em relação à ocorrência ou não de sequências homólogas significativas à OPBTc, à XroTc e à GSTc em humanos, essas proteínas apresentaram-se promissoras quanto ao propósito desse estudo em se procurar alvos eficientes para o desenvolvimento de novos fármacos. Por essa razão iniciou-se o processo de clonagem dos genes em questão.

	GSTc	GSTb	GSLm	GSLin	GSLb
GSTc	100	57	46	47	46
GSTb		100	40	42	40
GSLm			100	91	74
GSLin				100	75
GSLb					100

Figura 9**. Análise da identidade entre as sequência de aminoácidos ortólogas da glutationa sintetase de alguns cinetoplastídeos.** O alinhamento foi realizado utilizando-se o programa BLAST e os valores de identidade foram expressos em porcentagem (%). GSTc – glutationa sintetase de *Trypanosoma cruzi* (XP_810415.1); GSTb – glutationa sintetase de *Trypanosoma brucei* (XP_846023.1); GSLm – glutationa sintetase de *Leishmania major* (XP_001687690.1); GSLin – glutationa sintetase de *Leishmania infantum* (XP_002464275.1); GSLb – glutationa sintetase de *Leishmania braziliensis* (XP_001563377.1).

3. Clonagem e subclonagem dos genes *opbstc, xpdaptc* e *gstc*

Para clonar os genes codificadores de OPBsTc, de X-proTc e de GSTc, iniciadores específicos foram desenhados e sintetizados a partir de suas sequências. O padrão de substrato para enzimas de restrição de cada sequência foi analisado e considerado para escolhas dos sítios de clonagem presentes nos vetores.

Dessa forma, foram sintetizados oligos com sítios das enzimas de restrição XhoI (senso) e BamHI (anti-senso) para o gene da OPBsTc (*opbstc)*, oligos com sítios de NdeI (senso e anti-senso) para o gene da X-PDAPTc (*xpdaptc*) e dois pares de oligos com sítios de BamHI (senso) e XhoI (anti-senso) e com sítios de NdeI (senso) e XhoI (anti-senso) para o gene da GSTc (*gstc*).

O material genético a ser utilizado na primeira reação de amplificação foi extraído de cultura de *T. cruzi* CL Brener epimastigotas, conforme procedimento descrito nos materias e métodos. O DNA genômico após extração foi quantificado e sua pureza e integridade determinada por análises de

espectrofotometria e de eletroforese. Esse material foi utilizado nas reações iniciais de amplificação dos três genes em estudo.

Os genes *opbstc, xpdaptc* e *gstc* amplificados foram visualizados no gel no tamanho esperado em comparação com o marcador e em conformidade com as informações previamente obtidas (Fig. 10). As bandas do gene *opbstc, xpdaptc* e *gstc* apresentaram um tamanho de aproximadamente 2712 pb (Fig.10A), 2034 pb (Fig. 10B) e 1608 pb (Fig. 10C) respectivamente. Após essa etapa iniciou-se o processo de clonagem e subclonagem dos insertos recém-amplificados.

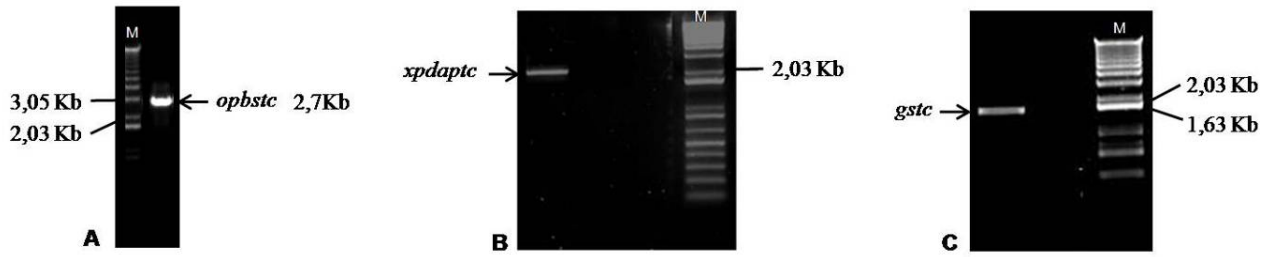

Figura 10. **Análise em gel de Agarose da amplificação dos genes *opbstc, xpdaptc* e *gstc* utilizando DNA genômico de *T. cruzi* e iniciadores específicos.** A PCR foi realizada utilizando os iniciadores senso e anti-senso de cada gene específico de acordo com o procedimento descrito na metodologia. Foi aplicado 1μL da reação para visualização no gel. **M** – marcador 1Kb DNA ladder. **A –** Amplificação do gene *opbstc;* **B –** Amplificação do gene *xpdaptc*; **C** - Amplificação do gene *gstc.* Gel de Agarose 0,8%.

Os produtos das amplificações foram utilizados em reações de ligação com o vetor de clonagem pCR2.1 (3,9 Kb) ou pGEM-T (3 Kb). A reação foi realizada na presença da T4 DNA ligase e do tampão da enzima. Os inserto *opbstc* e *gstc* foram ligados no vetor pCR2.1 e o inserto *xpdaptc* no vetor pGEM-T. Decorrido o tempo da reação, as ligações do pCR2.1-*opbstc*, pGEM-T-*xpdaptc* e pCR2.1-*gstc* foram transformadas em *E. coli* JM109 e/ou em *E. coli* DH5α. E as análises de digestão enzimática das colônias selecionadas liberaram os fragmentos nos seguintes tamanhos: pCR2.1-*opbstc* com XhoI e BamHI 2,7 Kb do inserto e 3,9 Kb do vetor (Fig. 11A); pCR2.1-*gstc* com XhoI e NdeI ou com BamHI e XhoI 1,6 Kb do inserto e 3,9 Kb do plasmídeo (Fig. 11C); e pGEM-T-*xpdaptc* com NdeI 2 Kb do inserto e 3 Kb do vetor (Fig. 11B).

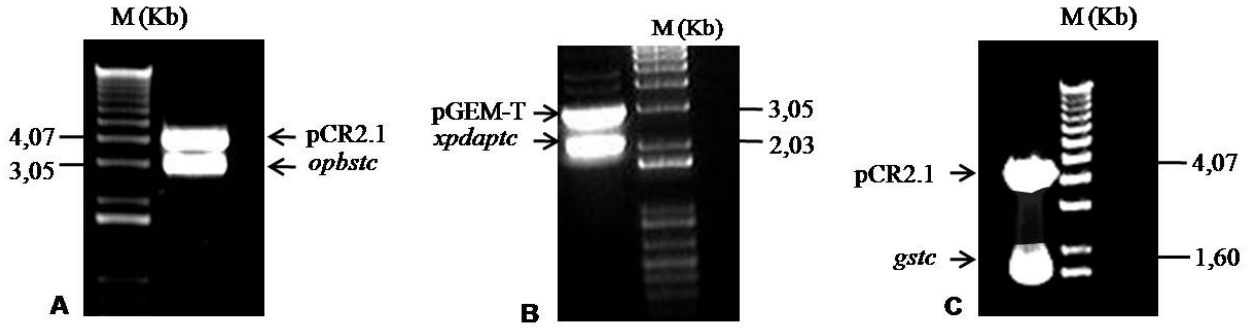

Figura 11. **Análise de restrição enzimática de pCR2.1-*opbstc*, pGEM-T-*xpdaptc* e pCR2.1-*gstc*.** As clonagens dos genes *opbstc, xpdaptc e gstc* nos vetores pCR2.1 e pGEM-T foram confirmadas por digestão com XhoI e BamHI (**A)**, NdeI (**B)** e XhoI e NdeI (**C**), seguindo-se de eletroforese em gel de Agarose 0,8% . **M** – marcador de massas moleculares 1 Kb DNA ladder.

Os insertos *opbstc, xpdaptc* e *gstc* e os vetores de expressão pET19b, pET28a$^+$ e pGEX-4-T-3, digeridos com as enzimas explicitadas no Quadro 1, foram purificados do gel de Agarose e utilizados na segunda ligação. Em relação ao pET19b e ao inserto *xpdaptc*, digeridos apenas com NdeI, realizou-se uma reação de defosforilação com o objetivo de evitar a religação entre as próprias extremidades coesivas.

As subclonagens de *opbstc* e *xpdaptc* foram confirmadas primeiramente por PCR de colônia empregando-se um conjunto de oligos que incluíam o senso com o anti-senso do gene e o senso do gene com o T7 terminador. Nesse último caso, o oligo T7 terminador foi utilizado para confirmar se o inserto estava presente realmente no vetor de expressão e não no primeiro vetor, já que a sequência do T7 terminador encontra-se ausente nos vetores de clonagem utilizados. Como controle negativo, a reação de amplificação foi desenvolvida nas mesmas condições e na ausência de DNA genômico ou plasmidial e o controle positivo constou da reação utilizando-se como molde o DNA genômico extraído de *T. cruzi* (Fig. 12A). Para corroborar esse resultado foram efetuadas análises de restrição enzimática utilizando as endonuclease XhoI, BamHI e NdeI (Fig. 12B) e sequenciamento (dados não mostrados).

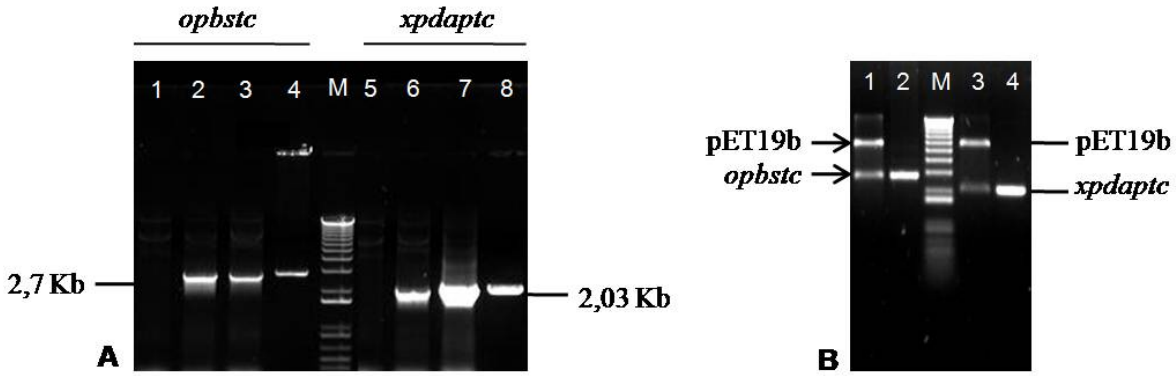

Figura 12. **Confirmação da clonagem do gene *opbstc* e *xpdaptc* no vetor pET19b.**
A - PCR de colônia dos genes *opbstc* e *xpdaptc*. 1 e 5 – controle negativo; 2 e 6 – iniciadores senso e anti-senso do gene; 3 e 7 – iniciadores senso do gene e T7 terminador; 4 e 8 – controle positivo. **B –** Digestão enzimática do pET19b-*opbstc* e pET19b-*xpdaptc* com XhoI e BamHI(1) e NdeI(3). 2 e 4 – bandas purificadas em coluna de sílica GFX. M – marcador 1 Kb DNA ladder. Gel de Agarose 0,8%.

Dentre vários clones triados para o gene *opbstc* foram encontrados três positivos e apenas um clone positivo para o gene *xpdaptc*. Em todos os testes, as bandas correspondentes ao *xpdaptc* e ao *opbstc,* foram visualizadas no tamanho correto (Fig. 12 A e B).

Em relação ao inserto *gstc*, realizou-se a subclonagem nos vetores pGEX4-T-3 e pET28a+. O resultado foi confirmado por análise de restrição enzimática com XhoI e NdeI (Fig. 13A) e por PCR de colônia utilizando-se os iniciadores do gene (Fig. 13B) e), demonstrando seis clones positivos de cada vetor.

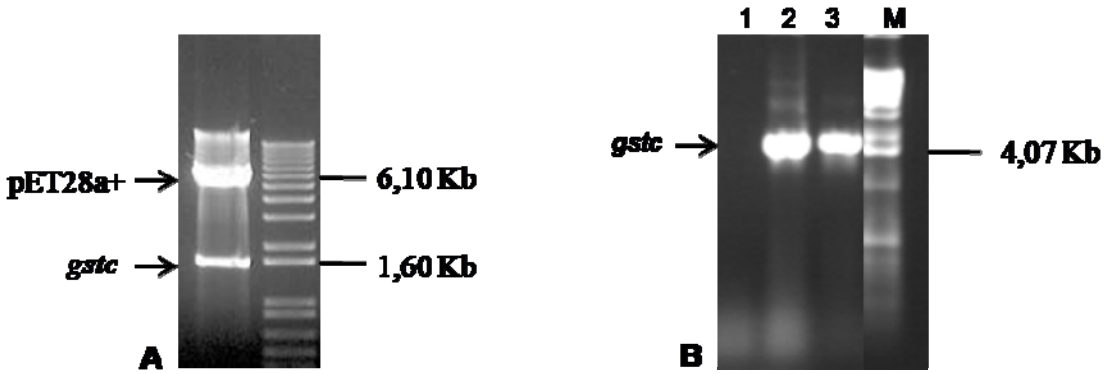

Figura 13. **Clonagem do *gstc* nos vetores pET28a+ e pGEX4-T-3.**
A – Digestão enzimática do pET28a+-*gstc* com XhoI e NdeI. **B –** PCR de colônia. 1– controle negativo; 2 – iniciadores do gene e a colônia como molde; 3 – iniciadores do gene e o DNA genômico de *T. cruzi* como molde; M- marcador 1 Kb DNA ladder. Gel de Agarose 0,8%.

4. Expressão heteróloga e purificação das proteínas recombinantes rOPBsTc, rX-PDAPTc e rGSTc

Após ratificação das subclonagens de todos os genes, *E. coli* BL21 Star e C43 foram transformadas com os plasmídeos pET19b-*opbstc,* pET19b-*xpdaptc e* pET28a^{+}-*gstc*. Algumas colônias foram escolhidas para os experimentos de indução realizados com IPTG, como agente indutor. Estabeleceu-se o protocolo de indução padrão para cada proteína recombinante de acordo com critérios de eficiência e reprodutibilidade.

4.1. rOPBsTc

Para obtenção da rOPBsTc realizou-se uma indução com IPTG 1 mM, a 37 ^{o}C por 16 h sob agitação de 200 rpm. A expressão da rOPBsTc foi observada após SDS-PAGE por meio de visualização de banda com tamanho de aproximadamente 100 kDa, próximo ao predito , 104,3 kDa. A indução do vetor pET19b vazio foi realizada, nas mesmas condições, como controle da expressão. (Fig. 14A).

Para confirmar a expressão da rOPBsTc, realizou-se um *immunoblotting* utilizando-se como primeiro anticorpo o anti-His tag. A proteína recombinante quando expressa nestas condições adquire uma cauda de nove histidinas, que é utilizada tanto para auxiliar na etapa de purificação quanto para análises de imunodetecção utilizando anticorpo específico (anti-His tag). Com esse experimento foi possível verificar a mesma banda observada no experimento anterior, indicando que essa banda realmente corresponde à rOPBsTc (Fig. 14B).

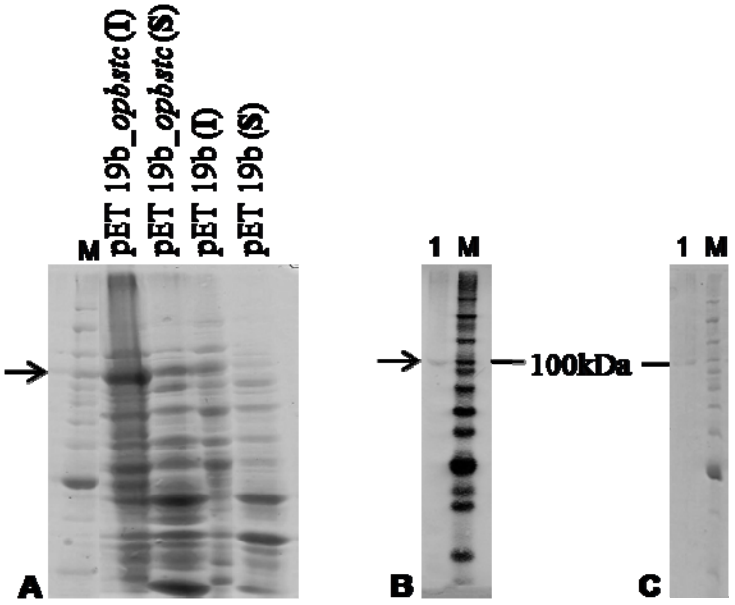

Figura 14. **Expressão heteróloga e purificação da proteína recombinante rOPBsTc**
A – *E. coli* BL21 foi transformada com os vetores pET19b-*opbstc* e pET19b e induzidas com 1 mM de IPTG, 37°C, 200 rpm por 16 h. Lise celular por Bug Buster e as frações solúvel e insolúvel foram resolvidas em SDS-PAGE 8%. M - marcador BenchMark Protein Ladder; S – fração solúvel; I – fração insolúvel; seta corresponde à banda da rOPBTc. **B –** *Immunoblotting* da fração insolúvel do lisado bacteriano induzido. 1 – amostra; M – marcador; seta - banda da rOPBTc. Anti-His tag (1:1000); GAM-AP (1:5000). A membrana foi revelada utilizando NBT/BCIP. **C** - Purificação da rOPBsTc a partir do corpo de inclusão por cromatografia de afinidade. 1 – eluição; M – marcador; traço - banda da rOPBTc purificada.

A figura 14A mostra que a rOPBsTc foi observada apenas na fração insolúvel, ou seja, em corpos de inclusão. De forma a obter a proteína solúvel foram testadas várias concentrações de IPTG e valores de temperatura. No entanto não foi observada expressão da proteína solúvel em nenhuma condição. Então a condição escolhida para purificação foi aquela testada inicialmente. A purificacão da rOPBsTc foi efetuada com a fração insolúvel do lisado bacteriano, sob condições desnaturantes, em coluna carregada com níquel. A proteína foi eluída com 500 mM de imidazol, em quantidade reduzida e elevada pureza (Fig. 14C). As amostras purificadas foram utilizadas posteriormente, após precipitação, para a produção de anticorpos.

4.2. rX-PDAPTc

Colônias diferentes contendo o pET19b-*xpdaptc* e o pET19b vazio foram selecionadas para os testes de expressão heteróloga da rX-PDAPTc. Na indução com 1 mM de IPTG, 37 ^{o}C por 5 h e sob agitação de 200 rpm, evidenciou-se uma banda com massa molecular aparente próxima ao esperado de 76,8 kDa em todos os clones contendo o vetor recombinante pET19b-*xpdaptc*, o que corresponde a provável expressão da rX-PDAPTc. Essa banda não foi observada no clone contendo o vetor pET19b sem o inserto (Fig. 15A). Outra banda próxima a 160 kDa foi induzida nos mesmos clones e que estava ausente na colônia contendo apenas o vetor vazio. (Fig. 15A e B). A indução da proteína foi corroborada por *immunoblotting* utilizando o anti-His tag (dados não mostrados).

A rX-PDAPTc expressou-se quase que exclusivamente como corpo de inclusão, na sua forma insolúvel e provavelmente não apresentando atividade (Fig. 15A). Para otimizar a expressão e tentar estabelecer o protocolo de indução para obtenção da proteína solúvel, foram testadas outras condições de IPTG e temperatura. Utilizando-se 0,5 mM de IPTG, a 20 ^{o}C por 16 h e sob agitação de 200 rpm, notou-se que a rX-PDAPTc permanecia, em maior quantidade, insolúvel, mas ocorreu um aumento considerável na sua expressão solúvel, o que viabilizaria a purificação da proteína nessas condições (Fig. 15B chave 4).

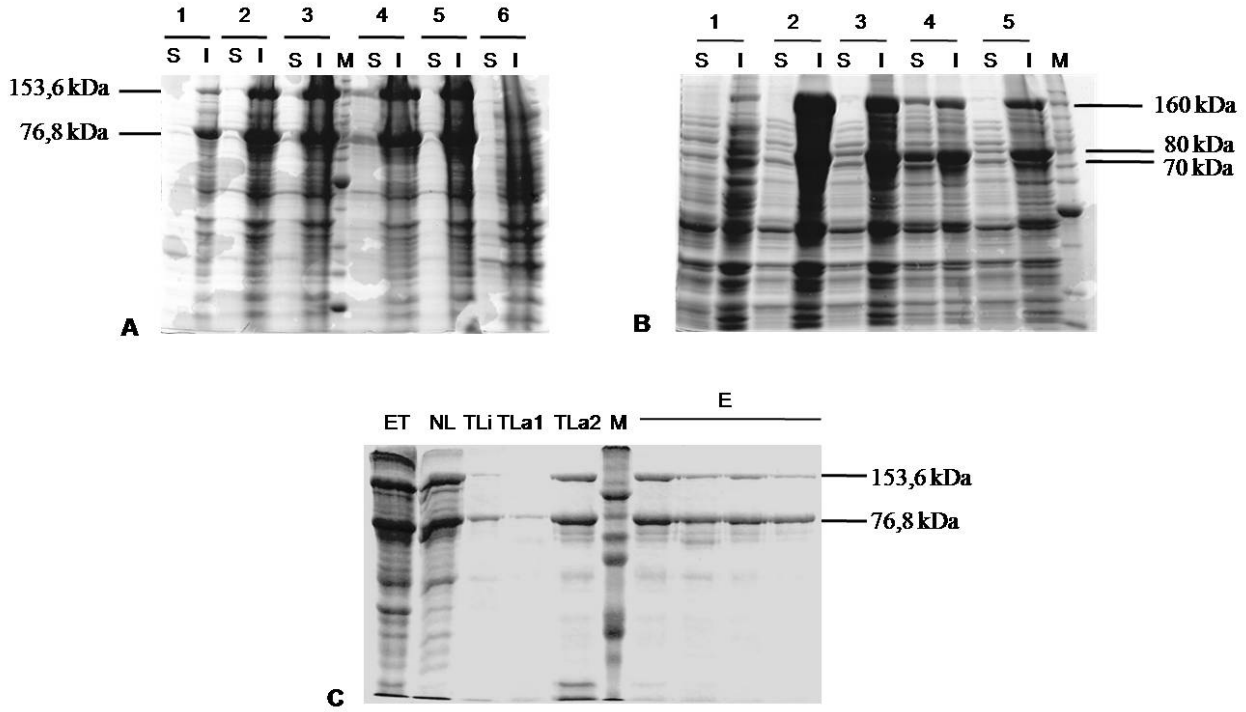

Figura 15. **Análise eletroforética de expressão heteróloga e purificação da rX-PDAPTc. S**eis diferentes clones resultantes da transformação de *E. coli* BL21 com os vetores pET19b-*xpdaptc* ou pET19b vazio foram induzidos e analisados por SDS-PAGE 10%. **A** - Indução com 1 mM de IPTG, 37 ^{o}C, 200 rpm por 5 h,. Lise por Bug Buster (Novagen); **1** – clone cinco; **2** – clone quatro; **3** – clone três; **4** – clone dois; **5** – clone um; **6** – pET19b vazio; **S** – fração solúvel; **I** – fração insolúvel. **B** - Indução do clone cinco em várias concentrações de IPTG a 20 ^{o}C, 200 rpm, por 16 h. Lise por Bug Buster; **1** – 0,1 mM de IPTG; **2** – 0,2 mM de IPTG; **3** – 0,3 mM de IPTG; **4** – 0,5 mM de IPTG; **5** – 0,7 mM de IPTG; **S** – fração solúvel; **I** – fração insolúvel. **C –** Purificação da rX-PDAPTc. Lise por sonicação. **ET –** extrato total; **NL –** fração não-ligada; **TLi –** tampão de ligação com 10mM imidazol; **TLa1 -** tampão de lavagem com 60 mM de imidazol; **TLa2 -** tampão de lavagem com 250 mM de imidazol; **E -** eluição; M – marcador.

Essa condição foi repetida várias vezes e em todas elas a rX-PDAPTc apresentou-se solúvel em quantidade muito reduzida (dados não mostrados). Portanto a purificação foi realizada utilizando-se a fração insolúvel do lisado, em condições desnaturantes, e a rX-PDAPTc foi eluída com 1M de imidazol, pura e em grande quantidade (Fig. 15C). As amostras contendo a proteína recombinante purificada foram utilizadas como imunógeno.

4.3. rGSTc

Com o objetivo de facilitar a obtenção da proteína recombinante utilizou-se o vetor pGEX4-T-3. Os plasmídeos do tipo pGEX apresentam o gene da Glutationa S-transferase (GST) de *Schistosoma japonicum* fusionado ao gene de interesse. Essa proteína apresenta uma massa molecular de 26 kDa e a GSTc tem uma massa molecular teórica de 58,6 kDa. A proteína recombinante rGSTc fusionada à proteína GST de *S. japonicum* (rGSTc-GST) apresentaria, quando induzida, uma massa molecular de 84,6 kDa.

A indução da rGSTc_GST desenvolvida com os clones positivos da transformação do pGEX 4-T-3- *gstc* em C43 (DE3) foi realizada com 0,5 mM de IPTG a 36 ^{o}C e 180 rpm em diferentes tempos. As amostras foram coletadas no tempo zero de indução e com 1 h, 2 h e 4 h e os extratos totais analisados por SDS-PAGE. Os resultados demonstram a presença de uma banda proeminente entre 80 e 90 kDa, próxima ao tamanho esperado, que se intensifica de acordo com o decorrer do tempo de indução e que não aparece no tempo zero (Fig. 16 A).

Os próximos experimentos contemplaram as tentativas em se obter a proteína rGSTc-GST solúvel, utilizando concentrações reduzidas de IPTG e em temperatura de 37 e 20 ^{o}C por 3 h . Em todas as condições testadas o plasmídeo pGEX 4-T-3- *gstc* foi induzido satisfatoriamente e a banda correspondente à proteína foi verificada quase que exclusivamente no corpo de inclusão (Fig 16 B e C).

Utilizou-se, então, concentrações extremamente reduzidas de IPTG (de 0,0125 mM até 0,5 mM) e temperaturas variando de 15 a 30 ^{o}C, em tempos de indução de 4 ou 16 h. Além disso, a lise bacteriana foi realizada tanto por uma solução de lise comercial patenteada (Bug Buster) quanto por sonicação para verificar o efeito na solubilidade da proteína. Nessa situação, constatou-se uma banda de 84,6 kDa solúvel, mas em quantidade reduzida, apenas na indução com 0,05 mM de IPTG, a 17 ^{o}C, por 16 h, sob agitação de 180 rpm e lise por sonicação (Fig. 16D). Como alternativa de obtenção da proteína, realizou-se a indução na condição em que se obtinha uma grande quantidade de corpos de inclusão (0,5 mM de IPTG a 37 ^{o}C durante 4 h). O material lisado foi aplicado a géis de poliacrilamida 8% e a banda correspondente à rGSTc-GST (84,6 kDa) foi excisada.

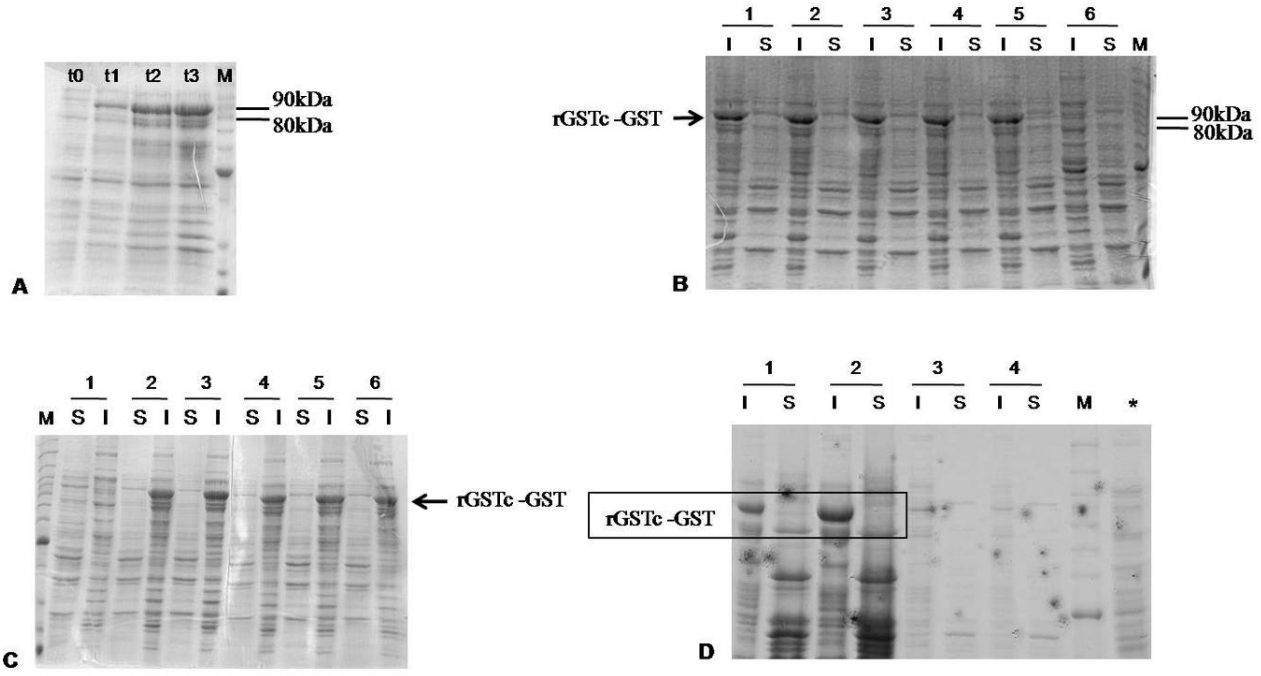

Figura 16. **Análise em SDS-PAGE 8% da expressão heteróloga de rGSTc-GST em diferentes condições. A –** Perfil de expressão rGSTc-GST em diferentes tempos, utilizando 0,5 mM de IPTG a 36 ^{o}C e 180 rpm. Lise por SDS 10% e fervura. **t0 –** sem indução; **t1 –** indução por 1 h ; **t2 –** indução por 2 h; **t3 -** indução por 4 h. **B e C –** Indução da proteína rGSTc-GST a 37 e 20 ^{o}C, respectivamente, por 3 h com concentrações de IPTG até 0,5 mM. Lise por Bug Buster (Novagen). **B – 1-** IPTG 0,5 mM; **2 –** IPTG 0,4 mM; **3 –** IPTG 0,3 mM**; 4 –** IPTG 0,2 mM**; 5 –** IPTG 0,1 mM**; 6 -** sem IPTG; **S –** fração solúvel; **I –** fração insolúvel. M – marcador. **C - 1 -** sem IPTG; **2 –** IPTG 0,1 mM; **3 –** IPTG 0,2 mM; **4 –** IPTG 0,3 mM; **5 -** IPTG 0,4 mM; **6 –** IPTG 0,5 mM; **S –** fração solúvel; **I –** fração insolúvel. **D-** Indução da rGSTc-GST com 0,05 mM de IPTG por 4 h ou 16 h a 17 ^{o}C e 180 rpm. Lise por Bug Buster ou Sonicação. **1 –** 16 h e sonicação; **2 –** 16 h e Bug Buster; **3 –** 4 h e sonicação; **4 –** 4 h e Bug Buster. **S** - fração solúvel**; I –** fração insolúvel; M – marcador; ***** - sem IPTG; Géis de poliacrilamida 8%.

Outra estratégia utilizada na tentativa de se obter a proteína rGSTc solúvel foi a indução de algumas colônias da transformação da BL21 Star com vetor pET28a^{+}- *gstc*. Essas induções foram realizadas com 1, 0,5 e 0,25 mM de IPTG a 20 ^{o}C ou 37 ^{o}C por 4 h ou 16 h. Em todos os experimentos observou-se uma banda com tamanho de aproximadamente 60 kDa em conformidade com a massa teórica esperada da proteína recombinante de 58,6 kDa. Essa banda não foi observada na indução do vetor pET28a^{+} vazio, sugerindo expressão da rGSTc (Fig. 17A).

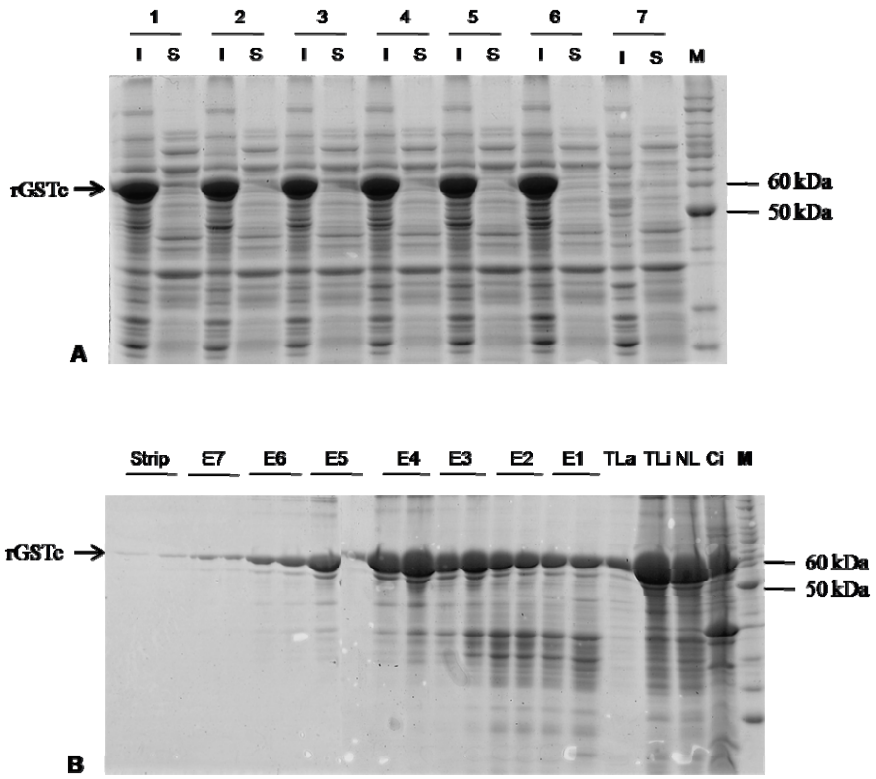

Figura 17. **Análise em SDS-PAGE 12% de indução do pET28a+-*gstc* e purificação da rGSTc. A –** Indução de três clones contendo pET28a+-*gstc* ou pET28a+ a 20 ^{o}C por 4 h com concentrações variadas de IPTG. Lise por Bug Buster. **1 ao 3 –** colônia um**; 4 ao 6** – colônia sete; **1** – 1 mM IPTG, colônia 1; **2 -** 0,5 mM IPTG, colônia 1; **3 –** 0,25 mM IPTG, colônia 1; **4 -** 1 mM IPTG, colônia 7; **5 –** 0,5 mM IPTG, colônia 7; **6 -** 0,25 mM colônia 7; **7 –** Indução do pET28a+ vazio. **S –** fração solúvel; **I** - fração insolúvel; M **–** Marcador. **B –** Purificação da proteína rGSTc utilizando coluna de afinidade Ni^{+} sob condições desnaturantes com uréia 6 M. O extrato bacteriano foi lisado por sonicação. **Ci –** corpos de inclusão preparados; **NL -** proteína não-ligada; **TLi –** tampão de ligação; **TLa -** tampão de lavagem; **E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 -** eluições utilizando 100, 200, 300, 400, 500, 600 ou 700 mM de imidazol; M - marcador.

A proteína rGSTc em sua forma solúvel foi observada quando a indução foi realizada a 20 ^{o}C por 4 h com IPTG 1 mM, mas ainda em pouca quantidade para purificação (Fig. 17A). Então, a rGSTc foi purificada a partir da fração insolúvel, semelhante à rX-PDAPTc. A proteína foi eluída pura a partir de 400 mM de imidazol e as amostras que continham uma boa quantidade da proteína (E4, E5 e E6) foram utilizadas para imunização (Fig.17B).

5. Produção de anticorpo e expressão das proteínas em *T. cruzi.*

Para os testes de imunização dos camundongos utilizou-se 5µg de proteína recombinante/ camundongo para cada etapa. Em relação à rOPBsTc foi possível verificar que após a purificação obtinha-se essa proteína em concentração reduzida e insuficiente para imunização (Fig. 14C). Devido à pequena expressão da proteína, foi necessário a realização de purificações em larga escala que resultaram em um grande volume final. Esse volume total foi concentrado por precipitação.

Foram testados três protocolos de precipitação, com TCA 100%, acetona gelada e metanol/clorofórmio. Esses experimentos foram realizados conforme descrito nos materiais e métodos. Após precipitação, verificou-se a banda da rOPBsTc (103,4 kDa) intensificada em todos os protocolos utilizados, porém bem mais aparente utilizando-se acetona gelada, o qual foi selecionado para se obter a proteína em concentração adequada para imunização (Fig. 18A). As rX-PDAPTc e a rGSTc foram obtidas em quantidade suficiente para imunização, não sendo necessária a precipitação (Fig. 15C; 17B).

As frações purificadas da rOPBsTc, da rX-PDAPTc e da rGSTc e a banda extraída do gel de poliacrilamida da rGSTc-GST foram empregadas na imunização dos camundongos. Os soros da rGSTc e da rGSTc-GST serão testados e caracterizados futuramente. Já os soros pré-imune e imune da rOPBsTc e da rX-PDAPTc foram submetidos aos testes de *immunoblotting* para caracterização dos anticorpos policlonais obtidos. O anticorpo anti-X-PDAPTc obtido foi testado contra o extrato total de *E. coli* com o pET19b-*xpdaptc* induzido e o extrato protéico total de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Este experimento revelou que o anticorpo localiza as formas nativa e recombinante da X-PDAPTc (Fig. 18C), resultado não observado quando realizado nas mesmas condições anteriores porém utilizando-se o soro pré-imune. Esses anticorpos policlonais serão utilizados, futuramente, em análises de imunofluorescência.

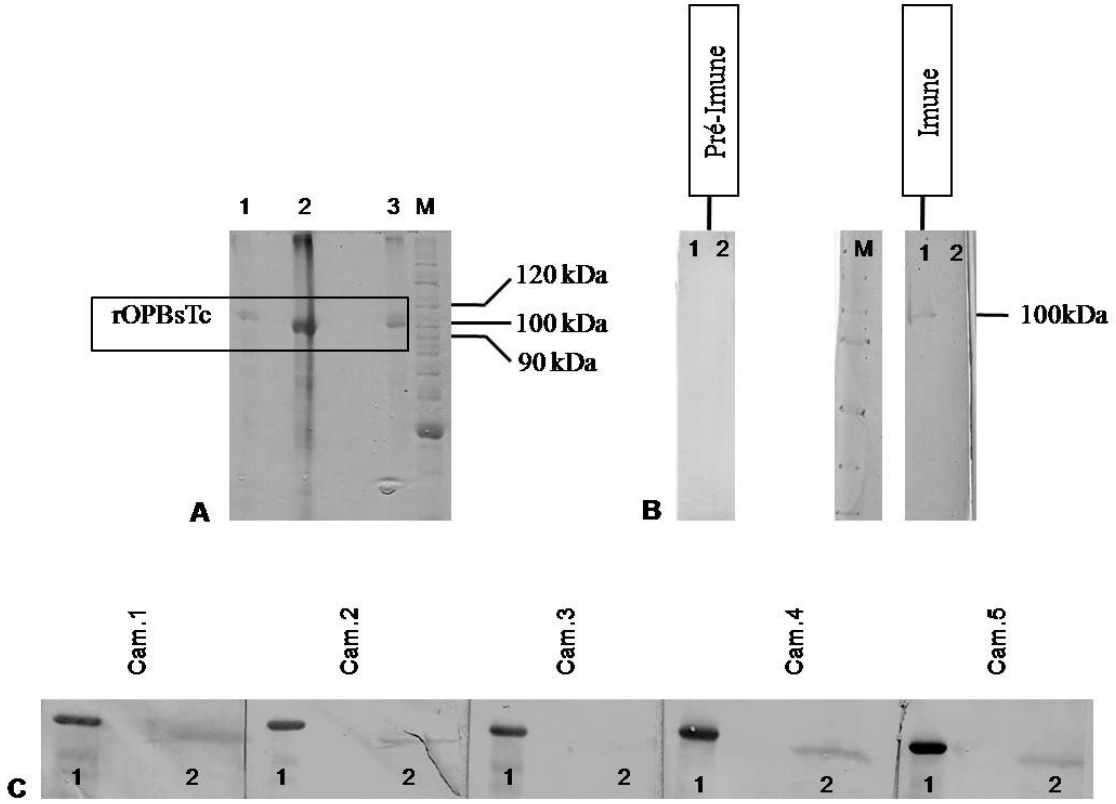

Figura 18. **Produção e caracterização dos anticorpos anti-OPBsTc e anti-X-PDAPTc. A** – Precipitação da rOPBsTc com: **1** – TCA 100%; **2** - acetona; **3** - clorofórmio/metanol; M - Marcador BenchMark. **B** – *Immunoblotting* utilizando o soro imune ou pré-imune para caracterização do anti-OPBsTc (1:200). **1** - Extrato total de *E. coli* com o vetor pET19b-*opbstc.* **2** – Extrato total de epimastigotas. M – Marcador Precision Plus Dual Color. **C** – Imunoblotting com soro de 5 camundongos imunizados e analisados para a caracterização do anticorpo anti-X-PDAPTc (1:200). **1** - Extrato total de *E. coli* com o vetor pET19b-*xpdaptc.* **2** – Extrato total de formas epimastigotas de *T. cruzi.*

A rOPBsTc é imunogênica em camundongos porque induziu a formação de anticorpos específicos, como pode ser observado na figura 18. Desta forma, este soro foi empregado em *immunobloting* para saber se formas epimastigotas de *T. cruzi* expressam a OPBsTc. Nas condições em que esse experimento foi realizado, estes anticorpos não revelaram quaisquer bandas protéicas em extrato total de *T. cruzi* (Fig. 18B). Como teste complementar, realizou-se uma imunofluorescência (IF) utilizando o anticorpo anti-OPBsTc, para verificar se a proteína OPBsTc estava presente em epimastigotas e nas outras formas de desenvolvimento do *T. cruzi.* Nesse experimento, formas epimastigotas, tripomastigotas ou amastigotas foram incubadas com o soro pré-imune ou imune, e em seguida, com anti-IgG de camundongo-Alexa 488 (fluoresce verde) e DAPI (azul). Foi possível

verificar a marcação do DNA nuclear e do cinetoplasto pelo DAPI (Fig. 19A), mas não a fluorescência do resultante da formação do complexo anticorpo-OPBsTc nativa em tripomastigotas e amastigotas (Fig. 19), assim como em epimastigotas (dados não mostrados).

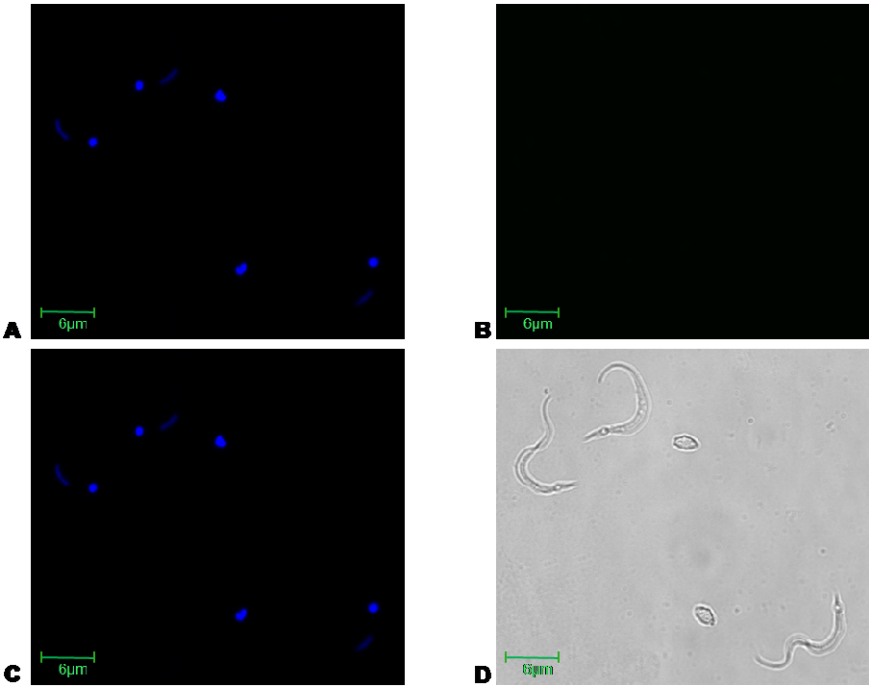

Figura 19. **Anticorpos anti-rOPBsTc não reconhecem a proteína nativa em formas de*T. cruzi.*** A IF foi realizada com parasitos fixados e permeabilizados. O soro imune foi utilizado como primeiro anticorpo (1:50) e o segundo, IgG-Alexa Fluor 488, na diluição 1:200 (verde) . O DNA foi corado com DAPI (azul). **A** – DAPI; **B –** soro imune e Alexa 488; **C** – sobreposição das imagens de A e B; **D** - contraste de fase.

6. Transcrição dos genes *opbstc* e *xpdaptc*

A presença de transcritos dos genes *opbstc* e *xpdaptc* em *T. cruzi,* foi estudada por RT-PCR, utilizando o cDNA sintetizado a partir do RNA total de formas epimastigotas. Como controle positivo da reação, utilizou-se os iniciadores do gene *hprt*, que é constitutivamente expresso e codifica a hipoxantina-guanina fosforibosiltranferase, uma enzima metabólica fundamental envolvida na reciclagem de bases púricas de nucleotídeos degradados (Lee *et alii,* 2001). As reações de amplificação revelaram a banda correspondente ao gene *xpdaptc* amplificada a partir de DNA genômico ou de

cDNA (Fig. 20, coluna 5 e 6). Já em relação ao gene *opbstc,* foi observada a banda quando se utilizou o DNA genômico, mas não foi possível visualizar qualquer produto quando se utilizou o cDNA (Fig. 20, coluna 2 e 3).

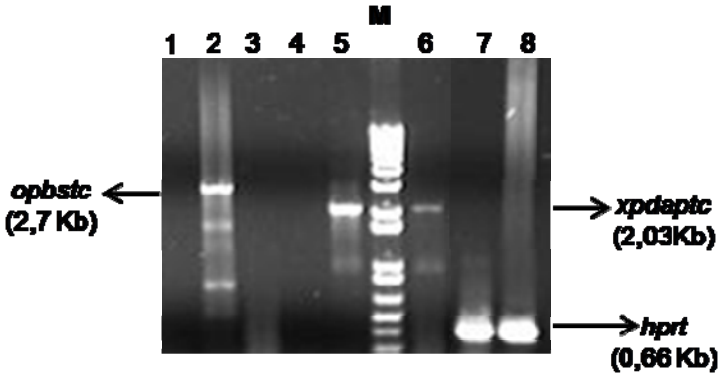

Figura 20. **Análise da transcrição dos genes *opbstc* e *xpdaptc* em *T. cruzi.*** RT-PCR utilizando o mRNA ou DNA extraído de culturas de formas epimastigotas de *T. cruzi* . **1 e 4 –** controle negativo; **2 -** DNA de *T. cruzi* e iniciadores senso e anti-senso do gene *opbstc;* **3 –** cDNA de *T. cruzi* e iniciadores senso e anti-senso do gene *opbstc.* **5** - DNA de *T. cruzi* e iniciadores senso e anti-senso do gene *xpdaptc.* **6 -** cDNA de *T. cruzi* na presença de iniciadores senso e anti-senso do gene *xpdaptc;* **7 -** DNA de *T. cruzi* mais iniciadores senso e anti-senso do gene interno que é constitutivamente expresso; **8 -** cDNA de *T. cruzi* e iniciadores senso e anti-senso do gene interno constitutivamente expresso. M **–** Marcador 1 Kb DNA ladder.

DISCUSSÃO

Nos últimos dez anos, algumas iniciativas multinacionais resultaram em reduções significativas do impacto econômico e social da doença de Chagas nas Américas. Porém é um grande erro imaginar que essa doença está controlada, já que altos níveis de transmissão do *T. cruzi* pelo vetor ainda são observados em muitas áreas geográficas e vários países endêmicos ainda carecem de desenvolvimento científico e tecnológico para sustentar programas de intervenção visando ao controle real da infecção (Dias *et alii*, 2002; OMS, 2004; OMS, 2008).

Nesse sentido, as pesquisas sobre o parasito, o agente transmissor e os mecanismos envolvidos na interação entre o patógeno e o hospedeiro têm despertado bastante interesse entre os pesquisadores, uma vez que podem oferecer resultados interessantes para a melhor compreensão da infecção e para a busca de alternativas terapêuticas (Alcami *et alii*, 2004; Yazdani *et alii*, 2006). Por isso, nosso grupo tem se dedicado à caracterização molecular e funcional de enzimas que possam ter funções em processos vitais para o parasito, exibindo características de fatores de virulência e, portanto, de alvos potencias para ação de drogas. Este estudo enfocou duas proteases do *T. cruzi*, a oligopeptidase B símile (OPBsTc) e a X-prolil dipeptidil aminopeptidase (X-PDAPTc) e uma proteína metabólica, a glutationa sintetase (GSTc).

Análises *in silico* revelaram a ausência de ortólogos em mamíferos para OPBsTc e X-PDAPTc, bem como pouca identidade de sequência entre a GSTc e a glutationa sintetase de humanos (apenas 26%). Consequentemente há possibilidade de que os sítios ativos dessas enzimas não tenham similares em mamíferos. Essa característica é bastante desejada porque pode representar alvos específicos para o desenvolvimento de quimioterápicos bastante seletivos, o que resultaria em uma provável redução dos efeitos colaterais que são observados na terapia atualmente utilizada (Urbina, 2001). Os efeitos colaterais da medicação utilizada pelos pacientes, na maioria das vezes, estão associados com a redução da adesão ao tratamento e à falha terapêutica. Portanto, medicamentos específicos com efeitos indesejáveis minimizados são extremamente adequados (Fumaz *et alii*, 2009).

Os resultados de bioinformática revelaram algumas informações importantes. A sequência da OPBsTc tem homologia significativa com as demais em cinetoplastídeos patogênicos (Tabela 1) o que poderia ser esperado, já que outros trabalhos demonstram comumente a existência de sequências protéicas conservadas entre esses organismos (Ivens *et alii*, 2005; El-Sayed *et alii*, 2005). A OPBsTc,

apesar de possuir a tríade característica da família de serino-protease, apresenta uma sequência de resíduos de aminoácidos bem distinta em comparação com a OPBTc, o que poderia sugerir um estudo para re-classificação para essa proteína, uma vez que no geneDB ela é descrita, assim como a OPBTc, membro da família POP (GeneDB, 2009). A OPBsTc tem uma extensão C-terminal, ausente na OPBTc, com tamanho de 105 aminoácidos. Extensões do tipo C-terminal já foram observadas em algumas proteínas de cinetoplastídeos e parecem não serem necessárias para atividade enzimática. Geralmente esses domínios não apresentam funções precisas e caracterizadas ainda, apesar de estudos terem demonstrado que a extensão C-terminal provavelmente está relacionada com a polarização da resposta imunológica para Ta1 em *L. amazonensis* (Mottram *et alii,* 1989; Guedes *et alii,* 2008; Williams *et alli,* 2003).

A X-PDAPTc também compartilha considerável identidade de sequência com ortólogos presentes em outros cinetoplastídeos, com exceção de *T. brucei e L. amazonensis* (Tabela 2). Além de espécies diferentes, apesar de filogeneticamente próximas, é preciso considerar que o ciclo de vida destes parasitos diferem bastante daqueles de *T. cruzi* e outras espécies de *Leishmania* spp. E, portanto, é natural que eles não compartilhem todos os genes (El-Sayed *et alii*, 2005). Julgamos que seria de valor a expressão desta proteína em *T. brucei,* visando obtenção de fenótipo particular. De qualquer forma, é também necessário ter em conta que produtos de expressão de genes diferentes compartilham funções similares.

A sequência primária de GSTc é significativamente conservada entre os cinetoplastídeos, semelhante ao que se observou com a OPBsTc (Fig. 9). O fato dos genes da GSTc e da X-PDAPTc não terem sido encontrados em *L. amazonensis* pode ser explicado pelo reduzido seqüenciamento de genes desta espécie (Gentil *et alii*, 2007). O alto grau de identidade de sequências entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. revela a possibilidade de que uma droga desenvolvida para uma destas espécies possa ser útil também para outra. Isto porque identidade de sequência normalmente resulta em similaridade de sitios ativos de enzimas. Como a droga desenvolvida normalmente é um inibidor e, portanto, molécula ligadora de sítio ativo, um inibidor de uma enzima pode servir pelo menos de base para concepção racional de novos inibidores considerando a arquitetura molecular do alvo. O trabalho que trata do desenvolvimento de inibidores da POPTc80 é exemplo de que a química combinatória se insere neste contexto (Grellier *et alii*, 2001). .

Devido às análises de bioinformática aliadas à escassez de informações na literatura sobre a oligopeptidase B e a X-prolil dipeptidil aminopeptidase em outros organismos e também à importante

participação no metabolismo redox da glutationa sintetase, as sequências gênicas de cada proteína foram clonadas (Repetto *et alli*, 1996). Os fragmentos foram amplificados no tamanho esperado, em quantidade suficiente e com relativa pureza (Fig. 10).

Os vetores pGEM-T da promega e o pCR2.1 da Invitrogen foram selecionados de acordo com trabalhos anteriores que demonstraram sucesso na clonagem de genes (Topcu, 2000; Ferchichi *et alii*, 2008). Os genes *gstc* e *opbstc* também foram clonados no pGEM-T Easy, mas em relação ao *opbstc,* existiu uma dificuldade de separar os fragmentos correspondentes ao inserto e ao vetor por digestão sem que houvesse contaminação do inserto, afetando negativamente a seleção na próxima etapa de clonagem (dados não mostrados). Isso foi verificado porque o inserto *opbstc* apresenta um tamanho próximo àquele do vetor pGEM-T, 2712 pb e 3015 pb respectivamente, difícil de ser separado e resolvido em gel de Agarose. Já que essa contaminação poderia dificultar a próxima etapa de clonagem escolheu-se o vetor mais apropriado (dados não mostrados).

O resultado das análises de restrições visualizado em gel de Agarose demonstrou claramente a liberação de fragmentos no tamanho próximo ao esperado tanto para os inserto quanto para os vetores (Fig. 11). E à partir dessa análise foram realizadas as etapas de excisão de bandas e purificação do DNA para ligação nos vetores de expressão. Nessa fase, a seleção dos vetores, pET19b, pET28a+ e pGEX-4-T-3, foi realizada de acordo com resultados de outros trabalhos e com a disponibilidade no laboratório (Passaglia *et alii*, 1998; Rea *et alii*, 2006).

Realizou-se a ligação entre os insertos e os plasmídeos em várias condições de temperatura, tempo de incubação, proporção molar de vetor:inserto, inclusive utilizando-se outros vetores de expressão além dos citados, como o pFast Bac HTA e pDEST 17, ambos da Invitrogen. Registramos uma extrema dificuldade de clonagem dos genes de *T. cruzi* em vetores de expressão, sem explicações racionais. Nesse trabalho, a clonagem só foi verificada após inúmeras tentativas utilizando várias condições, reagentes e células competentes de diferentes fontes. As colônias obtidas em condições favoráveis foram utilizadas para triagem, revelando posteriormente, o sucesso da clonagem dos três genes (Fig 12 e 13). As análises de restrição enzimática são extremamente eficazes nessa fase de triagem e permitem visualizar as bandas e confirmar a presença ou ausência do gene no DNA plasmidial extraído e as denominadas pCRs de colônia, que consistem em reações de amplificação, podem oferecer um indício rápido da orientação em que o gene foi inserido. Há, porém, necessidade posterior de sequenciamento para confirmação se o gene encontra-se em fase com a sequência plasmidial e se não surgiram códons de terminação no interior da sequência codificante.

Outra etapa crítica consiste na expressão da proteína recombinante, que pode ser bastante dificultada pelo sistema de expressão utilizado (Rosano *et alii*, 2009); ou pela presença de genes tóxicos que provocam a morte do sistema de expressão (Miroux *et alii*, 1996); ou ainda pelas condições utilizadas para a indução (Joshi *et alii*, 2005). As proteínas rOPBsTc, rX-PDAPTc e rGSTc foram induzidas com IPTG inicialmente para obtenção da expressão proteíca. A rX-PDAPTc (Fig. 15A) e a rGSTc (Fig. 16 e 17A) não apresentaram problemas de indução, sendo expressas em grande quantidade e facilmente visualizada por eletroforese. Porém a rOPBsTc apresentou uma expressão bem reduzida e a possível indução de uma proteína da própria bactéria com tamanho próximo ao da rOPBsTc dificultou a visualização por eletroforese (Fig. 14A), sendo necessários testes adicionais de *immunoblotting* com anti-His tag, uma cauda específica da proteína recombinante, que por serem mais sensíveis e específicos permitem a marcação até mesmo de quantidades mínimas de proteína (Gallagher *et alii*, 2008). Nesse teste foi possível corroborar a expressão da rOPBsTc (Fig 14B) no tamanho próximo ao relatado no banco de dados confirmando mais essa informação teórica, sendo essas informações também confirmadas para a rX-PDAPTc e a rGSTc (GeneDB, 2009).

Apesar da expressão das três proteínas recombinantes em estudo, nesse primeiro momento, as mesmas foram observadas praticamente apenas na fração protéica insolúvel, sendo caracterizadas como corpos de inclusão. Os corpos de inclusão são agregados insolúveis originados do enovelamento incorreto da proteína, comumente associados à expressão de proteínas recombinantes e que resulta, geralmente, na perda da atividade protéica (LaVallie & McCoy, 1995). Para obtenção da proteína solúvel iniciaram-se tentativas de indução. Sabe-se que a manipulação das concentrações do agente indutor, valores de temperatura de indução e do tempo de indução podem aumentar consideravelmente a quantidade de proteína solúvel obtida (Yan *et alii*, 2006). Em adição, outros sistemas de expressão serão considerados na tentativa de obtenção destas proteínas solúveis e ativas. É intrigante notar que proteínas com identidade de sequencia superiores a 70% comportam-se diferentemente em sistemas de expressão heteróloga. Por exemplo, a POPTc80 é expressada quase que inteiramente desnaturada, enquanto que seu ortólogo de *T. brucei* aparece em grande quantidade na forma solúvel e ativa no mesmo sistema de expressão (nossos dados não publicados).

Outro fator que pode influenciar na solubilidade das proteínas induzidas consiste nos mecanismos de lise bacteriana. Assim, comparamos a lise por Bug Buster (Novagen) e por sonicação no gelo; ambas resultaram apenas na rOPBsTc insolúvel (dados não mostrados). Outras proteínas de *T. cruzi* produzidas recombinantes em nosso laboratório desnaturam-se na presença de Bug Buster (dados

não mostrados), semelhante ao que acontece com a rGSTc-GST (Fig. 16D). Outro agravante que pode contribuir para o depósito da proteína apenas como corpos de inclusão consiste na cepa da bactéria utilizada durante a indução (Miroux *et alii*, 1996). Entretanto, testes de indução da rOPBsTc em cepas diferentes de *E. coli* não resultaram em proteína solúvel (dados não mostrados).

Em relação às tentativas de indução da rX-PDAPTc, ao se diminuir a temperatura e a concentração de IPTG (0,5 mM IPTG a 20 ^{o}C) foi possível verificar um aumento da expressão de sua forma solúvel (Fig. 15B), confirmando o quanto esses parâmetros podem ser importantes na determinação da solubilidade (Yan *et alii*, 2006). Provavelmente, quando se diminui a temperatura e o agente indutor, acredita-se que a bactéria tenha seu metabolismo reduzido, o que pode proporcionar um maior tempo para que a proteína recém-sintetizada se enovele na forma correta, diminuindo-se a formação de corpos de inclusão (Cabrita *et alii*, 2004). Porém esse resultado não foi reproduzido em várias outras tentativas, demonstrando algum outro determinante não observado até o momento. Portanto, outros testes estão sendo realizados no intuito de se obter novamente a rX-PDAPTc solúvel para viabilizar as análises de atividade e caracterização da proteína.

Observando o gel de eletroforese correspondente à indução da rX-PDAPTc (Fig. 15 A e B) houve a indução concomitante de uma banda com tamanho próximo a 153,6 kDa, quase o dobro da massa molecular da rX-PDAPTc (76,8 kDa), o que poderia demonstrar que essa proteína apresenta uma estrutura dimérica. Essa afirmativa seria plausível, uma vez que já foi descrito na literatura, que a X-Prolil dipeptidil aminopeptidase de bactérias láticas, como a *Lactococcus lactis*, são diméricas e intracelulares (Rigolet, 2002). Já a X-prolil dipeptidil aminopeptidase de *Streptococci* são descritas como monoméricas ancoradas à parede celular (Goldstein, 2001). Porém para se confirmar essa hipótese de dimerização são necessários estudos mais aprofundados sobre as estruturas tridimensionais da proteína, apesar de alguns testes preliminares de espectrometria de massa terem demonstrado que a rX-PDAPTc pode ser dimérica realmente (dados não mostrados).

A expressão da rGSTc foi obtida tanto com a indução do pGEX 4-T-3- *gstc* quanto com a indução do pET28a^{+}-*gstc*. Para o primeiro vetor recombinante a proteína foi expressa fusionada à proteína GST de *S. japonicum* em grande quantidade, mas na sua forma insolúvel. As tentativas de obtenção da proteína recombinante constaram em reduções extremas de IPTG e de temperatura. Nesse sentido, foi possível verificar que o pGEX 4-T-3 propiciou um elevado índice de indução mesmo em presença de concentrações bem reduzidas de IPTG (Fig. 16 B e C), baixa temperatura e em apenas três horas. Esse fato foi reportado, anteriormente, quando relacionado à vetores de expressão fusionado à

GST e como alternativa sugeriu-se a indução com concentrações menores do que 0,1 mM de IPTG e temperaturas ainda menores que 20 ^{o}C por um tempo maior (Leow *et alii*, 2006).

Nessas condições, foi possível observar um aumento da quantidade de rGSTc-GST solúvel e uma redução da proteína insolúvel, quando utilizou-se a lise por sonicação (Fig. 16 D). Essa quantidade solúvel foi praticamente extinguida quando a lise bacteriana aconteceu por Bug Buster, demonstrando mais uma vez a importância desse parâmetro na manutenção da solubilidade da proteína. Apesar dos esforços, a quantidade de proteína solúvel ainda era muito pequena para ser utilizada nos testes de atividade. Portanto, foi utilizada nova estratégia que consistiu na clonagem do gene *gstc* em outro vetor de expressão, o pET28a^{+}. A rGSTc foi obtida em sua forma solúvel na indução do pET28a^{+}-*gstc* a 20 ^{o}C por 4 h com 1mM IPTG, mas ainda em pouca quantidade para purificação (Fig. 17 A). Novos experimentos estão sendo realizados utilizando-se outros parâmetros para que a proteína possa ser expressa em sua forma ativa.

Portanto, apesar da dificuldade em se obter as proteínas rOPBsTc, rX-PDAPTc e rGSTc solúveis e ativas, suas formas insolúveis podem ser utilizadas para purificação e produção de anticorpos capazes de fornecerem informações importantes à respeito da presença e localização dessas proteínas nos parasitos (Gallagher *et alii*, 2008). Nesse sentido, essas proteínas foram purificadas das frações insolúveis do lisado bacteriano, com pureza necessária observada por eletroforese para imunização (Fig. 14 C, 15 C e 17 B) ou então, no caso da rGSTc fusionada à GST (rGSTc-GST), a banda correspondente foi excisada do gel para as imunizações. Esse procedimento é bastante eficiente, sendo utilizado para produção de anticorpos contra proteínas de difícil purificação, mas pode resultar em anticorpos pouco específicos capazes de se ligarem em vários epítopos diferentes (Gallagher *et alii*, 2008). Além disso, outra preocupação consistia na possibilidade da banda excisada correspondente à rGSTc-GST ser capaz de produzir anticorpos também contra a GST de camundongos e/ou a GST do parasito, resultando em reações cruzadas do anticorpo e mascarando os resultados futuros. Essa possibilidade foi atenuada uma vez que alinhamentos não revelaram identidade significativa entre as sequências de GST do camundongo e do *T. cruzi* ou entre estas e a sequência da GST do *Schistosoma japonicum* que corresponde à proteína presente na rGSTc-GST (dados não mostrados). Os anticorpos obtidos utilizando-se a rGSTc e a rGSTc-GST, que serão caracterizados futuramente, poderão ser comparados entre si quanto a especificidade, para confirmar realmente se a fusão de GST não interfere nos resultados, garantindo a qualidade do anticorpo.

Já os anticorpos produzidos contra a rOPBsTc e a rX-PDAPTc foram avaliados quanto a capacidade de reconhecimento dos epítopos das proteínas específicas e quanto a seletividade dessa ligação em extrato bacteriano contendo o plasmídeo recombinante induzido e em extrato de formas epimastigotas *T. cruzi*. Nesse sentido foi revelada a banda que corresponde à expressão da proteína X-PDAPTc nativa em extrato de parasito e recombinante em extrato bacteriano (Fig. 18 C). Esses resultados demonstraram que realmente essa proteína é expressa nessa forma de desenvolvimento do parasito e que o gene *xpdaptc* não é um pseudogene, sendo transcrito e posteriormente traduzido (Zhou *et alii*, 2008). Outros testes de imunodetecção serão realizados para verificar a expressão dessa proteína em outras formas do parasito, bem como se existe expressão diferencial. Em extrato de *T. cruzi*, a X-PDAPTc apresentou-se, como esperado, com uma banda pouco inferior à banda da proteína recombinante, uma vez que a rX-PDAPTc apresenta a inserção de uma cauda de nove resíduos de histidina (His-tag) e que pode alterar um pouco o seu tamanho.

Nos testes de imunodeteção utilizando-se o anticorpo anti-OPBsTc produzido, diferentemente do relatado para a X-PDAPTc, foi observado, após revelação, apenas a banda correspondente à proteína recombinante no extrato bacteriano (Fig. 18B). Nessas condições poderiam ser atestadas duas hipóteses, a primeira de que a titulação do anticorpo utilizada não foi suficientemente capaz de reconhecer a proteína nativa que geralmente é expressa em menor quantidade, principalmente porque a marcação da proteína recombinante rOPBsTc superexpressa observada no extrato bacteriano foi bem fraca quando comparada, por exemplo, com a marcação da rX-PDAPTc (Fig. 18 B e C); a segunda de que a OPBsTc não é expressa nessa forma do parasito.

No intuito de se verificar as duas hipóteses foram realizados testes complementares. Em relação à primeira possibilidade, os experimentos de imunodetecção foram repetidos por mais três vezes em menor titulação do soro, inclusive com controle positivo, e o mesmo resultado foi reproduzido (dados não mostrados). Em relação à segunda hipótese, realizaram-se análises de RT-PCR para verificar se pelo menos o gene *opbstc* era transcrito em mRNA nas formas epimastigotas do *T. cruzi*, e a ausência de transcrito observada no resultado contribui para a afirmação de que essa proteína não é expressa por estas formas do parasito. Há relatos na literatura de expressão diferencial de proteínas entre as diferentes formas de desenvolvimento de parasitos (Silber *et alii*, 2009). Essas proteínas geralmente são bastante importantes para a forma de desenvolvimento em que elas são expressas participando de mecanismos específicos no patógeno (Silber *et alii*, 2009; Mortara *et alii*, 2005).

Testes de imunofluorescência com o anti-OPBsTc não detectaram a presença da enzima em formas amastigotas e tripomastigotas. A oligopetidase B de *T. cruzi* e de *L. amazonensis* parece estar presente em todas as fases de desenvolvimento do parasito (Burleigh *et alii*, 2002; Guedes *et alii*, 2008). Porém até o momento o único relato sobre a oligopeptidase B-símile descreve a presença do transcrito nas formas promastigotas procícilicos, promastigotas metacíclicos e amastigotas axênicos de *L. major* e *L. amazonensis* (Guedes *et alii*, 2008). Até hoje não existem relatos na literatura de que essa proteína seja realmente expressa em outros organismos em que sua sequência gênica teoricamente está presente. Outro fator que deve ser levado em consideração é a possível expressão da OPBsTc na forma infectante direta liberada pelo triatomínio de tripomastigotas metacícilicos, mas para averiguação dessa possibilidade torna-se necessário o desenho de novos experimentos com essas formas. É necessário considerar ainda que algumas proteínas são expressas exclusivamente durante processos de diferenciação celular. Análise proteômica da diferenciação de *T. cruzi* revelou a manifestação de tal fenótipo (Paba *et alii*, 2004).

Ao longo desse trabalho foi possível iniciar a caracterização de três proteínas que podem representar fatores de virulência do parasito analisando-se todo o retrospecto relatado. Novos experimentos serão realizados com esse objetivo comum. Esse é um importante passo para a busca por novas estratégias e quimioterápicos inéditos contra a doença de Chagas. Sabe-se que as regiões endêmicas ainda são carentes por descobertas capazes de reduzir, principalmente as formas debilitantes da doença e de melhorar a qualidade de vida da população que tem a doença em forma aguda ou crônica. Faz-se necessário discutir, com maior atenção e profundidade, o controle da doença de Chagas na America Latina, buscando sempre o envolvimento de toda a sociedade, em especial da comunidade científica, pois esta desempenha um importante papel na disseminação, inclusive educacional, de informações fidedignas acerca da verdadeira situação de saúde relativa à doença de Chagas no país (Ferreira *et alii*, 2006; Morel *et alli,* 2005).

CONCLUSÕES

Os experimentos realizados nesse trabalho permitem concluir que:

- Não existem sequências ortólogas em humanos da Oligopeptidase B-símile e da X-prolil dipeptidil aminopeptidase e a sequência da glutationa sintetase do parasito não tem homologia significativa com a de humanos;
- A oligopeptidase B e a oligopeptidase B-símile, apesar de serem classificadas na mesma família, são proteínas com sequências bem diferentes, o que pode determinar ação, especificidade e inibição também discrepantes, sugerindo reclassificação das OPBs;
- Os genes coficantes das proteínas em questão foram clonados e as proteínas recombinantes expressas em sua forma insolúvel;
- Os anticorpos anti-OPBsTc e anti-X-PDAPTc produzidos apresentaram especificidade;
- O gene da X-prolil dipeptidil aminopeptidase é transcrito e a proteína é expressa em formas epimastigotas de *T. cruzi*;
- A expressão da oligopeptidase B-símile não foi detectada nas diferentes formas do parasito nessas condições.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas do trabalho e dando continuidade, serão realizados testes para verificar se a Oligopeptidase B-símile realmente não é expressa em epimastigota, tripomastigota e amastigota. Além disso, a existência de expressão diferencial dessa proteína em tripomastigotas metacíclicos será avaliada e em caso afirmativo, vamos iniciar outras clonagens como tentativa de obtenção da proteína ativa e da sua consequente caracterização funcional e molecular, uma vez que ela pode representar um alvo extremamente promissor nesse contexto. Em relação a X-prolil dipeptidil aminopeptidase os testes serão executados no sentido de se obter novamente a proteína solúvel para estudos de atividade e os anticorpos produzidos serão utilizados em testes para verificar a sua citolocalização nas diferentes formas do parasito. Por último, os anticorpos anti-GSTc serão caracterizados e avaliados quanto à especificidade e eficiência para serem utilizados também em testes de imunofluorescência e citolocalização. Outros experimentos serão desenvolvidos para obtenção da proteína solúvel permitindo uma futura caracterização funcional e molecular.

REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS

Abbott, J. J. *et alii.* Substrate binding determinants of trypanosoma brucei gamma-glutamylcysteine synthetase. Biochemistry, v.41, n.8, p.2741-2750. 2002.

Alcami, J. Advances in the immunopathology of HIV infection. Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica, v.22, n.8, Oct, p.486-496. 2004.

Alvarez, V. E. *et alii.* Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Journal of Biological Chemistry, v.283, n.6, p.3454-3464. 2008.

Andrade, H. M., *et alii.* Proteomic analysis of Trypanosoma cruzi resistance to benznidazole. Journal of Proteome Research, v.7, n.6, p.2357-2367. 2008.

Andrews, N.W. *et alii.* A *T. cruzi*-secreted protein immunologically retated to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. Cell, v.61, p.1277-1287.

Arrick, B. A. *et alii.* Inhibition of Glutathione Synthesis as a Chemotherapeutic Strategy for Trypanosomiasis. Journal of Experimental Medicine, v.153, n.3, p.720-725. 1981.

Bacchi, C. J. *et alii.* In vivo efficacies of 5'-methylthioadenosine analogs as trypanocides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.41, n.10, p.2108-2112. 1997.

Barrett, A. J. & McDonald, J. K. Nomenclature - Protease, Proteinase and Peptidase. Biochemical Journal, v.237, n.3, p.935-935. 1986.

Barret, A. J. & Rawlings, N.D. Proteinases. Biochemical Journal, v.19, p. 707-715. 1991.

Barrett, M. P. *et alii.* The trypanosomiases. Lancet, v.362, n.9394, Nov, p.1469-1480. 2003.

Bastos, I. M. D. *et alii.* Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of Trypanosoma cruzi (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. Biochemical Journal, v.388, p.29-38. 2005.

Bestetti, R. B. *et alii.* Justice where justice is due: A posthumous Nobel Prize to Carlos Chagas (1879-1934), the discoverer of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). International Journal of Cardiology, v.134, n.1, May, p.9-16. 2009.

Bilate, A. M. B. & E. Cunha-Neto. Chagas disease cardiomyopathy: Current concepts of an old disease. Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo, v.50, n.2, p.67-74. 2008.

Birago, C. *et alii.* Assay of gamma-glutamylcysteine synthetase activity in Plasmodium berghei by liquid chromatography with electrochemical detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.25, n.5-6, p.759-765. 2001.

Blin, N., Stafford, D.W. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. Nucleic Acids Res., v.3, p.2303-2308. 1976.

Bond, J. S. e P. E. Butler. Endopeptidase-24.5 Is Not a Metalloendopeptidase. Biochemical Journal, v.246, n.2, p.559-559. 1987.

Brener, Z., Andrade, Z.A., Barral, M.N. Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas. Rio de Janeiro, Editora Guanabara. 2000.

Briceno-Leon, R. Chagas disease in the Americas: an ecohealth perspective. Cadernos De Saude Publica, v.25, p.S71-S82. 2009.

Buckner, F. *et alii.* A class of sterol 14-demethylase inhibitors as anti-Trypanosoma cruzi agents. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.100, n.25, p.15149-15153. 2003.

Burleigh, B. A. & Andrews, N. W. A 120-kDa Alkaline Peptidase from Trypanosoma cruzi Is Involved in the Generation of a Novel Ca[IMAGE]-signaling Factor for Mammalian Cells. J. Biol. Chem., v.270, n.10, March 10, 1995, p.5172-5180. 1995.

Burleigh, B. A. & Woolsey, A. M. Cell signalling and Trypanosoma cruzi invasion. Cellular Microbiology, v.4, n.11, p.701-711. 2002.

Buscaglia, C. A. e Di Noia, J. M. Trypanosoma cruzi clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. Microbes and Infection, v.5, n.5, Apr, p.419-427. 2003.

Buscaglia, C. A. *et alii.* Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. Nature Reviews Microbiology, v.4, n.3, p.229-236. 2006.

Cabrita, L. D. *et alii.* Protein expression and refolding - A practical guide to getting the most out of inclusion bodies. In: (Ed.). Biotechnology Annual Review: Elsevier, v.10, 2004. Protein expression and refolding - A practical guide to getting the most out of inclusion bodies, p.31-50.

Caler, E. V. *et alii.* Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by Trypanosoma cruzi. Embo Journal, v.17, n.17, p.4975-4986. 1998.

Camargo, E.P. Growth and differenciation on Trypanosoma cruzi. I- Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev. Inst. Med Trop Sao Paulo, v.12, p.93-100. 1964.

Canepa, G. E. *et alii.* Characterization of Trypanosoma cruzi l-cysteine transport mechanisms and their adaptive regulation. Fems Microbiology Letters, v.292, n.1, p.27-32. 2009.

Chang, K.-P. e B. Mcgwire. Molecular determinants and regulation of Leishmania virulence. Kinetoplastid Biology and Disease, v.1, n.1, p.1. 2002.

Chich, J. F. *et alii.* Identification of the Active-Site Serine of the X-Prolyl Dipeptidyl Aminopeptidase from Lactococcus-Lactis. Febs Letters, v.314, n.2, p.139-142. 1992.

Covarrubias, C. *et alii.* Interaction with host factors exacerbates Trypanosoma cruzi cell invasion capacity upon oral infection. International Journal for Parasitology, v.37, n.14, Dec, p.1609-1616. 2007.

Cox, F. E. G. History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). Infectious Disease Clinics of North America, v.18, n.2, Jun, p.231-+. 2004.

Dahl, N. *et alii.* Missense mutations in the human glutathione synthetase gene result in severe metabolic acidosis, 5-oxoprolinuria, hemolytic anemia and neurological dysfunction. Human Molecular Genetics, v.6, n.7, p.1147-1152. 1997.

De Mecca, M. M. *et alii.* Benznidazole biotransformation in rat heart microsomal fraction without observable ultrastructural alterations: comparison to Nifurtimox-induced cardiac effects. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, v.103, n.6, p.549-553. 2008.

Denkers, E. Y. e Butcher, B. A. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. Trends in Parasitology, v.21, n.1, p.35-41. 2005.

Dias, J. C. P., *et alii..* The impact of Chagas disease control in Latin America - A review. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, v.97, n.5, Jul, p.603-612. 2002.

Du, Z. X. *et alii.* Role of oxidative stress and intracellular glutathione in the sensitivity to apoptosis induced by proteasome inhibitor in thyroid cancer cells. Bmc Cancer, v.9. 2009.

Elmunzer, B. J. M. D. *et alii..* Cardiac Chagas Disease Masquerading as an Acute Myocardial Infarction.: Cardiology in Review March/April 2004;12(2):69-72

El-Sayed, N. M. *et alii.* The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. Science, v.309, n.5733, p.409-415. 2005.

Fenno, J. C *et alii.* The opdB locus encodes the trypsin-like peptidase activity of Treponema denticola. Infection and Immunity, v.69, n.10, p.6193-6200. 2001.

Ferchichi, M. *et alii.* Rapid identification of Lactobacillus nantensis, Lactobacillus spicheri and Lactobacillus hammesii species using species-specific primers. International Journal of Food Microbiology, v.123, n.3, p.269-276. 2008.

Fernandes, C. D. *et alii.* Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, v.104, n.1, p.27-32. 2009.

Fernandes, L.C. *et alii.* Specific human antibodies do not inhibit *Trypanosoma cruzi* oligopeptidase B and cathepsin B, and immunoglobulin G enhances the activity of trypomastigote-secreted oligopeptidase B. Microbes and Infection. p. 375-384. 2005.

Ferreira, I. D. L. M. e Silva, T. P. T. E. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo Triatoma infestans no Brasil: um fato histórico. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.39, p.507-509. 2006.

Filomeni, G. *et alii. l.* Disulfide relays and phosphorylative cascades: partners in redox-mediated signaling pathways. Cell Death and Differentiation, v.12, n.12, p.1555-1563. 2005.

Fujinaga, M *et alii.* The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from Scytalidium lignicolum. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.101, n.10, p.3364-3369. 2004.

Fumaz, C. R. *et alii..* Low Levels of Adherence to Antiretroviral Therapy in HIV-1-Infected Women with Menstrual Disorders. AIDS Patient Care and STDs, v.23, n.6, p.463-468. 2009

Furuya, T. *et alii.* A novel phosphatidylinositol-phospholipase C of Trypanosoma cruzi that is lipid modified and activated during trypomastigote to amastigote differentiation. Journal of Biological Chemistry, v.275, n.9, p.6428-6438. 2000.

Gallagher, S., Chakavarti, D. Immunoblot Analysis. JoVE. 16. 2008. <http://www.jove.com/index>

Gascon, J. *et alii.* Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where Trypanosoma cruzi infection is not endemic. Revista Espanola De Cardiologia, v.60, n.3, Mar, p.285-293. 2007.

GeneDB. Disponível em <www.genedb.org> Acesso em 2009.

Gentil, L. G. *et alii.* Analysis and chromosomal mapping of Leishmania (Leishmania) amazonensis amastigote expressed sequence tags. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.102, p.707-711. 2007.

Gerczei, T. *et alii.* Construction of a 3D model of oligopeptidase B, a potential processing enzyme in prokaryotes. Journal of Molecular Graphics & Modelling, v.18, n.1, p.7-+. 2000.

Goldstein, J. M. *et alii.* Novel extracellular x-prolyl dipeptidyl-peptidase (DPP) from Streptococcus gordonii FSS2: an emerging subfamily of viridans streptococcal x-prolyl DPPs. Infection and Immunity, v.69, n.9, p.5494-5501. 2001.

Grant, C. M. *et alii.* 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 gamma-glutamylcysteine. Molecular Biology of the Cell, v.8, n.9, p.1699-1707. 1997.

Grellier, P. *et alii..* Trypanosoma cruzi prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. J. Biol. Chem., v.276, p.47078-47086. 2001.

Guedes, H. L. D *et alii.* Oligopeptidase B-2 from Leishmania amazonensis with an unusual C-terminal extension. Acta Parasitologica, v.53, n.2, p.197-204. 2008.

Hall, B.F. *et alii..* desialylation of liposomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in faciliting parasite entry into the host cell cytoplasm. J. Exp. Med., v.176, p.313-325.

Hampton, J. R. Lysine Uptake in Cultured Trypanosoma-Cruzi - Interactions of Competitive Inhibitors. Journal of Protozoology, v.17, n.4, p.597-&. 1970.

Hanski, C. *et alii.* Involvement of Plasma-Membrane Dipeptidyl Peptidase-Iv in Fibronectin-Mediated Adhesion of Cells on Collagen. Biological Chemistry Hoppe-Seyler, v.366, n.12, p.1169-1176. 1985.

Irigoin, F. *et alii.* Insights into the redox biology of Trypanosoma cruzi: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. Free Radical Biology and Medicine, v.45, n.6, p.733-742. 2008.

Ivens, A. C. *et alii.* The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. Science, v.309, n.5733, p.436-442. 2005.

Janowiak, B. E. *et alii.* gamma-glutamylcysteine synthetase-glutathione synthetase: Domain structure and identification of residues important in substrate and glutathione binding. Biochemistry, v.45, n.35, p.10461-10473. 2006.

Joshi, B. H. e Puri, R. K. Optimization of expression and purification of two biologically active chimeric fusion proteins that consist of human interleukin-13 and Pseudomonas exotoxin in Escherichia coli. Protein Expression and Purification, v.39, n.2, p.189-198. 2005.

Kameoka, J. *et alii..* Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. Science, v.261, p.466-469. 1993.

Kato, T., Okada, M., Nagatsu, T.Distribution of post-proline cleaving enzyme in human brain and the peripheral tissues. Mol. Cell Biochem., v.32, p.117-121. 1980.

Kim, E. K. *et alii.* Synthesis of gamma-glutamylcysteine as a major low-molecular-weight thiol in lactic acid bacteria Leuconostoc spp. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.369, n.4, p.1047-1051. 2008.

Klemba, M. & Goldberg, D. E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. Annual Review of Biochemistry, v.71, p.275-305. 2002.

Krauth-Siegel, R. L. e Comini, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, v.1780, n.11, p.1236-1248. 2008.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, p.680-685. 1970.

Laitinen, K. S. M. *et alii.* Brain prolyl oligopeptidase activity is associated with neuronal damage rather than beta-amyloid accumulation. Neuroreport, v.12, n.15, p.3309-3312. 2001.

Lauria-Pires, L. *et alii.* Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivatives. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.63, n.3-4, p.111-118. 2000.

LaVallie, E. R. & McCoy, J. M. Gene fusion expression systems in *Escherichia coli.* Current Opinion in Biotechnology. v. 6, p. 501-506. 1995.

Lee *et alii.* Investigation of the functional role of active site loop II in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase. Biochimica et Biophysica Acta. p. 63-70. 2001.

Leitsch, D. *et alii.* Nitroimidazole action in Entamoeba histolytica: A central role for thioredoxin reductase. Plos Biology, v.5, n.8, p.1820-1834. 2007.

Leow, T.C. *et alii.* Thermostable lipases. In: New Lipases and Proteases, p.41-61. 2006.

Levi, G. C. *et alii..* Etiological drug treatment of human infection by Trypanosoma cruzi. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.38, p.35-38. 1996.

Lowe, J. *et alii..* Crystal-Structure of the 20s Proteasome from the Archaeon T-Acidophilum at 3.4-Angstrom Resolution. Science, v.268, n.5210, p.533-539. 1995.

Luersen, K. *et alii..* Plasmodium falciparum-infected red blood cells depend on a functional glutathione de novo synthesis attributable to an enhanced loss of glutathione. Biochemical Journal, v.346, p.545-552. 2000.

Massad, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. Epidemiology and Infection, v.136, n.9, Sep, p.1153-1164. 2008.

Matos, J. *et alii.* Genetic characterization of pepP, which encodes an aminopeptidase P whose deficiency does not affect Lactococcus lactis growth in milk, unlike deficiency of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase. Applied and Environmental Microbiology, v.64, n.11, p.4591-4595. 1998.

Maya, J. D. *et alii.* Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host. Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology, v.146, n.4, p.601-620. 2007.

Meierjohann, S. *et alii..* Glutathione synthetase from Plasmodium falciparum. Biochemical Journal, v.363, p.833-838. 2002.

Meirelles, M.N.L. *et alii..* Inhibitors of major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. Mol. Biochem. Parasitol., v.52, p.175-184. 1992.

Meister, A. e Anderson, M. E. Glutathione. Annual Review of Biochemistry, v.52, p.711-760. 1983.

Meister, A. Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. Journal of Biological Chemistry, v.263, n.33, p.17205-17208. 1988

Miroux, B. e Walker, J. E. Over-production of proteins in Escherichia coli: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. Journal of Molecular Biology, v.260, n.3, p.289-298. 1996.

Monsky, W. L. *et alii.* A Potential Marker Protease of Invasiveness, Seprase, Is Localized on Invadopodia of Human-Malignant Melanoma-Cells. Cancer Research, v.54, n.21, p.5702-5710. 1994.

Morel, C. M., *et alii.* Health Innovation Networks to Help Developing Countries Address Neglected Diseases. Science, v.309, n.5733, July 15, 2005, p.401-404. 2005.

Moriyama, A., Nakanishi, M., Sasaki, M. Porcine muscle prolyl endopeptidase and its endogenous substrates. J. Biochem., v.104, p.112-117. 1988.

Mortara, R. A. *et alii.* Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by Trypanosoma cruzi infective forms. Anais Da Academia Brasileira De Ciencias, v.77, n.1, p.77-94. 2005.

Morty, R. E. *et alii.* Oligopeptidase B from Trypanosoma evansi - A parasite peptidase that inactivates atrial natriuretic factor in the bloodstream of infected hosts. Journal of Biological Chemistry, v.280, n.12, p.10925-10937. 2005.

Morty, R.E. *et alii.* Purification and characterization of a trypsin-like serine oligopeptidase from *Trypanosoma congolense*. Mol. Biochem. Parasitol., v.102, p.145-155. 1999a.

Morty, R.E., Fulop, V., Andrews, N.W. Substrate recognition properties of oligopeptidase B from Salmonella enteric serovar Typhimurium. J. Bacteriol., v.184, p.3329-3337. 1999b.

Mottram *et alii.* A cysteine proteinase cDNA from *Trypanosoma brucei* predicts an enzyme with an unusual C-terminal extension. FEB. n. 2, v. 258, p.211-215. 1989.

Muller, S. *et alii..* Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. Trends in Parasitology, v.19, n.7, p.320-328. 2003.

Nowicki, C. e Cazzulo, J. J. Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids. Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology, v.151, n.3, p.381-390. 2008.

Organização Mundial de Saúde. A human-rights-based approach to negleted tropical diseases, 2006. Disponível em: www.who.int/hhr. Acesso em 15/07/2009.

Organização Mundial de Saúde. Chagas'disease. Making health research work for poor people, p.1-3. 2007.

Organização Mundial de Saúde. Drug development and evaluation for helmints and other neglected tropical diseases. TDR Business line 6. Annual Report. 2008. Disponível em: www.who.int/tdr. Acesso em: 10/07/2009.

Organização Mundial de Saúde. The global burden disease: 2004 update. Disponível em: www.who.int/evidence/bod . Acesso em: 10/07/2009.

Organização Mundial de Saúde. Weekly epidemiological record, 2007. Vol. 82, n. 28-29, Jul, p. 245-260. 2007.

Organização Panamericana de saúde. Saúde nas Américas: Panorama da Saúde na Região, 2007.

Oza, S. L. *et al.* A single enzyme catalyses formation of trypanothione from glutathione and spermidine in Trypanosoma cruzi. Journal of Biological Chemistry, v.277, n.39, p.35853-35861. 2002.

Paba, J. *et alii..* Proteomic analysis of the human pathogen Trypanosoma cruzi. Proteomics, v.4, n.4, p.1052-1059. 2004.

Pacaud, M., Richaud, C. Protease II from *Escherichia coli*. Purification and characterization. J., Biol. Chem., v.250, 7771-7779.

Passaglia, L. M. P. *et alii.* Purification and binding analysis of the nitrogen fixation regulatory NifA protein from Azospirillum brasilense. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.31, n.11, p.1363-1374. 1998.

Pasternak, M. *et alii.* Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. Plant Journal, v.53, n.6, p.999-1012. 2008.

Piras, M.M., Henriquez, D., Piras, R. The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction *Trypanosoma cruzi*-fibroblasts. Mol. Biochem. Parasitol., v.14, p.151-163. 1985.

Pittella, J. E. H. The assessment process within science and the nomination of Carlos Chagas for the Nobel prize for Physiology or Medicine. Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical, v.42, n.1, Jan-Feb, p.67-72. 2009.

Polgar, L. A. potential processing enzyme in prokaryotes: Oligopeptidase B, a new type of serine peptidase. Proteins-Structure Function and Genetics, v.28, n.3, p.375-379. 1997.

Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. The Lancet Infectious Diseases, v.1, n.2, p.92-100. 2001

Rawlings, N. D. e A. J. Barrett. Families of Aspartic Peptidases, and Those of Unknown Catalytic Mechanism. Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases, v.248, p.105-120. 1995.

Rawlings, N. D. *et alii.*. A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase. Biochem. J., v.279, n.3, Nov 1, p.907-908. 1991.

Rawlings, N. D. *et alii.*. MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Research, v.34, p.D270-D272. 2006.

Rea, D. *et alii.* Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of oligopeptidase B from Trypanosoma brucei. Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications, v.62, p.808-810. 2006.

Rebêlo, J. M. M. *et alii.* Espécies de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) do Estado do Maranhão, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, v.14, p.187-192. 1998.

Repetto, Y. *et alii.* Glutathione and trypanothione in several strains of Trypanosoma cruzi: Effect of drugs. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, v.115, n.2, p.281-285. 1996.

Rigolet, P. *et alii.* The structural basis for catalysis and specificity of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from Lactococcus lactis. Structure, v.10, n.10, p.1383-1394. 2002.

Romao, P. R. T. *et alii.* Glutathione protects macrophages and Leishmania major against nitric oxide-mediated cytotoxicity. Parasitology, v.118, p.559-566. 1999.

Rosano, G. e Ceccarelli, E. Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted Escherichia coli strain. Microbial Cell Factories, v.8, n.1, p.41. 2009.

Santana, J.M. *et alii.* A Trypanosoma cruzi-secreted 80kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. Biochem. J., v.324, p.129-137. 1997.

Santana, J.M. *et alii.*. Purification and characterization of a new 120 kDa alkaline proteinase of *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Bioph. Res. Comm., v.187, p.1466-1476. 1992.

Sant'anna, C *et alii.* All Trypanosoma cruzi developmental forms present lysosome-related organelles. Histochemistry and Cell Biology, v.130, n.6, p.1187-1198. 2008.

Schulz, I. *et alii.* Modulation of inositol 1,4,5-triphosphate concentration by prolyl endopeptidase inhibition. Eur. J. Biochem., v.269, p.5813-5820. 2002.

Shi, Z. Z. *et alii.* Mutations in the glutathione synthetase gene cause 5-oxoprolinuria. Nature Genetics, v.14, n.3, p.361-365. 1996.

Shinoda, M., Okamiya, K., Toide, K. Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on thyrotropin-releasing hormone-like immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus of aged rats. Jpn. J. Pharmacol., v. 69, p.273-276. 1995.

Silber, A. M. *et alii.* Glucose uptake in the mammalian stages of Trypanosoma cruzi. Molecular and Biochemical Parasitology, v.In Press, Uncorrected Proof.

Tew, K. D. Glutathione-Associated Enzymes in Anticancer Drug-Resistance. Cancer Research, v.54, n.16, p.4313-4320. 1994.

Topcu, Z. An optimized recipe for cloning of the polymerase chain reaction-amplified DNA inserts into plasmid vectors. Acta Biochimica Polonica, v.47, n.3, p.841-846. 2000.

Trouiller, P. *et alii.* Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. The Lancet, v.359, n.9324, p.2188-2194. 2002.

Urbina, J. A. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. Current Opinion in Infectious Diseases, v.14, n.6, p.733-741. 2001.

William *et alii.* 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase of Leishmania contains an unusual C-terminal extension and is involved in thioredoxin and antioxidant metabolism. JBC. v. 278, n. 3, p. 1480-1486. 2003.

Yan, J. B. *et alii.* High-level expression and purification of Escherichia coli oligopeptidase B. Protein Expression and Purification, v.47, n.2, p.645-650. 2006.

Yazdani, S. S *et alii.* Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. Current Molecular Medicine, v.6, n.2, p.187-203. 2006.

Yoshida, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi. Anais Da Academia Brasileira De Ciencias, 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.

Yoshimoto, T., Walter, R., Tsuru, D. Proline-specific endopeptidase from Flavobacterium. Purification and properties. J. Biol. Chem., v.255, p.4786-4792. 1980.

Zhou, Q. e Wang, W. On the origin and evolution of new genes-a genomic and experimental perspective. Journal of Genetics and Genomics, v.35, n.11, p.639-648. 2008.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

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