



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

# **Clonagem, expressão heteróloga e citocalização da metionina aminopeptidase de *Trypanosoma cruzi***

**VIVIANE FRAGOSO DE MOURA**

**Orientador: Prof. Dr. Jaime M. de Santana**

**Brasília-DF, 2011**



**Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro**

# **Clonagem, expressão heteróloga e citocalização da metionina aminopeptidase de *Trypanosoma cruzi***

**VIVIANE FRAGOSO DE MOURA**

**Orientador: Prof. Dr. Jaime M. de Santana**

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

**Brasília-DF, 2011**



Trabalho desenvolvido no Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro da Universidade de Brasília, sob a orientação do Prof. Jaime Martins de Santana. Este trabalho teve o apoio financeiro da CAPES.



## Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus queridos pais **Pedro Moura e Francisca Fragoso**, meus verdadeiros amigos, orgulho e exemplo de vida.

Dedico, também, ao meu irmão e companheiro **Alexandre**, pelo incentivo intelectual e amor verdadeiro.



## Agradecimentos

### Eu agradeço.....

A Deus, pela oportunidade de concretização deste trabalho e capacitação de superar os obstáculos que encontrei no caminho.

Aos **meus pais**, que sempre me amaram de uma maneira incondicional, acreditando sempre na realização dos meus sonhos. Por serem exemplos de vida, coragem e estímulo.

Aos meus **irmãos-companheiros**, por todo carinho, amizade e incentivo constante. Verdadeiros companheiros para toda a vida!!!!

Ao meu **grande amor**, Marcus Vinícius, pelo companheirismo e amizade constante, incentivo e dedicação. Obrigada pelos momentos de alegria, pela compreensão e principalmente por acreditar sempre em mim. **Te amo, VV!!!**

A **Sheila**, mais do que uma amiga, uma irmã, esteve comigo durante toda a minha formação. Obrigada por tudo!!!

As minhas amigas “Embrapianas” **Norma Paes, Cristiane Citadin e Mariana Baiochi** que foram simplesmente o princípio de tudo que tenho realizado na minha vida acadêmica. Tenho certeza que a concretização desse trabalho é motivo de orgulho para vocês. Obrigada pela confiança, pelos momentos de discussões científicas e também pelas piadas no “Carneiro e Picanha”rs!!

A **Keyla**, um dos maiores tesouros que encontrei na Universidade de Brasília. Obrigada minha querida amiga, por toda força, carinho, incentivo, pelos momentos inesquecíveis de trabalho. Com certeza eles eram diferentes, por mais que fosse um “feriado no laboratório” era sempre muito divertido. Palavras não expressam a gratidão que tenho por você. Obrigada por tudo!

A **Flávia**, uma grande amizade que conquistei ao longo deste trabalho. Obrigada, amiga, pelo crescimento intelectual, incentivo e pelas discussões no laboratório e também por ser uma amiga dedicada e carinhosa. Pronto terminei.... hahahah!!!!

A **prof<sup>a</sup> Dra. Sônia Maria de Freitas**, pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa. Pelos momentos de discussão. Obrigada pela amizade e por ter acreditado sempre em mim.

Ao meu orientador **prof.Dr. Jaime M.Santana**, pela oportunidade de conquista, crescimento intelectual, pela amizade e por ser exemplo de profissionalismo.



A **prof<sup>a</sup> Dra. Glória Cadavid**, pela dedicação e seriedade quando trabalhávamos juntas. Obrigada pela amizade e pela possibilidade de crescimento.

A **prof<sup>a</sup> Dra. Izabela Bastos Dourado**, pelos momentos de discussão no laboratório, pela alegria constante e amizade.

Aos meus amigos do laboratório de Imunopatologia, **Ana Camila, Márcio e Isaque**, obrigada pelos momentos divertidos no laboratório. Vocês fazem toda a diferença!!!!

Aos meus amigos da Biofísica molecular, **Everton e Alice**. Obrigada por acreditarem sempre mim.

Aos meus colegas de laboratório: **Paula, Raquel, Débora, Marta, Brina e André** que contribuíram significativamente para o meu crescimento pessoal e intelectual. Agradeço em especial ao **Hugo** pelo incentivo e por sempre ter demonstrado gentileza nos momentos de discussão no laboratório.

Aos meus queridos amigos do PIBIC: **Felipe, Clênia, Ranna, Janaína e Cíntia**. Que bom que vocês chegaram ao laboratório!!!



*Aninha e suas pedras*

*Não te deixes destruir...  
Ajuntando novas pedras  
e construindo novos poemas.  
Recria tua vida, sempre, sempre.  
Remove pedras planta roseiras e faz doce. Recomeça.  
Faz de tua vida mesquinha  
um poema.  
E viverás no coração dos jovens  
e na memória das gerações que hão de vir.  
Esta fonte é para uso de todos os sedentos.  
Toma a tua parte.  
Vem a estas páginas  
e não entres seu uso  
aos que têm sede.  
**Cora Coralina***



## Lista de abreviaturas

°C	grau centígrado
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
cm	centímetro
Cys	cisteína
Da	Dalton
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
g	grama
h	hora
His	histidina
IgG	imunoglobulina G
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
K	quilo
Kb	quilobase
M	molar
mA	miliampere
min	minuto
mM	milimolar
ml	mililitro
NBT	nitro-azul-tetrazólio
ng	nanograma
nm	nanômetro
OD	densidade óptica
PBS	tampão fosfato 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,2
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
$\mu$ g	micrograma
$\mu$ L	microlitro
$\mu$ m	micrômetro
V	volts



## Índice

Índice .....	ii
Abstract.....	2
Introdução .....	3
1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	3
1.1. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
1.2. Fatores de virulência do <i>T. cruzi</i> .....	7
1.3. Manifestações clínicas.....	7
1.4. Tratamento quimioterápico.....	8
2.1. Proteases .....	9
2.2. Aminopeptidases .....	12
2.3. Metionina aminopeptidase.....	13
Materiais e Métodos .....	19
1. Análises de bioinformática .....	19
2. Amplificação do gene Tcmap.....	19
3. Eletroforese em gel de agarose .....	19
4. Clonagem e subclonagem do gene Tcmap. ....	20
4.1. Ligação do inserto no vetor de clonagem pCR 2.1.....	20
4.2. Subclonagem no vetor de expressão pET19b.....	20
5. Análise de restrição enzimática e extração de DNA plasmidial.....	21
6. Expressão heteróloga da proteína recombinante (MAPTc).....	21
7. Purificação da MAPTc .....	21
8. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	22
9. Produção e obtenção de anticorpos para imunodeteção .....	23
10. Atividade enzimática .....	23
11. Imunofluorescência e citolocalização de MAPTc .....	24
12. Testes de inibição do crescimento de parasitos .....	24
13. Modelagem molecular da MAPTc .....	24
14. Análise filogenética de MAPTc .....	25
Resultados.....	26
1. Alinhamento das sequências de metionina aminopeptidases (MAPs) de diferentes organismos.....	26
3. Clonagem e subclonagem do gene da metionina aminopeptidase de <i>T. cruzi</i> (MAPTc).....	30
4. Expressão heteróloga e purificação da proteína recombinante MAPTc.....	33
7. Teste de inibição .....	42
8. Modelagem MAPTc .....	42
9. Referências bibliográficas.....	50



## Resumo

A doença de Chagas, após 100 anos de sua descrição, ainda é considerada uma enfermidade negligenciada e de grande importância social, sendo destacada como uma das doenças mais endêmicas da América Latina. O cenário epidemiológico associado à ausência de quimioterapia adequada tem incentivado programas governamentais de prevenção e controle e influenciado grupos de pesquisadores a buscarem o desenvolvimento de novos fármacos. A linha de pesquisa do nosso grupo visa à identificação e caracterização molecular de proteases como potenciais alvos de drogas. Nesse sentido, este trabalho descreve o estudo de uma metionina aminopeptidase de *T. cruzi* (MAPTc). MAPTc é uma enzima putativa de 476 resíduos de aminoácidos com a massa molecular esperada de 47 kDa, sendo altamente conservada em cinetoplastídeos. O alinhamento de sequências protéicas de metionina aminopeptidases (MAPs) de humano e de *T. cruzi* demonstrou identidade reduzida, o que contribuiu para tornar a MAPTc um alvo promissor para desenvolvimento de drogas. A proteína recombinante foi expressa solúvel e inativa em *E. coli* BL 21(DE3) e purificada para produção de anticorpos em camundongos. Os soros obtidos após as imunizações foram utilizados nos experimentos de *immunoblotting* e imunocitocalização na tentativa de confirmar a expressão da proteína. A expressão da proteína foi confirmada nas formas epimastigotas do parasita e a mesma parece estar localizada no citoplasma. Para verificar a atividade de MAPTc, foram realizados ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico MET-AMC. No entanto, não foram alcançados resultados satisfatórios nas condições testadas, indicando que a proteína recombinante foi produzida na sua forma inativa. Testes com TNP470, um inibidor conhecido de metionina aminopeptidases, em formas epimastigotas do parasito, não revelaram um efeito inibitório. Por fim, foi proposto um modelo para MAPTc baseado na estrutura cristalográfica da Metionina Aminopeptidase Humana tipo I, PDB 2B3H.



## Abstract

Chagas' disease even after 100 years of its depiction is still considered a neglected disease of great social importance, being highlighted as one of the endemic diseases in Latin America. The absence of an appropriate chemotherapy and its epidemiology have motivated government programs to prevent its transmission and stimulated groups of researchers to pursue the development of new drugs with reduced side effects. Our research group aims the identification and molecular characterization of proteases as potential drug targets. In that sense, this master's thesis describes the study of a methionine aminopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (MAPTc). MAPTc is a putative enzyme of 476 amino acid residues with an expected molecular mass of 47 kDa and highly conserved in the kinetoplastids. Protein sequence alignment of human and *T. cruzi* methionine aminopeptidase (MAPs) showed reduced identity, which helps to make MAPTc a promising target for drug development. The recombinant protein was expressed in its soluble and inactive form in *E.coli* BL 21 (DE3). It was purified and employed in the production of antibodies in mice that were used to investigate MAPTc expression. In experiments of immunoblotting and immunocytolocalization revealed that the protein is expressed by epimastigote forms and located in the cytoplasm of the parasite. Assays with fluorogenic substrate MET-AMC were performed to access the activity of MAPTc. However, no success was achieved under the conditions tested, suggesting that the recombinant protein was produced in its inactive form. Also, tests were performed with TNP470, a well-known inhibitor of methionine aminopeptidase, on epimastigote forms of the parasite. However, these tests did not show an inhibitory effect. Finally, a model was proposed to MAPTc based on the crystal structure of the human methionine aminopeptidase type I, PDB 2B3H.



## Introdução

### 1. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A doença de Chagas (Tripanossomíase Americana) foi descrita em 1909 por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, relatando seus elementos clínicos, anatomopatológicos e epidemiológicos, seu agente etiológico – o *Trypanosoma cruzi* - e os vetores como sendo insetos da ordem Hemiptera (Brener *et alii*, 2000). Foi a primeira vez na história da Medicina que um mesmo pesquisador identificou anteriormente a descoberta da doença o vetor, conhecido popularmente como barbeiro, e o seu agente etiológico. Os vetores desta enfermidade são insetos hematófagos da subfamília *Triatomine* (Hemiptera:Reduviidae) atualmente composta por 141 espécies (Villela *et alii*, 2007).

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, (Bestetti *et alii*, 2009; Pittella, 2009).

A história da doença de Chagas teve início no século XX, quando o então diretor do Instituto Manguinhos, Oswaldo Cruz, enviou o jovem pesquisador, Carlos Chagas, ao estado de Minas Gerais para a realização de trabalhos de controle da malária, doença de grave epidemia à época (Voelker, 2009). Contudo, não foram os esforços contra essa doença que revelaram ao mundo o cientista brasileiro, mas sim a descoberta do que é um dos maiores problemas de saúde pública da história brasileira e da América Latina, a doença de Chagas. A ênfase dada à originalidade científica da descoberta de Carlos Chagas e seus colaboradores e por gerações sucessivas de médicos e cientistas até o presente, a tripanossomíase americana tornou-se objeto de uma larga tradição de pesquisa que reúne grupos de especialistas de todo o país, das Américas e da Europa (Kropf *et alii*, 2000).

Constituindo um importante problema médico e social, a doença de Chagas apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo frequente nas Américas, principalmente na América Latina (Neves *et alii*, 2000). Durante o século XX, a doença de Chagas foi relatada em todos os países da América Latina, sendo considerada a mais importante doença parasitária em termos de impacto econômico e sistemas públicos de saúde (Noireau *et alii*, 2009). Naquele tempo, como não havia medicamentos contra a doença nem inseticidas para controle dos vetores, a base preventiva era a melhoria das habitações. Já nas últimas décadas



do século XX, programas de controle tiveram início na maioria dos países endêmicos com o objetivo de controlar a transmissão vetorial pelo emprego de inseticidas (Dias, 2007).

As doenças infecciosas parasitárias afetam milhões de pessoas nas diferentes regiões geográficas mais pobres do planeta e representam uma crescente ameaça mundial. A malária, doença de Chagas, tripanossomíase africana (doença do sono), leishmanioses e esquistossomoses são capazes de incapacitar anualmente uma fração significativa da população de vários países em desenvolvimento especialmente nos continentes africano e americano (Dias e Dessoy *et alii* 2009).

No Brasil, os casos de infecção acentuam-se em populações pobres, que residem em condições profiláticas inadequadas (Dias *et alii*, 2007). A estimativa é de 2 a 3 milhões de pessoas infectadas, com incidência de 100 novos casos por ano, principalmente por contaminação via oral (Pontes *et alii*, 2010). Em decorrência das intensas migrações populacionais, a doença de Chagas classicamente considerada uma enfermidade rural, passou a atingir centros urbanos (Neto, 1994). O estado de Minas Gerais, é considerado um dos estados brasileiros com maior prevalência de endemia chagásica tendo sido coincidentemente o palco da descoberta da doença (Dias *et alii*, 2007).

As doenças negligenciadas caracterizadas de doenças tropicais correspondem a um grupo de doenças infecciosas que afeta principalmente populações mais pobres e vulneráveis e contribuem para a perpetuação dos ciclos de pobreza, desigualdade e exclusão social, em razão principalmente de seu impacto na saúde infantil, na redução da população trabalhadora e na promoção do estigma social. Essas doenças são assim denominadas porque os investimentos em pesquisas geralmente não revertem em desenvolvimento e ampliação de acesso a novos medicamentos, testes diagnósticos, vacinas e outras tecnologias para sua prevenção e controle. Dentre as doenças negligenciadas de maior interesse no cenário brasileiro, a OMS atualmente prioriza os estudos da doença de Chagas, esquistossomose, dengue, leishmaniose, a hanseníase, a filariose, oncocercose e as helmintíases transmitidas pelo solo (Werneck *et alii*, 2011).

Apesar da observada queda do número de infectados pelo *T. cruzi*, a epidemiologia da doença apresenta obstáculos para um controle efetivo; a co-existência do *T. cruzi* em animais silvestres é constante, além de que, diversos triatomíneos podem se tornar vetores em potencial desta doença ao adaptarem-se ao ambiente humano, ocupando áreas cada vez maiores, reforçando o risco de novas infecções.



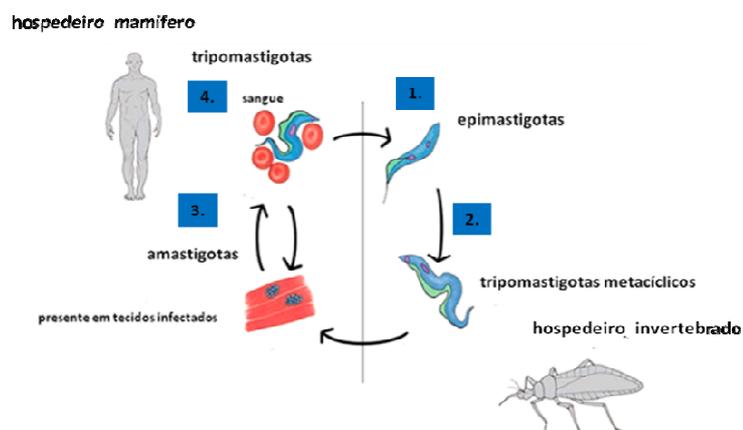
A inexistência de um inquérito epidemiológico recente indica a necessidade de conhecimento da prevalência e incidência mais precisa da doença. De qualquer modo, os números ainda indicam a importância social da doença de Chagas 100 anos após a descrição de um primeiro caso agudo no Brasil. Apesar de um século de investigações científicas a respeito da doença, muitos pesquisadores de diversas áreas de pesquisa sentem-se motivados na busca pela compreensão dos processos celulares envolvidos na interação do parasita com seus hospedeiros e a sua patofisiologia (Epting *et alii*, 2010).

### 1.1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo que alterna entre os hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Nos diversos estágios deste ciclo, o parasita apresenta formas clássicas com diferentes características morfológicas e metabólicas que lhe permitem se adaptar a cada novo ambiente (Tyler e Engman, 2001; Alves e Colli, 2007): epimastigotas, formas proliferativas presentes no intestino médio do inseto vetor e tripomastigotas metacíclicas, formas não proliferativas, presentes na porção final do intestino do inseto; no hospedeiro vertebrado, o parasita se apresenta nas formas tripomastigotas e amastigotas, a primeira é a forma infectiva presente no sangue e a última, a forma intracelular proliferativa (Brenner, 1973).

O ciclo biológico no hospedeiro vertebrado (Fig. 1) inicia-se quando formas tripomastigotas metacíclicas são eliminadas nas fezes e urina do inseto vetor durante o repasto. Essas formas invadem o hospedeiro mamífero por meio da pele ou mucosa, infectando qualquer tipo celular. O *T. cruzi* desenvolveu complexos mecanismos de invasão celular que envolvem diferentes tipos celulares e a interação com moléculas na superfície dessas células, eventos enzimáticos, sinalização celular mediada por  $Ca^{2+}$ , alterações na membrana, no citoesqueleto e nas organelas que permitem a formação de um vacúolo contendo o parasita no interior da célula hospedeira (Epting *et alii*, 2010). A fase inicial do processo de interação parasito-célula hospedeira requer a adesão do *T. cruzi* à superfície da célula alvo, envolvendo reconhecimento entre moléculas presentes na superfície de ambas as células. Em seguida à adesão, ocorrem modificações nas membranas do parasita e da célula hospedeira, mecanismo que também 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  $\text{Ca}^{2+}$  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 cruzipaina (Yoshida, 2006; Yoshida, 2008). Após a fusão de lisossomos à vesícula parasitófora (fagolisossomo), uma neuraminidase do parasito, 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 dependente de atividade enzimática do proteossoma. 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 retornando a circulação sanguínea (Burleigh e Woolsey, 2002; Yoshida, 2006).



**Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.** Representação esquemática adaptada de Javeir *et alii*, 2010. O *T. cruzi* apresenta variações morfológicas e metabólicas alternando entre estágios que sofrem divisão binária e as formas intracelulares não replicativas e infectivas. (1) Durante a fase no inseto vertebrado, o *T. cruzi* se transforma em **epimastigotas** (forma proliferativa), e então, no intestino médio do inseto hospedeiro diferencia-se em **tripomastigotas metacíclicos** (formas não proliferativas e infectantes) (2) os quais são eliminados nas fezes e urina do inseto vetor durante o repasto, invadindo células do hospedeiro mamífero por meio da pele e mucosa. (3) Após adesão e penetração **formas amastigotas (proliferativas)** invadem músculos e outros tecidos. (4) Após sucessivas divisões binárias, os amastigotas transformam-se em **formas tripomastigotas** (infectivas). Por fim, a célula hospedeira rompe-se e libera tripomastigotas no meio extracelular. Com isso, os parasitos iniciam um novo ciclo, infectando células vizinhas e na circulação sanguínea.



## 1.2. Fatores de virulência do *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/ou 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; Santana *et alii*, 2008). Essas proteínas são essenciais para a sobrevivência do patógeno no hospedeiro, influenciando na patogênese, característica 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). As proteases são exemplos de fatores de virulência em *T. cruzi*, foco desse estudo.

## 1.3. Manifestações clínicas

A doença de Chagas é caracterizada por uma fase inicial aguda com sinais ou sintomas quase sempre inespecíficos (Penna *et alii*, 2005) podendo acontecer o aparecimento de sinais como febre, mal-estar e mialgia, comuns a outras doenças, o que pode dificultar o diagnóstico precoce da infecção. Já alguns pacientes podem apresentar inflamação no sítio de entrada do parasito, o chamado chagoma de inoculação ou sinal de Romana, característico dessa fase. Se o indivíduo não receber tratamento adequado pode entrar em uma fase latente ou indeterminada, na qual as pessoas infectadas não apresentam as alterações patológicas comuns à cronicidade da doença. A maioria dos indivíduos que se encontram na fase indeterminada permanece décadas sem apresentar sintomas, quando então evolui para um quadro clínico com problemas cardíacos ou digestivos, a fase crônica (Pontes *et alii*, 2010). Nessa fase de cronicidade observam-se principalmente manifestações cardíacas, como cardiopatias, arritmias e infarto do miocárdio, e manifestações gastrointestinais envolvendo a síndrome dos megas: megaesôfago e megacólon. O acometimento cardíaco é a forma mais importante de limitação ao doente e a principal causa de morte, manifestando-se de 5 a 30 anos após a infecção primária em cerca de 30% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* (Neto, 1994).



#### 1.4. Tratamento quimioterápico

Desde a descoberta da doença de Chagas, muitos estudos propuseram fármacos que apresentassem efetividade em todas as fases do tratamento da doença. Para tal finalidade inúmeras substâncias químicas, extratos naturais e mistura de componentes foram avaliados, mas sem resultados promissores.

O nifurtimox (3 metil-4(5-nitrofurfuridilene) amino-tiomorfoline-2-1-dioxide) foi a primeira droga usada no tratamento da fase aguda da doença de Chagas (Brenner, 2000). Entretanto, atualmente o único medicamento disponível para o tratamento clínico da doença de Chagas é o benzonidazol (Nbenzil-2-nitroimidazol-1-acetamida). (Urbina *et. alii*, 2003). Uma vez que o nifurtimox, apresenta elevados efeitos colaterais no tratamento de pacientes.

Esses medicamentos apresentam atividade antiparasitária eficaz durante a fase aguda da doença, mas essa atividade é bastante reduzida durante a fase crônica. Além de apresentar uma ação limitada na fase crônica da doença, a eficácia desses fármacos varia entre as cepas de *T. cruzi*, devido a sua susceptibilidade e resistência à droga (Urbina e Docampo, 2003).

Cerca de 30% dos usuários apresentam reações adversas aos medicamentos (Pontes *et alii*, 2010). Essas reações adversas incluem anorexia, vômitos, náuseas, perda de peso, erupções cutâneas, dermatites, neuropatias e até mesmo distúrbios psiquiátricos, reduzindo ou inviabilizando a adesão ao tratamento (Barbosa, 2008).

A indústria farmacêutica tem realizado testes farmacológicos com derivados dos compostos utilizados no tratamento da doença a fim de buscar novos fármacos que provoquem a morte do parasita, que apresentem baixa toxicidade ao hospedeiro e que sejam capazes de agir na fase crônica da doença. Essas informações demonstram a necessidade de se buscar novas alternativas para o tratamento da doença de Chagas por meio da descoberta de alvos inéditos e potenciais para a síntese de quimioterápicos.

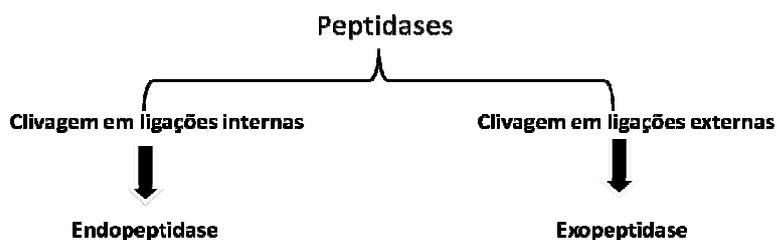


## 2. Proteases como possíveis alvos de drogas em *Trypanosoma cruzi*

Proteínas do parasito que atuam no metabolismo de açúcares e lipídios, na digestão de proteínas internalizadas do hospedeiro ou em processos vitais do parasito, têm sido estudadas como alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos (Chang e McGwire, 2002). Dentre essas proteínas encontram-se as proteases. Essa classe especializada de enzimas é utilizada por protozoários em diversas funções, incluindo a invasão de células e tecidos hospedeiros, a degradação de mediadores da resposta imune e a hidrólise de proteínas do hospedeiro para fins nutricionais (Klemba e Goldberg, 2002; McKerrow *et alii*, 1993; Rosenthal, 1999; Santana *et alii*, 1992). A participação da atividade de proteases no mecanismo de infecção das células do hospedeiro mamífero pelo *T. cruzi* é bastante discutida. Por exemplo, formas tripomastigotas do parasito quando tratadas com inibidores de proteases tais como leupeptina 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 metacicloênese 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.

### 2.1. Proteases

Proteases ou peptidases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas presentes em proteínas, peptídicos e em outros substratos. 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 ou aminopeptidases; Fig. 2). Essa atividade enzimática causa modificações de seus substratos com consequências importantes para os sistemas biológicos, sendo amplamente distribuídas na natureza (Klemba e Goldberg, 2002).



**Figura 2.** Classificação das proteases de acordo com a localização da ação catalítica.

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).

Em 1986, Barret e McDonald apresentaram um sistema de classificação para as enzimas proteolíticas de acordo com o mecanismo catalítico da proteína e sua susceptibilidade a determinados inibidores. As classes apresentadas foram: aspártico-, cisteíno-, metalo- e serino-proteases. Recentemente, duas classes foram incluídas: treonino- e glutâmico-proteases (Fig. 3).



**Figura 3.** Classes de proteases. O diagrama representa as seis classes de proteases. Adaptado de Motta, 2010.

**Aspártico-protease** - o sítio ativo é formado geralmente por um par de resíduos de ácido aspártico (Asp-Asp). São enzimas mais ativas em pHs ácidos e inibidas por pepstatina ou compostos de diazoacetil (Barret e Rawling, 1991). Em *Plasmodium*



*falciparum*, enzimas dessa classe (plasmepsina) digerem a hemoglobina do hospedeiro e são reconhecidas como alvo de drogas para tratamento da malária. A inibição dessas proteases cessa o crescimento do parasito levando-o à morte dentro da hemácia (Humpherys *et alii*, 1999; Rosenthal, 2002).

**Cisteíno-proteases** - amplamente distribuídas na natureza, possuem o sítio ativo formado geralmente pela tríade Cys-His-Asn. As atividades dos membros desta classe, da qual a papaína é protótipo, são inibidas por compostos que apresentam um grupo tiol bastante reativo, como o L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano (E-64). Os representantes mais importantes desta classe são as catepsinas, as calpaínas e as caspases. A cruzipaina, uma cisteíno-protease da família de catepsina L, é considerada a protease mais abundante em *T. cruzi* sendo expressa em todos os estágios do parasito e apresenta ampla especificidade catalítica. Inibidores irreversíveis de cisteíno-protease derivados da classe vinil sulfonas inativaram a cruzipaina e cessaram a replicação celular do parasito (Engel *et alii*, 1998a). Em modelo experimental murino da doença de Chagas aguda, um desses inibidores – o K777 - administrado via oral, produziu aproximadamente 50% de cura parasitológica (Engel *et alii*, 1998b).

**Serino-proteases** - classe de peptidases caracterizadas pela presença de um resíduo de serina no sítio ativo da enzima. Podem ser encontradas em eucariotos, procariotos, archaeas e vírus. Participam de muitos processos fisiológicos como digestão (tripsina, quimotripsina), respostas imunológicas e fatores de coagulação sanguínea. Essas proteases apresentam atividade máxima em pHs entre neutro e levemente alcalino e são inibidas por compostos como diisopropilfluorofosfato (DFP) e fenilmetilsufonil fluoreto (PMSF), dentre outros (Bond *et alii*, 1987; Rawlings *et alii*, 2006).

Uma das linhas de estudo do nosso grupo de pesquisa refere-se a um membro da classe de serino-protease: a prolil oligopeptidase de *T. cruzi* (POPTc 80). A POPTc 80 está envolvida com o processo de invasão na célula do hospedeiro uma vez que é secretada por formas tripomastigotas e hidrolisa colágenos dos tipos I e IV e fibronectina em vários sítios pós prolina (Grellier *et alii*, 2001; Santana *et alii*, 1997). Além disso, o envolvimento da POPTc 80 no processo de infecção foi sugerido pelo uso de inibidores seletivos. Essas moléculas inibem, *in vitro*, a entrada de tripomastigotas em diferentes tipos de células não fagocíticas, de forma dose-dependente (Bastos *et alii*, 2005).

**Treonino-proteases** - possuem apenas seis famílias descritas e parece existir uma participação nucleofílica do resíduo de treonina N-terminal, mas os inibidores precisam ser melhores caracterizados (Lowe *et alii*, 1995).



**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).

**Metaloprotease** – esta classe de enzimas é dependente de íons metálicos divalentes (zinco, cálcio, cobalto ou níquel) no mecanismo catalítico e parece direcionar a ligação peptídica a ser clivada e estabilizar a própria proteína (Barret e Rawlings, 1991). São inibidas por agentes quelantes de íons bivalentes, tais como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), fenantrolina além do fosfaramidon (Bond e Buller, 1987). Essas peptidases são encontradas amplamente em bactérias e eucariotos. A maioria delas localiza-se no meio extracelular, mas também podem ser encontradas associadas a membranas e no citoplasma. As colagenases fazem parte dessa classe, mas a representante mais importante é a termolisina do *Bacillus thermoproteolyticus* (Inouye *et alii*, 2007). Um exemplo de metalo-protease em tripanossomos é a glicoproteína de superfície gp63. Em *T. cruzi*, essa protease mostrou ter uma variação considerável de sua expressão nos diferentes estágios do parasito e em diferentes cepas (Lowndes *et alii*, 1996), porém seu papel no ciclo de vida do parasito ainda não foi elucidado.

## 2.2. Aminopeptidases

As aminopeptidases são enzimas do tipo exopeptidases que clivam ligações peptídicas de regiões aminoterminais de cadeias polipeptídicas (Nocek *et alii*, 2007). Essas enzimas participam de diversas funções celulares como maturação e renovação protéica, hidrólise de peptídeos reguladores, transformação de antígenos, modulação da expressão gênica, dentre outras funções essenciais. Elas são encontradas em animais, plantas e microorganismos, podendo ser localizadas intracelularmente no citoplasma, em organelas multicelulares, como componentes de membrana ou secretadas no meio extracelular (Bertin *et alii*, 2005).

Podem ser encontradas nas formas monoméricas ou oligoméricas. Em eucariotos essas enzimas são expressas em muitos tecidos, incluindo o intestino, o cérebro, pulmão, vasos sanguíneos e principalmente fibroblastos (Nocek *et alii*, 2007). Entretanto, em bactérias, as atividades aminopeptidolíticas podem estar localizadas no citoplasma, na membrana e podem também estar associadas ao envelope celular. Muitas aminopeptidases apresentam resíduos conservados em sua estrutura que formam sítios ativos capazes de se ligar em um ou dois íons metálicos que auxiliam na catálise enzimática. Os íons mais comuns



encontrados nos sítios catalíticos são o  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  (Nocek *et alii*, 2007). As aminopeptidases são classificadas conforme o mecanismo catalítico: cisteíno, serino e metalo aminopeptidases. As cisteíno e serino aminopeptidase requerem resíduos de cisteína ou serina e não possuem co-fatores associados às suas estruturas, além de serem encontradas em menor frequência quando comparadas às metalo aminopeptidases (Gonzales *et alii*, 1996). Essas clivam ligações peptídicas utilizando íons metálicos, o qual posiciona a molécula de água para efetuar a catálise.

Muitos estudos demonstram a importância da atividade de aminopeptidases de *Lactococcus lactis* sendo consideradas de grande interesse para a agroindústria na fabricação de produtos lácteos (Gonzales *et alii*, 1996). Além disso, aminopeptidases de bactérias patogênicas têm sido caracterizadas e apontadas como alvo para o desenvolvimento de antibióticos de amplo espectro (Zé-Qiang Ma *et alii*, 2007). Atualmente, as aminopeptidases são consideradas como importantes alvos para o desenvolvimento de novas drogas, como evidenciado pela importância de suas atividades no ciclo de vida de *Plasmodium* spp. (Howarth e Lloyd, 2000; Gavigan *et alii*, 2001; Lin *et alii*, 2001) e *Leishmania* spp (Morty e Morehead, 2002). As aminopeptidases são usadas como ferramentas moleculares no auxílio da determinação de sequências de proteínas, sejam como aditivos para ensaios de dois passos de endopeptidase, ou como agentes atuantes no processamento de proteínas recombinantes.

### 2.3. Metionina aminopeptidase

O processo de tradução de mRNAs é iniciado quando um códon de iniciação AUG “*start codon*” é encontrado, no qual a maquinaria de tradução interpreta como o resíduo metionina (Met). Em eucariotos todas as proteínas são sintetizadas no citoplasma sendo iniciadas por um resíduo de metionina. No retículo endoplasmático rugoso são sintetizadas proteínas destinadas ao retículo, membrana plasmática, complexo de Golgi, lisossomos e secreção celular. Os ribossomos associam-se às membranas do retículo na forma de polirribossomos, e portanto, encontram-se em plena atividade de síntese protéica. O complexo de Golgi, recebe as proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso no qual sofrem diversas modificações pós-traducionais, tais como glicosilação (adição de açúcares), metilação (adição de um grupo metil), fosforilação (adição de grupos fosfatos) entre outros. Após essas modificações as proteínas serão endereçadas para a membrana e/ou para organelas específicas. Para (Bradshaw *et alii*, 1998), essas modificações pós -traducionais são



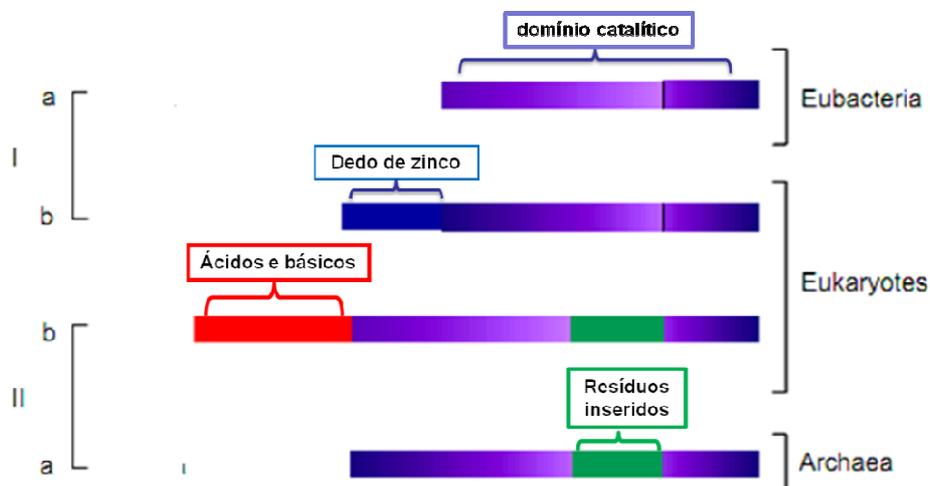
reconhecidas como etapas essenciais para a translocação, ativação, regulação e ultimamente a degradação de proteínas, particularmente em eucariotos.

A biossíntese em procariotos ocorre simultaneamente no núcleo e no citoplasma, iniciando quando um grupo formil é adicionado a um resíduo de metionina formando a formilmetionina. Esse grupo formil é hidrolisado por uma deformilase. A tradução em procariotos ocorre. Após esse processo o resíduo de metionina deve ser removido para prosseguimento da maturação de cadeias polipeptídicas recentemente formadas e assim, seguirem para o endereçamento (Addlagata *et alii*, 2005). Esse processamento de remoção é catalisado por uma família de proteínas da classe de metalo-aminopeptidases denominada de metionina aminopeptidase (MAPs) (Giglione *et alii*, 2004). Essas metalo-proteases possuem metais divalentes que participam da catálise, tais como:  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+2}$  (Lu *et alii*, 2010).

As MAPs podem ser encontradas em procariotos e eucariotos e diferem quanto ao número de resíduos de aminoácidos na região amino-terminal que compõem o domínio catalítico. Enquanto a MAP I e MAP II de procariotos apresentam pequenos peptídeos conservados no domínio catalítico; em eucariotos há uma região polipeptídica conservada. Essa catálise é importante para o processamento de muitas proteínas, influenciando em seus destinos e atividades fisiológicas. A atividade enzimática da metionina aminopeptidase precede modificações pós traducionais como acetilação e miristilação, processos que são importantes para o endereçamento e estabilidade de um grande e diverso número de proteínas (Nonato *et alii*, 2006).

As MAPs são divididas em duas classes: metionina aminopeptidase tipo I (MAP I) e tipo II (MAP II) e diferem quanto à organização dos domínios catalíticos. O tipo I é dividido em Ia, Ib e Ic. Os Tipos Ia e Ic estão presentes em procariotos como, por exemplo, em *E. coli* cuja MAP é do tipo I apresentando apenas um domínio catalítico em sua estrutura. Em eucariotos, existem as duas classes, sendo MAP I é do tipo Ib. Esse tipo de MAP apresenta um motivo dedo de zinco em sua estrutura o qual está envolvido com a associação desta enzima aos ribossomos (Fig. 4). Em procariotos há homólogos de ambas as classes. As MAPs II já foram descritas e bem caracterizadas em grupos de Archaeas (Olaleye *et alii*, 2010). Um aspecto que diferencia os tipos de MAPs tipo I e II é a inserção de um subdomínio de 60 resíduos de aminoácidos na região C-terminal. Além disso, elas podem diferenciar-se em aspectos chave como especificidade de substratos e controle da expressão gênica (Wang *et.al* 2008). Essas diferenças sugerem que as MAPs são relacionadas evolutivamente (Lowther *et alii.*, 1999). A diversidade de funcionamento dessas enzimas depende de sua localidade e do tipo de tecido (Nocek *et alii*, 2007). A diferença fisiológica entre esses tipos

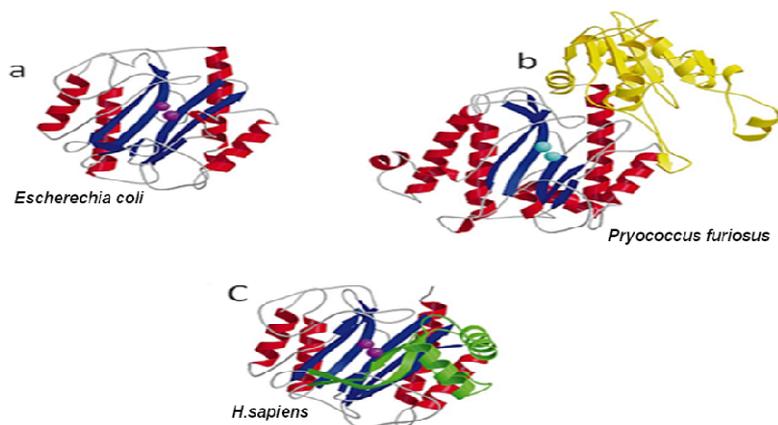
de MAPs ainda não é claramente entendidas (Wang *et alii*, 2008). Contudo, sua importância é destacada uma vez que sua ausência pode ser letal para alguns organismos, como *E. coli*, *Salmonella typhimurium* e *Saccharomyces* spp.



**Figura 4. Organização dos domínios dos tipos de metionina aminopeptidases.** O esquema demonstra a organização dos domínios nas classes de MAPs (adaptado de Bradshaw *et alii*, 1998). MAPs do tipo Ia são encontradas em eubacteria e a II a em Archaea; em eucariotos são encontrados os dois tipos de MAPs I e II que exibem um domínio polipeptídico na região N-terminal; tipo I b possui um domínio proteico dedo de zinco (azul) e a tipo II b apresenta região polipeptídica com resíduos ácidos e básicos (vermelho). Domínios catalíticos das MAPs (roxo) e resíduos inseridos nos domínios (verde) característicos da MAPs tipo II.

Análises cristalográficas de metionina aminopeptidase de *E. coli* demonstraram uma forma monomérica da enzima contendo dois íons cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ) com duas folhas  $\beta$  antiparalelas onde se encontram resíduos dos sítios ativos H79, D97, D108, H171, E204, e E235. Além disso, foi possível demonstrar homologia com outras enzimas proteolíticas (Gonzales *et alii.*, 1996). Essas análises ainda permitiram identificar que essas metaloproteases pertencem a uma família que apresenta um tipo comum de enovelamento conhecido como “*pita-bread*”, também conhecidos como clan MG M24. Essa estrutura apresenta domínios com uma pseudo-simetria relacionados com as regiões N-terminal e C-terminal sendo formadas por folhas  $\beta$  antiparalelas  $\alpha$  hélices. Ambos os domínios possuem resíduos conservados nos quais íons metálicos estão localizados. (Lowther *et alii.*, 1999), a interface entre os domínios estão envolvidos na catálise e ligação de íons metálicos (Giglione *et.al*, 2003; Fig. 5). Apesar da aparência simétrica da molécula, é possível observar uma

assimetria no sítio ativo. Nessa região assimétrica é encontrado um resíduo de metionina é exposto na região N-terminal (Lowther *et alii.*, 1999). Essa estrutura assemelha-se a de creatinase, que se diferencia das MAPs de outros organismos por não possuir íons metálicos.



**Figura 5. Estruturas cristalográficas de MAPs.** As estruturas cristalográficas apresentam um padrão de enovelamento “*pita-bread*” característico de metaloenzimas, adaptado de Lowther *et alii*, 2000. A pseudo-simetria está relacionada com os domínios na região N-terminal e C-terminal e são ilustrados por  $\alpha$  hélices (vermelho) e fitas  $\beta$  (azul) com os pares de íons metálicos na estrutura; inserção de um único subdomínio na estrutura (verde); a extensão de resíduos na região N-terminal (amarelo); íons metálicos no sítio ativo são  $\text{Co}^{+2}$  (roxo) e  $\text{Mn}^{+2}$  (azul). **A.** Estrutura cristalográfica de MAp de *Escherichia coli* PDB, acesso: 2MAT; **B** MAp II de *Pyrococcus furiosus*, PDB, acesso:1XGS; **C**-MAp II de Humanos, 1BN5.

As MAPs podem ser inibidas por fumagilina, um produto natural, e seus derivados como ovalicina e TNP 470. Esses inibidores se ligam irreversivelmente às MAPs alcalinizando um resíduo de histidina no sítio ativo (Wang *et alii*, 2003). Estudos com MAPs de humanos (HMAPs) demonstram que essas enzimas desempenham funções importantes no ciclo celular. A HMAp I parece estar envolvida no controle da fase G1 (interfase) para fase M, já a HMap II participa do controle de G2 para fase M. Nesse sentido, esses inibidores têm sido testados a fim de regular o ciclo celular, visto que uma atividade descontrolada desse ciclo poderia causar proliferação exarcebada de células endoteliais ocasionando vascularização e metástase em tumores (Wang *et alii*, 2008). A ação de TNP 470, um análogo sintético de fumagilina, sobre metionina aminopeptidases de humanos (HMAPs) apresentam um efeito inibitório. Esses inibidores agem diretamente na proliferação de células endoteliais prevenindo a vascularização e metástase em tumores. (Ze-Qiang Ma *et alii*, 2007).



A ovacilina é outro análogo sintético de fumagilina que age na inibição de HMAPs impedindo a angiogênese. Dessa forma, as MAPs são um importante alvo na construção de fármacos no tratamento do câncer. Recentemente TNP 470 e fumagilina foram utilizados em estudos inibição no crescimento de *Leishmania* spp. e *P. falciparum* (Zhang *et alii*, 2002). Esses compostos também apresentam ampla eficácia antiparasitária em testes realizados com *Trypanosoma brucei* e em cepas de amebas (Muendel *et alii*, 2009). MAPs tem sido alvo de muito estudos para o desenvolvimento de drogas contra bactérias e demais patógenos devido ao seu papel importante no crescimento e viabilidade celular (Peng *et alii*, 2010). Ainda, estudos utilizando nocautes revelaram que a deleção de MAPs em *E. coli*, *Salmonella typhimurium* e *Saccharomyces cerevisiae* pode ser letal a esses microorganismos, o que indica que essas enzimas podem ser alvos de antibióticos e antifúngicos (Addlagata *et alii*, 2005).

A doença de Chagas é ainda considerada de grande impacto sócio-econômico em vários países e tem sido alvo de interesse de grupo de pesquisadores que se propõem a compreender os mecanismos moleculares na interface parasito-célula-hospedeira, no intuito de investigar novos fármacos que sejam eficazes no tratamento da doença, eliminando completamente o parasita do hospedeiro. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado à caracterização molecular e funcional de proteases como possíveis alvos de drogas em *T. cruzi*, pois essas enzimas são fatores de virulência em vários patógenos.



## Objetivos

Este trabalho faz parte da linha de pesquisa cuja proposta é o entendimento de mecanismos moleculares da interação patógeno-hospedeiro, visando à identificação de possíveis alvos de drogas. Nosso trabalho tem se destinado a estudos de caracterização molecular e funcional de proteases pelas quais poderão ser exploradas como possíveis alvos no desenvolvimento de drogas para o tratamento da doença de Chagas. Essa dissertação teve como objetivo clonar, expressar e realizar experimentos de citolocalização da metionina aminopeptidase de *T.cruzi* (MAPTc), uma enzima que desempenha um papel importante no funcionamento celular de diversos sistemas biológicos.

### Atividades desenvolvidas:

1. Clonagem e expressão do gene metionina aminopeptidase de *T. cruzi* (MAPTc) em sistema heterólogo *E.coli*;
2. Purificação da proteína recombinante;
3. Produção anticorpos específicos contra a enzima purificada e determinação de sua antigenicidade;
4. Verificação da expressão de MAPTc por imunofluorescência;
5. Realização de ensaios enzimáticos e estudos de inibição *in vitro* a fim de caracterizar bioquimicamente a MAPTc.



## Materiais e Métodos

### 1. Análises de bioinformática

As análises de bioinformática foram realizadas através de buscas nos bancos de dados GeneDB ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)), (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) para obtenção das sequências gênica e protéica da metionina aminopeptidase (Tc00.1047053507031.120). Para verificar se a metionina aminopeptidase de outros organismos apresenta similaridade significativa com a mesma sequência desta enzima de *T. cruzi*, os dados obtidos foram alinhados utilizando o programa Bioedit e Clustalw.

### 2. Amplificação do gene Tcmap

Inicialmente foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores a partir da sequência gênica de MAPTc depositada em banco de dados. Foram adicionados sítios de restrição nos iniciadores. No oligonucleotídeo senso inseriu-se sítio para a enzima *XhoI* (sublinhado) (5'-CTCG AGATGCCATGTGAGGGCTGC3') e no oligonucleotídeo anti-senso inseriu-se o sítio para a enzima *BamHI* (sublinhado) (5'-GGATCCTTAATGCGCCACACCATT 3').

A amplificação foi realizada por meio de reações de polimerização em cadeia (PCR), contendo o DNA genômico molde 2 ng/μL, tampão de enzima 1X, dNTP 0,2 mM, 1,5 mM de MgSO<sub>4</sub> e 1 U de DNA polimerase (*Taq DNA polimerase* ou 1U *pfx DNA polimerase high fidelity*).

O ciclo de PCR constituiu de desnaturação por 94 °C por 3 min, seguida por anelamento dos oligonucleotídeos por 30 s a 62 °C. Em seguida foram realizadas etapas de polimerização e extensão a 72 °C por 2 min, conforme protocolo da enzima. Foram realizados 30 ciclos na reação, finalizando com uma última etapa de extensão. Os produtos de PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose e os tamanhos confirmados por meio de comparação com marcadores moleculares.

### 3. Eletroforese em gel de agarose

As reações de PCR e ensaios de restrição foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose 0,7 % ou 0,8 % corados com brometo de etídio 1 μg/mL. Foi utilizado um sistema de eletroforese horizontal com tampão Tris acetato 1X (TAE 1; TRIS 17,8 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM pH 8,0 e ácido acético 0,1 %) sob voltagem entre 60 V e 100 V. Inicialmente as amostras foram preparadas em tampão de corrida 1X (azul de bromofenol 25



%, xileno Cianol 25 %, Tris 50 mM pH 7,6 e glicerol 6 %). Para confirmação das bandas de DNA foi utilizado um marcador molecular *1 Kb plus DNA ladder* (500 pb até 12 Kb) da Invitrogen.

#### **4. Clonagem e subclonagem do gene *Tcmap*.**

##### **4.1. Ligação do inserto no vetor de clonagem pCR 2.1**

Com a confirmação do inserto amplificado no tamanho esperado, iniciou-se as etapas de clonagem no vetor pCR 2.1 para obtenção de um vetor recombinante. Para as reações de ligação utilizouaram-se as seguintes condições: 80-100 ng do inserto, 25 ng do vetor pCR2.1(Invitrogen), 4U de T4 DNA ligase (Invitrogen) e o tampão da enzima 1X. Após montagem da reação, incubou-se a 14 °C por 16 h em um termociclador. Após incubação, realizou-se a transformação da cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, na qual metade do volume da reação de ligação foi adicionada à bactéria. Aguardou-se um intervalo de 30 min no gelo e o material foi incubado em banho-maria a 42 °C por 1 min a fim de permitir o choque térmico e introdução do inserto na bactéria. Posteriormente, adicionou-se meio Luria-Bertani (LB) por 1 h no agitador a 37 °C. Após transcorrido o tempo, o material foi plaqueado em meio LB com Ágar (LB ágar) com ampicilina 100  $\mu$ g/mL para meio seletivo, X-Gal 80  $\mu$ g/mL e IPTG 0,5 mM. As placas foram incubadas em uma estufa ajustada a 37 °C por 16 h. Posteriormente as colônias brancas obtidas foram selecionadas para a realização de extração de DNA plasmidial para análise de restrição enzimática.

##### **4.2. Subclonagem no vetor de expressão pET19b**

Após a confirmação da clonagem no pCR 2.1 foram realizados testes de digestão enzimática a fim de isolar o inserto para subclonagem no vetor de expressão pET19b (Novagen). Esse vetor também foi digerido com as enzimas XhoI e BamHI para sua linearização e consequente utilização na ligação com o gene *tcmap*, permitindo então a formação do vetor recombinante pET19b-*tcmap*. Após a reação de ligação, a subclonagem foi confirmada por análise de restrição enzimática e sequenciamento. Com essa confirmação, foram realizados subsequentes testes de expressão da proteína recombinante.



## 5. Análise de restrição enzimática e extração de DNA plasmidial

As etapas de clonagem nos vetores pCR 2.1 e pET19b foram seguidas de testes de digestão enzimática. Para rastrear as etapas de clonagem, as colônias obtidas foram adicionadas ao meio LB com ampicilina. Esse inóculo foi submetido agitação por 16 h com rotação de 200 rpm a 37 °C. Após verificação do crescimento bacteriano, realizou-se uma extração de DNA plasmidial, utilizando o kit de *midiprep Hipure Plasmid DNA purification* (Invitrogen). Posteriormente o material foi utilizado para ensaios de restrição enzimática parcial e total utilizando enzimas específicas por aproximadamente 3 h a 37 °C. Os produtos de digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % seguida de coloração com brometo de etídio.

## 6. Expressão heteróloga da proteína recombinante (MAPTc)

Após confirmação da clonagem do gene, o vetor de expressão recombinante pET19b-*tcm*ap foi introduzido em *E. coli* BL21-(DE3) por meio de transformação. Foi preparado um inóculo com o material em meio LB com ampicilina e o crescimento bacteriano foi monitorado por meio de um espectrofotômetro até alcançar uma densidade óptica no intervalo de 0,4 a 0,6 que corresponde à fase exponencial de crescimento bacteriano. A expressão da proteína recombinante foi induzida utilizando várias concentrações de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo) em temperaturas e rotação controladas. As condições do teste de indução foram as seguintes: IPTG variando nas concentrações 1,0, 0,1, 0,05 e 0,01 mM; temperaturas variando entre 20 e 30 °C por 16 h e 25 °C por 3 h com rotações de 200 rpm. Para o preparo do extrato, as amostras induzidas foram lisadas por Bug Buster (Novagen) ou por sonicação e centrifugadas por 15 min a 1600 rpm. Posteriormente as frações solúveis e insolúveis do lisado bacteriano foram separadas e analisadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras.

## 7. Purificação da MAPTc

Inicialmente o extrato bacteriano contendo a proteína induzida foi lisado com *Bug Buster* ou sonicação e as frações solúveis e insolúveis foram separadas. Adicionou-se à fração solúvel um inibidor de cisteíno-protease (E-64) e DNase. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 16.000 g. A proteína recombinante adquire uma cauda de 9 resíduos de histidina (His) na extremidade N-terminal fornecida pelo plasmídeo de



expressão. Essa cauda de His é utilizada como importante ferramenta para a purificação da proteína recombinante. Dessa forma a MAPTc foi purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna com resina de níquel do Kit de purificação (His Bind Kits-Novagen). Primeiramente foi adicionada a coluna um contendo níquel (Charge Buffer) 1X) e posteriormente foram coletados o extrato protéico não ligado na coluna, as lavagens inicial e final, bem como as eluições obtidas em várias concentrações de imidazol e tampão de ligação (Bind Buffer 1X), no intuito de monitorar a purificação da proteína e de padronizar o protocolo.

Após a purificação da proteína, foram realizados testes de *immunoblotting* a fim de confirmar a expressão de MAPTc. Para isso, foi utilizado um anti-His tag (Novagen) como o primeiro anticorpo, na diluição de 1: 1000 e o segundo anticorpo, anti IgG de camundongo (GAMPA) (Novagen). Após incubação com PBS-leite 5%, as membranas foram incubadas com o primeiro anticorpo ou imune na diluição e mantidas por 16 h sob agitação a -20 °C. Após essa incubação, a membrana foi novamente incubada com o segundo anticorpo por 2 h sob agitação em temperatura ambiente. Para revelação das bandas utilizaram-se os substratos 5-Bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) e (5-Bromo-4chloro-3indoly-phosphate nitro/blue tetrazolium (NBT) para a fosfatase alcalina.

## 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi utilizada para análise das amostras induzidas e da proteína purificada. Após lise bacteriana, utilizaram-se 20 µL de cada fração acrescidos de 5 µL de tampão de amostra 5X (Tris-HCL 250 mM pH 6,8, SDS 10 % (p/v), glicerol 30 % (v/v) e azul de bromofenol 0,04 % (p/v) . Em seguida, as amostras foram fervidas por 10 min e submetidas à 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. Utilizou-se um sistema de eletroforese vertical contendo um gel concentrador e outro separador em concentração de 12 %. Para confirmação do tamanho predito da proteína, utilizou-se um marcador molecular denominado *BenchMarker* (Invitrogen). As bandas de proteínas foram visualizadas por coloração com azul de Coomassie.



## 9. Produção e obtenção de anticorpos para imunodeteção

Para as imunizações com a proteína recombinante foram utilizados quatro camundongos fêmeas da linhagem Balb/C com dois meses de idade mantidos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Inicialmente foi retirado sangue dos camundongos para obtenção do soro pré-imune utilizados como controle. Posteriormente, os camundongos foram imunizados com a proteína recombinante purificada. As imunizações foram realizadas em três etapas: Na primeira imunização os camundongos receberam uma dose contendo 5 µg de proteína com adjuvante completo de Freud na proporção de (1:1). Após quinze dias os camundongos foram imunizados novamente com 5 µg de proteína com adjuvante incompleto na proporção (1:1). Aguardou-se quinze dias e os camundongos receberam uma dose de 5 µg da proteína dissolvidas em PBS 1X finalizando as imunizações. Após cinco dias, foi retirado o sangue dos camundongos e os soros separados e estocados a -20 °C.

Para caracterizar os anticorpos foram preparados extratos de formas epimastigotas de *T. cruzi*. O extrato de *T. cruzi* foi preparado por lise através de etapas de congelamento e descongelamento. Os extratos totais foram aplicados no gel de poliacrilamida 12% (10<sup>7</sup> parasitos por poço) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. Após incubação com PBS-leite 5%, as membranas foram incubadas com os soros pré-imune ou imune na diluição de 1:100 e 1:200 mantidas por 16 h sob agitação a -20 °C. Após esse período, as membranas foram lavadas e incubadas com o segundo anticorpo (*Goat Anti-mouse IgG Alkaline phosphatase conjugate* (Novagen). Para revelação das bandas utilizaram-se os substratos 5-Bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) e (5-Bromo-4chloro-3indoly-phosphate nitro/blue tetrazolium (NBT) para a fosfatase alcalina.

## 10. Atividade enzimática

Os ensaios enzimáticos foram realizados com 25 mM do substrato metionina-7-amido-4-metilcumarina (Met-AMC) em tampão Tris-HCL 25 mM, pH 8,0 em triplicata com íons metálicos Co<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> e Cu . A liberação de AMC foi monitorada por 30 min (Santana et alii, 1997). Foram testadas as condições descritas acima variando a temperatura entre 25 °C e 37 °C.



## 11. Imunofluorescência e citolocalização de MAPTc

As lâminas foram previamente lavadas com H<sub>2</sub>O MilliQ e posteriormente com álcool 70%. Após secagem, as lâminas foram tratadas com poli-lisina 0,1% para permitir aderência futura dos parasitos. Utilizou-se cultura de epimastigota contendo 10<sup>6</sup> parasitos/lâmina por contagem em câmara de Neubauer. Após contagem, a cultura de células foi submetida à centrifugação por 4000 g por 10 min, seguida de três lavagens com PBS 1X filtrado em membrana de 0,22 µm. A seguir, os parasitos já fixados nas lâminas foram permeabilizados com Triton-100X e depois lavados com PBS 1X. Após incubação com PBS-leite 5 %, as lâminas contendo os parasitos fixados e permeabilizados foram incubadas com o soro pré-imune ou imune diluídos em PBS 1X filtrado (1:50, 1:100 ou 1:200) por 16 h a -4 °C em câmara úmida. As lâminas foram lavadas com PBS 1X e então incubadas com anti-IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen)(1:400) à temperatura ambiente em câmara úmida por 3 hs. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) diluído em PBS 1X por 20 min (1:200) a fim de marcar o DNA dos parasitos em azul. Por último, as lâminas foram montadas com Gold Antifade (Invitrogen) e os resultados obtidos foram analisados por microscopia de fluorescência.

## 12. Testes de inibição do crescimento de parasitos

Para testes do efeito de inibição da proteína MAPTc utilizou-se o inibidor TNP470. Os testes foram preparados em placas de Elisa contendo nos poços 10<sup>5</sup> formas epimastigotas/mL em meio de cultura LIT (Liver Infusion Triptose) e inibidor TNP470 diluído na concentração desejada. Como controle foi utilizado o mesmo sistema de reação, na ausência do inibidor TNP470. Os testes foram realizados em triplicatas com um volume final de 200 µL/poço, utilizando as seguintes concentrações de inibidores: 10, 1,0 ou 0,1 µM através de diluição seriada. A placa foi incubada em uma estufa a 37 °C. Foi analisada a taxa de crescimento e sobrevivência dos parasitos em relação ao tempo de incubação com o inibidor, realizando a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer nos tempos 0, 24, 36 e 48 h.

## 13. Modelagem molecular da MAPTc

O modelo da MAPTc foi construído com base na estrutura cristalográfica da Metionina Aminopeptidase Humana tipo I, PDB 2B3H, com o auxílio do programa



Discovery Studio 2.5 (Accelrys). Com esse aplicativo foram feitas as etapas da modelagem (MODELER) e da minimização de energia. A minimização de energia foi realizada em campo de força CHARMM, com carga parcial Momany-Rome, pelo protocolo “*Smart Minimizer*” (1000 etapas de minimização do tipo “*steepest descent*” seguida de 200 etapas de minimização de gradiente conjugado) em um solvente implícito do tipo GBSW (Generalized Born with a simple SWitching).

#### 14. Análise Filogenética de MAPTc

A análise filogenética foi realizada a partir do alinhamento de 22 sequências de referência depositadas em bancos de dados (RefSeq, NCBI, 2002), sob os seguintes números de acesso: *Escherichia coli* MetAP, AP\_000828.1; *Mycobacterium tuberculosis* MetAP, ZP\_03414699.1; *Homo sapiens* MetAP1, NP\_055958.2; *Homo sapiens* MetAP2, NP\_006829.1; *Mus musculus* MetAP1, NP\_780433.1; *Mus musculus* MetAP2, NP\_062622.1; *Saccharomyces cerevisiae* MetAP1, NP\_013345.1; *Saccharomyces cerevisiae* MetAP2, NP\_009462.1; *Oryza sativa* MetAP1, NP\_001048199.1; *Oryza sativa* MetAP2, NP\_001067330.1; *Leishmania braziliensis* MetAP1, XP\_001564182.1; *Leishmania braziliensis* MetAP2, XP\_001564800.1; *Leishmania infantum* MetAP1, XP\_001465017.1; *Leishmania infantum* MetAP2, XP\_001465516.1; *Leishmania major* MetAP1, XP\_001682631.1; *Leishmania major* MetAP2, XP\_001683023.1; *Trypanosoma brucei* MetAP1, XP\_828000.1; *Trypanosoma brucei* MetAP2, XP\_822400.1; *Trypanosoma cruzi* MetAP1a, XP\_817257.1; *Trypanosoma cruzi* MetAP1b, XP\_808458.1; *Trypanosoma cruzi* MetAP2a, XP\_816914.1; *Trypanosoma cruzi* MetAP2b, XP\_813394.1. O alinhamento das sequências, assim como, as análises evolutivas filogenéticas e moleculares foram realizadas com o programa MEGA 4 (Tamura, Dudley, Nei, e Kumar 2007). A árvore filogenética foi construída pelo método estatístico *Neighbor-Joining* (Saitou e Nei, 1987), com 1000 réplicas de bootstraps (Felsenstein, 1985) e um modelo de substituição do tipo JTT (Jones, Taylor e Thornton, 1992).



## Resultados

### 1. Alinhamento das sequências de metionina aminopeptidases (MAPs) de diferentes organismos

Análises do genoma do *T. cruzi* no banco de dados [www.genedb.org](http://www.genedb.org) revelaram a existência do gene codificador para metionina aminopeptidase (MAPTc) que parece estar presente em cópia única por genoma haplóide do parasito. A fim de investigar sobre a existência de homólogos e o grau de identidade entre os mesmos, fez-se uma análise genética *in silico* a partir de informações presentes em bancos de dados. As sequências descritas no alinhamento foram comparadas por meio dos programas BLAST e CLUSTAL W. Os resultados do alinhamento mostram um alto grau de identidade em relação a todas as MAPs dos cinetoplastídeos analisados, sendo eles *Trypanosoma brucei gambiense* (*Tb. gambiense*), *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) e *Leishmania major* (*L. major*) e *Leishmania infantum* (Fig.6).

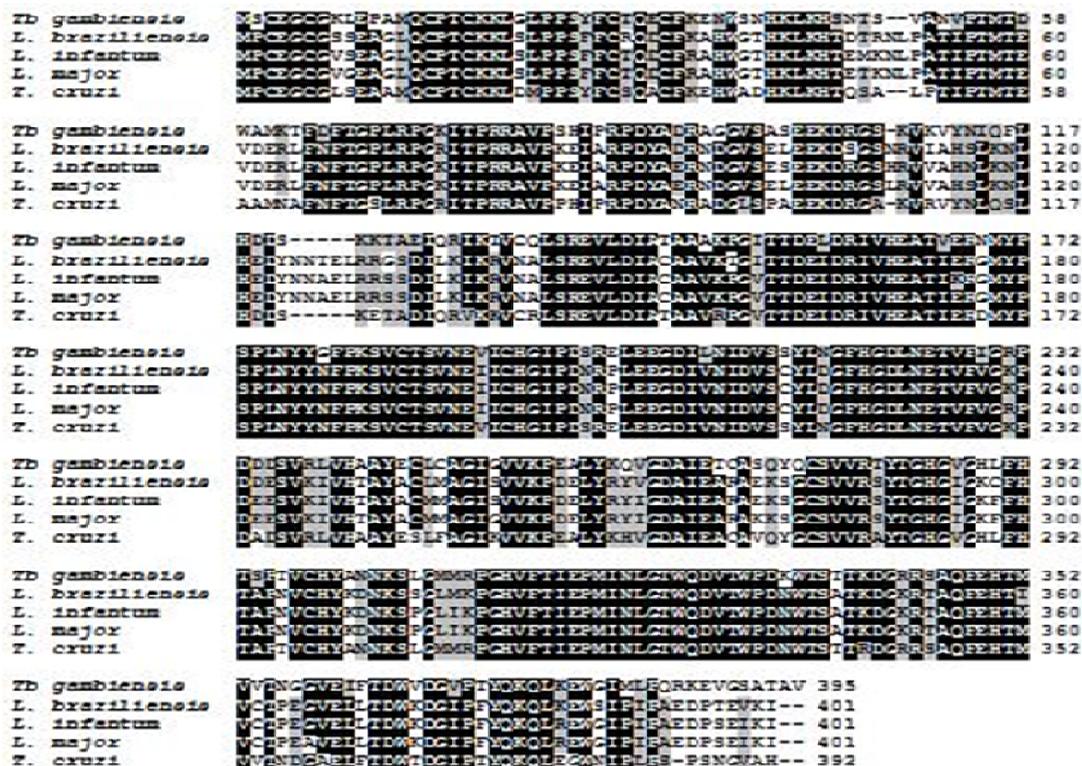


Figura 6. Alinhamento de sequências de resíduos de aminoácidos de metionina aminopeptidases de patógenos. *T.brucei-Trypanosoma brucei gambiense* (XP\_82800.1); *L.braziliensis - Leishmania braziliensis* (XP\_001564182.1); *L.infantum - Leishmania infantum* (XP\_001465516.1).*T.cruzi -Trypanosoma cruzi* (Tc00.001047053507031.120).Negrito, resíduos de aminoácidos idênticos; cinza claro, resíduos de aminoácidos similares.

**Tabela 1**

Metionina aminopeptidase de *T. cruzi* (MAP<sub>Tc</sub>) compartilha alta percentagem de identidade com aquelas de outros cinetoplastídeos.

Número de acesso	Cinetoplastídeo	Identidade (%)
XP_82800.1	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	79,4
XP_001564182.1	<i>Leishmania braziliensis</i>	70
XP_001465516.1	<i>Leishmania infantum</i>	69,5

As sequências utilizadas na análise foram obtidas no NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

O alinhamento foi realizado com o CLUSTALW, utilizando as sequências completas.

Em seguida foi realizado um alinhamento com as sequências protéicas da MAP<sub>Tc</sub>, das MAPs I e II de humano. Esse alinhamento foi realizado no intuito de verificar a homologia entre as sequências de resíduos de aminoácidos das metionina aminopeptidases de humano com a MAP<sub>Tc</sub>. Nesse sentido, a análise permitiu inferir que MAP<sub>Tc</sub> apresenta 4 % de identidade e 13 % de similaridade com a metionina aminopeptidase de procarioto (*E. coli*). Já em relação às metionina aminopeptidases de humano, map I e map II verificou-se uma similaridade de 12 % e 3 % respectivamente e uma identidade inferior à 3,5 % nas MAPs I e II de humano quando comparadas a TcMAP (map I – 3 % e map II – 2,4 %).

Além disso, observou-se a presença dos resíduos de aminoácidos que provavelmente compõem o sítio ativo da MAP<sub>Tc</sub> (H 194, D 211, D 222, H 285, E 318, e E 349), como descrito no banco de dados. Os resíduos do sítio ativo de histidina, ácido aspártico e o primeiro de ácido glutâmico, estão conservados nas sequências protéicas de MAPs dos cinetoplastídeos analisados (Fig. 6).

Nesse sentido, a análise permitiu inferir que a MAP<sub>Tc</sub> não apresenta homologia com as MAPs I e II de humanos. De acordo com o alinhamento, os resíduos de aminoácidos que compõem o sítio catalítico, H, D e E, estão conservados em todos os organismos analisados (em vermelho – Fig. 7).



```

T. cruzi      MPCEGCGLSEAAQCPTCKKLDMPSPSYFCSQACFKEHWADHKLKHTQSALPTITMTTEAMNAFNFTGSL 70
H. sapiens I -----MGSSHHHHHHSSGL--VPRGSHMLEDPYRYTGKL 32
H. sapiens II -----MAAPCAAQCLYRTGGLRLLQRI SRLPHCHKDASLAHQCFHRSFFWRKPKTSHSVVVRPAIVR--- 62
E. coli      ----- 1

T. cruzi      RPGR-ITPRRAVPEIIPRPDYANRADGLSPAEEKDRGAKVRVYNLQSLHDDSKETADIQRVKKVCRISSRE 139
H. sapiens I  RPHYPLMPTRPVPSYIQRPDYADHPLGMSESEQALKG---TSQIKLLSSE-----DIEGMRLVCRIARE 93
H. sapiens II -----PAYPVKELCRPDYVSSSKVPEWPDYIEIK-----DEECLQGLFRACQLARH 109
E. coli      -----MAISIKTP-----EDIEKMRVAGRIAAE 23

T. cruzi      VLDIATAAVRPGVTTDEIDRIVHEATI-ERDMYPSPLNYNFPKSVCTSVNEVICHGIPD-SRELEEGDI 207
H. sapiens I  VLDVAAGMFKPGVTTDEIDHAVHLACI-ARNCYPSPLNYNFPKSCCTSVNEVICHGIPD-FRPLQEGDI 161
H. sapiens II ILLLTGNSIKVGMTTDEIDFTVHQEATI-RHNCYPSPLHYGGFPKSVCTSVNIVVCHGIPD-SRPLQDGD 177
E. coli      VLEMIEPYVKPGVSTGELDRICNDYIVNEQHAVSAICLGHGYPKSVCTISINEVICHGIPDADAKLLKDGDI 93

T. cruzi      VNI DVSSYLNGPHGILNETVFGKPDADSVRLVHAAAYESIFAGIKVVKPEALYKHVGDATTEACAVQYGC 277
H. sapiens I  VNVRLITLIRNGYHGILNETVFGVEVDDGARKLVQTTYEOLMCAIDAVKPGVRYRELGNILQKHAQANGFS 231
H. sapiens II INI DVTVYLEGYHGTSETFLIGSVNDQGRKLVQVARQCRDQAIAACGPGQPLCVIGNIISNIANSNGFR 247
E. coli      VNI DVTVIKDGFHGTSKMFI VCKPTIMGERICRITQESTLYLALRMVKPGINLREICAAIQKFVEAEGFS 163

T. cruzi      VVRAYTGHCVGHLFHTAPTIVCHYANNKSLGMVREPHVFTIEPMINLCITWQDVTWPDNWTSTTRDGRRSAC 347
H. sapiens I  VVRSYCGGIIHKLFTAPNVPHYAKNKAVGVMSGHVFTIEPMICEGGWODETWPDGWTAVTRDGRRSAC 301
H. sapiens II VCPYFIGGIGIEYFHGHPEIWHANDN-DLKMEEGMSFTIEPILMBCTSEFRILSDKWTAVSVDKRSAC 316
E. coli      VVREYCGGIGIRGFHEEPQVLYHDSRETNVVLKPGMTFTIEPMVNAKKEIRFMKDGWTVKKTKDRSISAC 233

T. cruzi      FEHTMVVTNDGAELEFDWTDGIPTYQKQLEGWNIPLPSPSNGVAH 392
H. sapiens I  FEHTLLVTDTGCEILTRRLDSARPHFMS----- 329
H. sapiens II FEHTVVTSDGVEILLTKLPEE----- 338
E. coli      FEHTIVVTONGCEILLRKKDDTIPAIISHDE----- 264

```

Figura 7. A MAPTc não apresenta homologia com as metionina aminopeptidases I e II de humano. *T. cruzi* – *Trypanosoma cruzi* (Tc00.1047053507031.120);; *H. sapiens I* - *Homo sapiens* (2B3H); *H. sapiens II* - *Homo sapiens* (Bx 548015.16). Negrito, resíduos de aminoácidos idênticos; cinza claro, resíduos de aminoácidos similares; Vermelho, aqueles que compõem o sítio catalítico.

Tabela 2

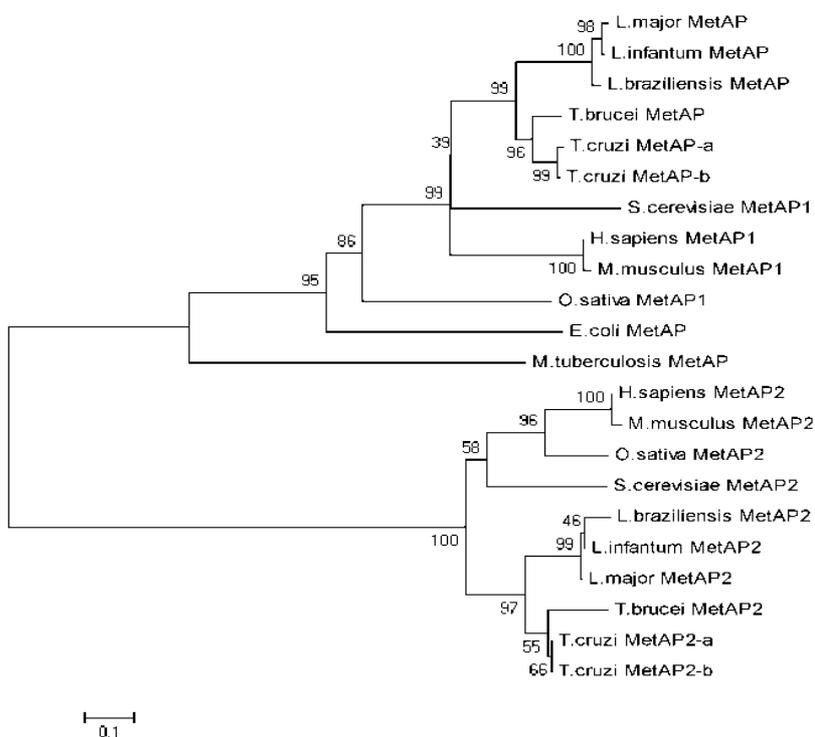
Metionina aminopeptidase de *T. cruzi* (MApTc) compartilha percentagem de identidade com aquelas de outros cinetoplastídeos.

Número de acesso	MAp	Identidade (%)	Similaridade (%)
2B3H	<i>HsMApI</i>	4,5	9,1
Bx 548015.16	<i>HsMAp II</i>	5,5	10,7

As sequências utilizadas na análise foram obtidas no NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). O alinhamento foi realizado com o Clustal W, utilizando as sequências completas.

## 2. Análise Filogenética das sequências de metionina aminopeptidases de diferentes organismos

Com base no alinhamento de 22 sequências de referência depositadas em bancos de dados, a análise filogenética de famílias de metionina aminopeptidases permitiu inferir que a separação dos clados das MAPs I e das MAPs II sugere que essas enzimas são mais semelhantes entre espécies diferentes do que entre si, ou seja, o surgimento da família das MAP 2 entre os eucariotos provavelmente foi um evento ancestral (Fig. 8).



**Figura 8. Análise filogenética de diferentes MAPs.** A árvore foi desenhada em escala, com o comprimento dos ramos na mesma unidade que as distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas pelo método JTT e estão em unidades do número de substituições de aminoácidos por sítio. A análise envolveu 22 sequências de aminoácidos. Análises evolutivas foram realizadas com o programa MEGA4.

A conservação das duas famílias de enzima (claramente distintas) nas espécies eucariotas também pode sugerir uma diversificação das funções das mesmas, com consequente vantagem evolutiva, já que ambas estão presentes em um amplo espectro de espécies, conforme demonstrado na figura 8.

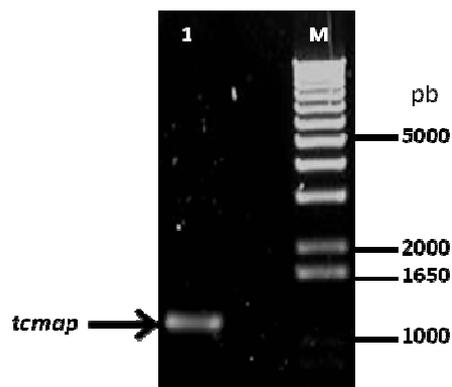
Como observado anteriormente, de acordo com o alinhamento, as sequências de resíduos de aminoácidos de MAPs I e II de *T. cruzi* e *H. sapiens* não apresentaram



identidade e similaridade significativas entre si (Fig. 7). Em razão deste resultado, é possível inferir que essa proteína possui características promissoras quanto ao propósito desse estudo cuja finalidade é a busca por alvos eficientes para o desenvolvimento de novos fármacos. Por essa razão, iniciou-se as atividades de clonagens do gene em questão.

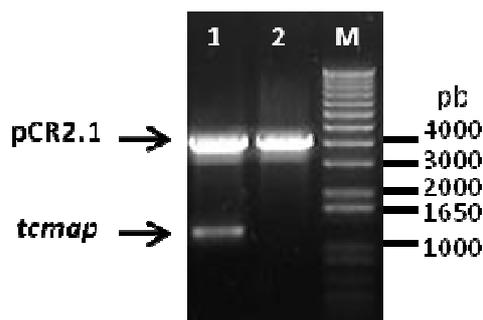
### **3. Clonagem e subclonagem do gene da metionina aminopeptidase de *T. cruzi* (MAPTc).**

Para clonar o gene codificador da (*MAPTc*), iniciadores específicos foram desenhados e sintetizados a partir da sequência disponível no banco de dados ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)); o gene *tmap* tem uma fase aberta de leitura de 1179 pb que codificaria uma proteína predita de 47 kDa. O padrão de substrato para enzimas de restrição a ser utilizado nos iniciadores foi analisado a partir da sequência e considerado para a escolha dos sítios de clonagem presentes no vetor. Dessa forma, foram sintetizados iniciadores com sítios das enzimas de restrição XhoI (senso) e BamHI (anti-senso). O material genético a ser utilizado na primeira reação de amplificação foi extraído da cultura de epimastigotas de *T. cruzi* CL Brener, conforme procedimentos adaptados de Medina-Acosta e Cross (1993). 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 do gene. O gene *tmap* amplificado foi visualizado no gel no tamanho esperado em comparação com o marcador e em conformidade com as informações previamente obtidas. A banda do produto amplificado apresentou tamanho de aproximadamente 1179 pb (Fig. 9). Após essa etapa, iniciou-se o processo de clonagem e subclonagem do inserto recém-amplificado.



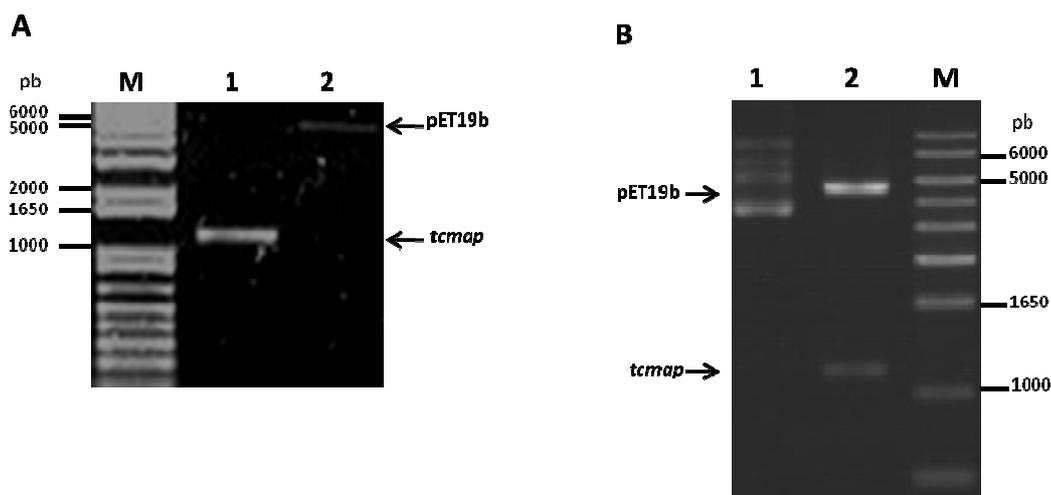
**Figura 9.** Análise em gel de agarose da amplificação do gene *tcmap* utilizando DNA genômico de *T. cruzi* e iniciadores específicos. A PCR foi realizada utilizando os iniciadores senso e anti-senso específicos para *tcmap*. Foi aplicado 1,0  $\mu$ L da reação para visualização no gel. (1) Amplificação do gene *tcmap*. (M) Marcador 1,0 Kb plus DNA ladder. O gel de Agarose 0,8 % foi corado com brometo de etídio.

O produto de amplificação foi utilizado em reações de ligação com o vetor de clonagem pCR2.1 *Invitrogen* (3,9 Kb). Após a reação, *E. coli* DH5 $\alpha$  foi transformada com o pCR2.1-*tcmap* e várias colônias positivas e uma colônia negativa foram selecionadas para extração do DNA plasmidial e realização de análises de restrição enzimática. As análises de restrição enzimática foram realizadas utilizando as enzimas *XhoI* e *BamHI*, de acordo com os materiais e métodos, e o resultado foi analisado em gel de agarose 0,7 %. Dessa forma foi possível verificar. Após a digestão enzimática, a liberação dos fragmentos nos tamanhos esperados de aproximadamente 1179 pb e 4000 pb referentes ao inserto *tcmap* e ao vetor pCR2.1, respectivamente (Fig. 10). Além disso, como já aguardado, o fragmento correspondente ao *tcmap* não foi observado no controle negativo (Fig. 10). Nesse sentido foi possível confirmar o sucesso da clonagem do *tcmap* no vetor pCR2.1. Para corroborar a clonagem, um clone positivo foi sequenciado (dados não mostrados).



**Figura 10. Análise de restrição enzimática de pCR2.1-*tcmap*.** A clonagem do gene *tcmap* no vetor pCR2.1 foi confirmada por digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI*. (1) – Clone positivo; (2) Clone negativo; (M) – Marcador molecular 1 kb plus DNA ladder. O gel de Agarose 0,7 % foi corado com brometo de etídio.

Com a confirmação da clonagem de *tcmap*, seguimos para a próxima etapa de subclonagem no vetor de expressão pET19b (5717 pb). Para tal fim, o inserto *tcmap* e o vetor de expressão pET19b, após digestão com as enzimas descritas acima (*XhoI* e *BamHI*), foram purificados do gel de agarose utilizando o kit *Gel Band Purification* da GE Healthcare (Fig. 11 A). Posteriormente, esse material foi utilizado para a realização da reação de ligação do inserto no vetor de expressão. Esta reação foi realizada na presença da T4 DNA ligase (Invitrogen) e do seu respectivo tampão em condições adequadas de acordo com orientações do fabricante. A clonagem no pET19b foi confirmada por análise de digestão enzimática utilizando as mesmas enzimas de restrição descritas anteriormente (Fig 11 B).



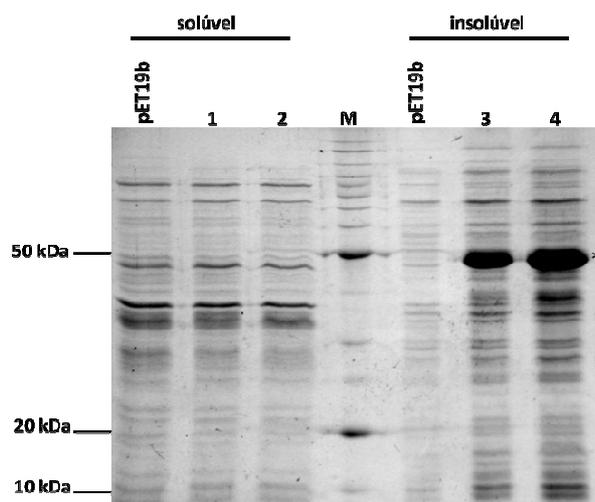
**Figura 11. Confirmação da clonagem do gene *tcmap* no vetor pET19b.** (A) Análise da purificação do inserto *tcmap* (1) e do pET19b (2) após digestão com as enzimas *XhoI* e *BamHI*. (B) Digestão enzimática do plasmídeo recombinante pET19b-*tcmap* com as enzimas *XhoI* e *BamHI*. (1) Plasmídeo pET19b-*tcmap* não digerido; (2) Plasmídeo pET19b-*tcmap* digerido; (M)– Marcador molecular 1 Kb plus DNA ladder. Gel de Agarose 0,7 % corado com brometo de etídio.



De acordo com a figura 11B, observa-se a liberação do fragmento no tamanho de aproximadamente 1179 pb que corresponde ao gene *tmap* e ainda a presença do fragmento correspondente ao vetor de clonagem pET19b, confirmando assim, a subclonagem do gene *tmap* no vetor de expressão. Essa clonagem também foi confirmada por sequenciamento (dados não mostrados). Portanto, após esses experimentos, foi possível dar continuidade ao trabalho no intuito de obter a proteína recombinante e utilizá-la em testes futuros.

#### **4. Expressão heteróloga e purificação da proteína recombinante MAPTc**

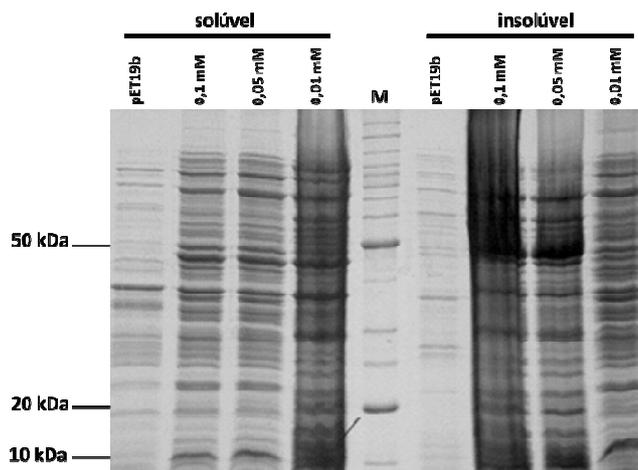
Após confirmação da subclonagem do gene, *E. coli* BL21 (DE3) foi transformada com o vetor de expressão contendo *tmap*. Algumas colônias foram escolhidas para os experimentos de indução realizados com IPTG. Estabeleceu-se o protocolo de indução padrão para a proteína recombinante de acordo com critérios de eficiência e reprodutibilidade. Para a primeira tentativa de indução da expressão de MAPTc, colônias diferentes contendo o pET19b-*tmap* e o pET19b vazio foram selecionadas para os testes de expressão heteróloga. Nessa indução inicial, cujas condições utilizadas foram 1,0 mM de IPTG, 37 °C, por 16 h e sob agitação de 200 rpm, evidenciou-se uma banda com massa molecular aparente próxima ao esperado de 50 kDa em todos os clones contendo o vetor recombinante pET19b-*tmap*, o que corresponde a provável expressão da proteína já que essa banda não foi observada no clone contendo o vetor pET19b sem o inserto (Fig. 12). Os extratos bacterianos induzidos foram lisados com (tampão de ligação) BugBuster 1x e separados em frações solúveis e insolúveis para análise em SDS PAGE 12%.



**Figura 12. Expressão heteróloga de MAPTc a 37 °C.** Dois clones de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com pET19b-*tcmap* e pET19b foram induzidas com 1,0 mM de IPTG a 37°C e sob agitação de 200 rpm por 16 h. Após lise bacteriana por Bug Buster, as frações solúvel e insolúvel foram resolvidas em SDS-PAGE 12% seguindo-se de coloração com *Coomassie blue*. (1 e 3) – colônia 1 positiva; (2 e 4) – colônia 2 positiva; (M)- *BenchMark Protein Ladder*; (\*) – Banda de aproximadamente 47 kDa, correspondendo provavelmente à MAPTc induzida.

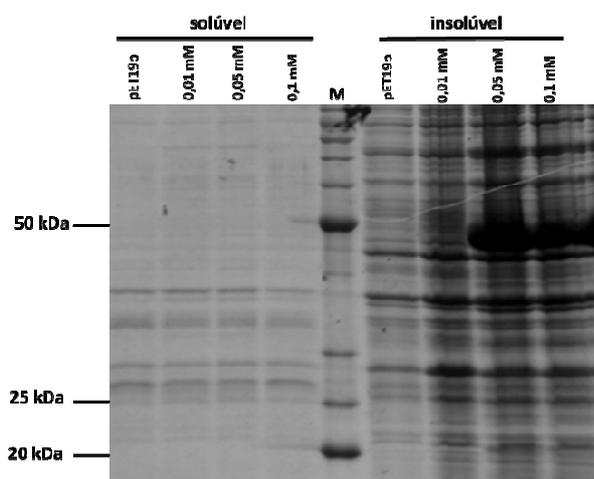
De acordo com as condições descritas nesse experimento, a MAPTc foi expressa, exclusivamente, como corpo de inclusão, na sua forma insolúvel e provavelmente não apresentando atividade (Fig. 12). Para aperfeiçoar a expressão e tentar estabelecer o protocolo de indução para obtenção da proteína solúvel, foram testadas outras condições de IPTG e temperatura. O próximo teste de indução foi feito nas seguintes condições: 30 °C, por 3 h com gradiente de concentração de IPTG: 0,1 mM; 0,05 mM; 0,01 mM e sob agitação de 200 rpm. Os extratos foram lisados com *Bug Buster*, e as frações solúveis e insolúveis foram separadas e resolvidas em SDS-PAGE 12%.

Pelo perfil eletroforético apresentado (Fig. 13), observou-se que apesar das tentativas em obter a proteína MAPTc recombinante solúvel e ativa alterando-se as condições de indução, a mesma, aparentemente, permaneceu apenas na fração insolúvel. Além disso, foi possível observar que com 0,01 mM de IPTG a banda correspondente a MAPTc praticamente não foi visualizada no gel, mesmo na fração insolúvel, o que pode indicar uma indução pouco eficiente nessas condições (Fig. 13).



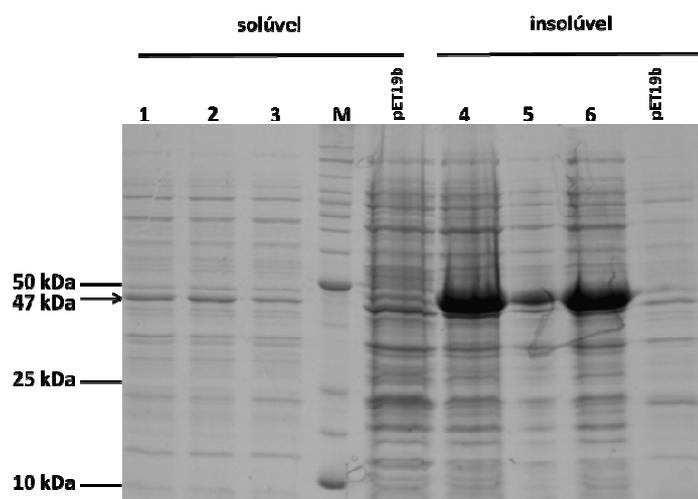
**Figura 13. Expressão heteróloga de MAPTc a 30 °C.** *E. coli* BL21(DE3) foi transformada com os vetores pET19b-*tcm*ap e pET19b e induzida com 0,1, 0,05 e 0,01 mM de IPTG, 30 °C, 200 rpm por 3 h. A lise celular foi realizada por *Bug Buster* e as frações solúvel e insolúvel foram resolvidas em SDS-PAGE 12%. (M) - Marcador BenchMark Protein Ladder.

A próxima tentativa de indução para obtenção da proteína solúvel foi realizada a 25 °C por 3 h com gradiente de concentração de IPTG: 0,1, 0,05, e 0,01 mM e sob agitação de 200 rpm. Notou-se, mais uma vez, que a MAPTc permanecia na fração insolúvel, na presença de 0,1 e 0,05 mM de IPTG e praticamente não foi expressa na presença de 0,01 mM do agente indutor (Fig. 14).



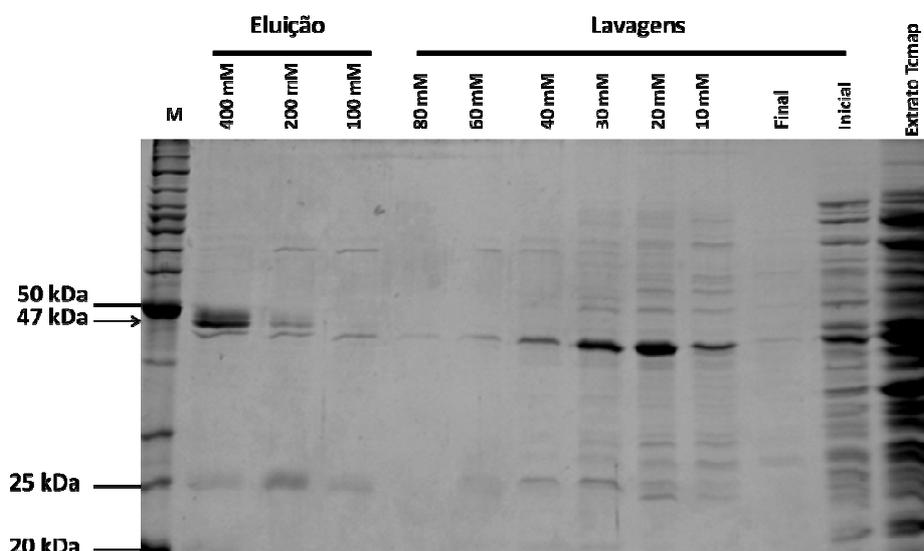
**Figura 14. Expressão heteróloga de MAPTc a 25 °C.** *E. coli* BL21(DE3) foi transformada com os vetores pET19b-*tcm*ap e pET19b e induzida com 0,1, 0,05 e 0,01 mM de IPTG, 25°C, 200 rpm por 3 h. Após lise celular com *Bug Buster*, as frações solúvel e insolúvel foram resolvidas em SDS-PAGE 12%. (M) - Marcador *BenchMark Protein Ladder*.

A proteína MAPTc, em sua forma solúvel, foi observada quando a indução foi realizada a 20 °C por 16 h na presença de 1 mM de IPTG (Fig 15). Nessa condição foi possível verificar, na fração solúvel, uma banda de aproximadamente 47 kDa, como esperado. Dessa forma, a condição de expressão da MAPTc foi padronizada em 20 °C por 16 h com 1 mM de IPTG, sendo esta utilizada em todos os testes posteriores. A proteína expressa nessas condições foi submetida à purificação.



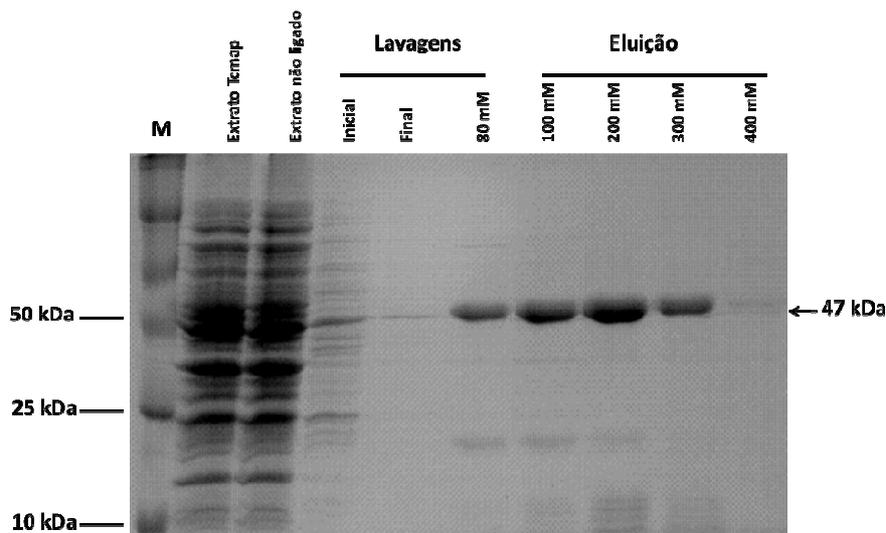
**Figura 15. Expressão heteróloga de MAPTc a 20 °C.** *E. coli* BL21 foi transformada com os vetores pET19b-*tcmap* e pET19b e induzida com 1 mM de IPTG, 200 rpm por 16 h. A lise celular foi realizada por *Bug Buster*. Frações solúveis e insolúveis foram resolvidas em SDS-PAGE 12%. (1 e 4) – Colônia positiva 1; (2 e 5) – Colônia positiva 2; (3 e 6) – Colônia positiva 3; (M) - Marcador *Benchmark Protein Ladder*.

Com o intuito de obter a MAPTc pura, foram realizados testes de purificação por cromatografia de afinidade, de acordo com o protocolo descrito anteriormente na metodologia. As amostras foram resolvidas em SDS-PAGE 12% (Fig 16). Pelo padrão eletroforético de bandas das eluições da purificação, observou-se uma purificação parcial da MAPTc nas condições testadas. Na análise do gel é possível observar contaminações de algumas bandas, inclusive no tamanho próximo ao da MAPTc (Fig. 16, eluição 100 e 400 mM de Imidazol).



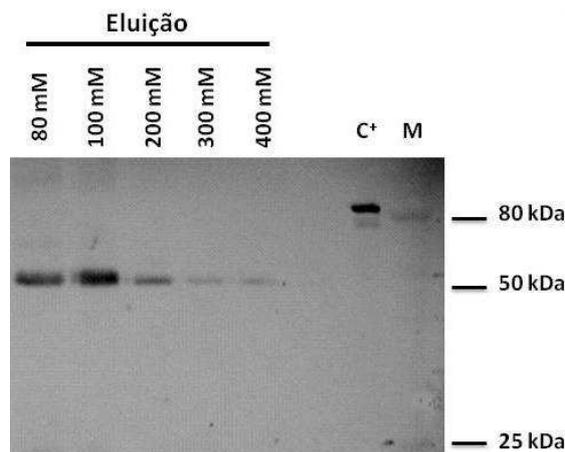
**Figura 16. Purificação da MAPTc.** *E. coli* BL21 foi transformada com o vetor pET19b-*tcm*ap e induzida na condição padronizada ( 1 mM de IPTG, 200 rpm por 16 h). As frações coletadas da coluna de afinidade foram resolvidas em SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Blue*. A seta corresponde à possível banda de MAPTc. (M) - Marcador *BenchMark Protein Ladder*.

Com o intuito de diminuir ou eliminar as contaminações observadas na figura 16, foi realizado um novo teste de purificação utilizando um inibidor de cisteíno-protease, E-64 (2*S*,3*S*)-3-(*N*-{(*S*)-1-[*N*-(4-guanidinobutyl)carbamoil]3-methylbutyl}carbamoil)oxirane-2-carboxylic acid), no momento da lise bacteriana para produção do extrato total. Com base no resultado demonstrado no gel (Fig. 17) foi possível obter a MAPTc purificada, principalmente na eluição correspondente a 300 mM de imidazol. Nesse sentido, estabeleceu-se um protocolo de purificação para MAPTc no qual, a coluna de afinidade é exaustivamente lavada com o tampão contendo 10 - 60 mM de imidazol. À partir de 80 mM de imidazol, a MAPTc começa a ser eluída, mas somente a fração de 300 mM de imidazol foi utilizada para produção de anticorpos em camundongos.



**Figura 17. Purificação de MAPTc na presença do inibidor E64.** *E. coli* BL219(DE3) transformada com o vetor pET19b-*tmap* foi induzida na condição padronizada. As frações coletadas da coluna de afinidade foram resolvidas em SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Blue*. A seta corresponde à banda de TcMap purificada. M - marcador *BenchMark Protein Ladder*.

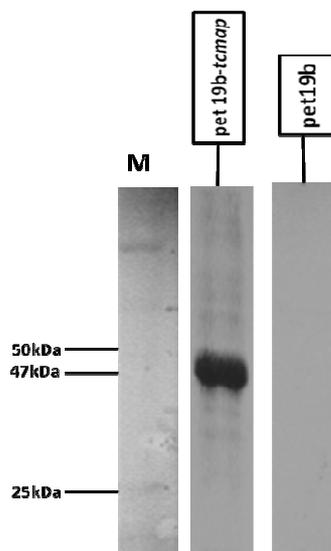
Para confirmar a expressão de MAPTc, realizou-se um *immunoblotting* utilizando anti-His tag como primeiro anticorpo. A proteína recombinante expressa a partir de vetor pET19b possui nove histidinas no seu N-terminal. Essa cauda de histidina é utilizada tanto para auxiliar na etapa de purificação quanto para análises de imunodeteção por meio do anticorpo específico, anti-His tag. As mesmas eluições (80 – 400 mM de imidazol), obtidas na purificação mostrada na Fig 17, foram resolvidas em SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose. O experimento de *Immunoblotting* revelou que a banda próxima a 50 kDa eluída da coluna é realmente a proteína recombinante MAPTc (Fig. 18).



**Figura 18. Immunoblotting com anticorpo anti-His tag.**- frações eluídas da coluna de afinidade durante a purificação da MAPTc. (C<sup>+</sup>)- controle positivo. (M) – marcador *dual color*. O anticorpo anti-His tag foi usado da diluição 1: 1000 e o 2<sup>o</sup> anticorpo, anti IgG de camundongo (GAMPA), foi utilizado na diluição 1:5000. A membrana foi revelada com o substrato NBT/BCIP.

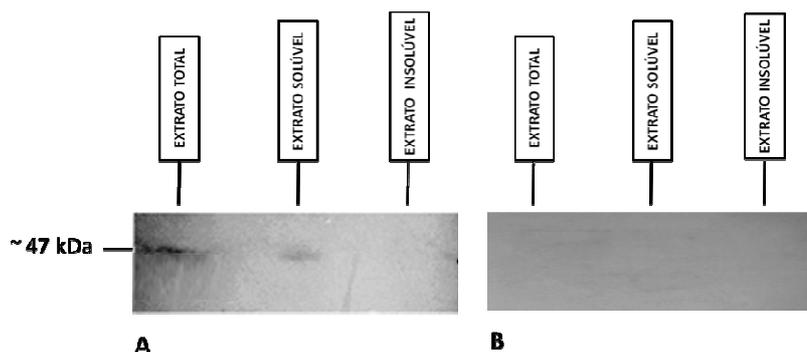
### 5. Produção de anticorpo e expressão da MAPTc

Para os testes de imunização dos camundongos utilizaram-se 5 $\mu$ g da proteína recombinante por camundongo, conforme procedimento descrito na metodologia. Para verificar a eficiência na produção de anticorpos e confirmar a expressão da MAPTc nativa, o soro obtido dos camundongos imunizados foi testado por *immunoblotting*. O anticorpo anti-MAPTc foi testado contra o extrato total de *E. coli* com o pET19b-*mtap* e pET19b induzido (Fig19).



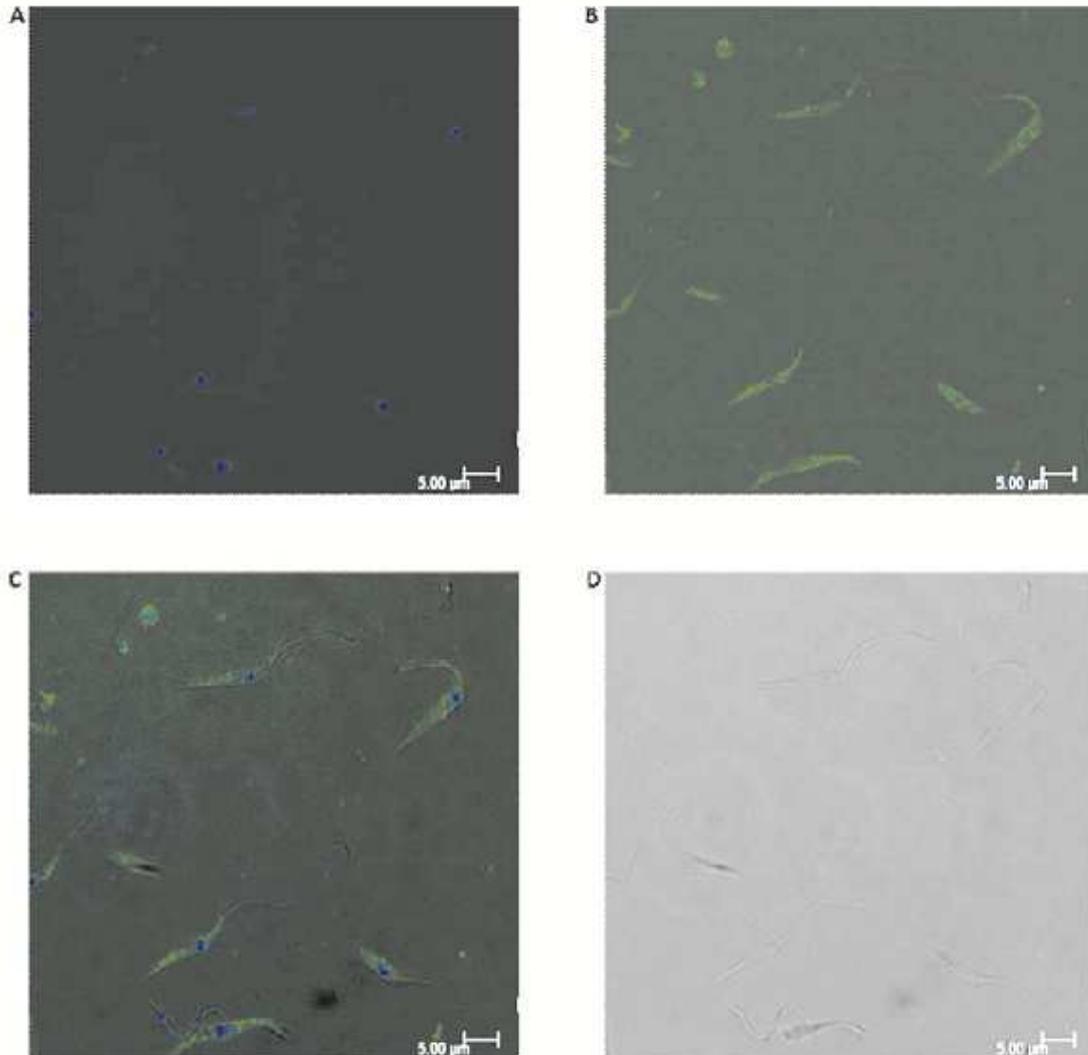
**Figura 19. Caracterização do anticorpo anti-MAPTc.** *Immunoblotting* utilizando o soro imune contra extrato total de *E. coli* contendo *pet19b-tcmap* e pET19b previamente induzidos com IPTG. O anticorpo anti-MAPTc foi usado na diluição 1:200 e o 2<sup>o</sup> anticorpo, anti IgG de camundongo(GAMPA), foi utilizado na diluição 1:5000. A membrana foi revelada com o substrato NBT/BCIP.

A partir desse experimento é possível afirmar que a MAPTc é imunogênica, pois produziu anticorpos específicos, como observado na Fig 19. Este anticorpo também foi testado no extrato protéico total, solúvel e insolúvel de formas epimastigotas de *T. cruzi* (Fig 20 A e B). O anticorpo anti MAPTc reconheceu uma banda na altura esperada tanto no extrato total quanto no extrato solúvel do parasito. Este resultado nos permite dizer que a MAPTc é expressa nesta forma de *T. cruzi* (Fig. 20 A).



**Figura 20** Confirmação da expressão da MAPTc em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Immunoblotting utilizando o soro imune (A) e pré-imune (B) contra extrato total, solúvel e insolúvel de  $1,0 \times 10^7$  parasitos. O anticorpo anti-MAPTc foi usado na diluição 1: 200 e o 2º anticorpo, anti IgG de camundongo (GAMPA), foi utilizado na diluição 1:5000. A membrana foi revelada com o substrato NBT/BCIP.

Uma vez que o anticorpo contra a MAPTc foi produzido com sucesso, um experimento de imunofluorescência (IF) foi feito com o intuito de verificar a provável localização da proteína em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Foi possível verificar a marcação do DNA nuclear e do cinetoplasto pelo DAPI (Fig. 21 A e C) e a proteína MAPTc parece estar presente no citoplasma do parasito (Fig. 21 B e C).



**Figura 21. Anticorpos monoespecíficos localizam a MAPTc em formas epimastigotas 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 1:400 (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. Cinética enzimática

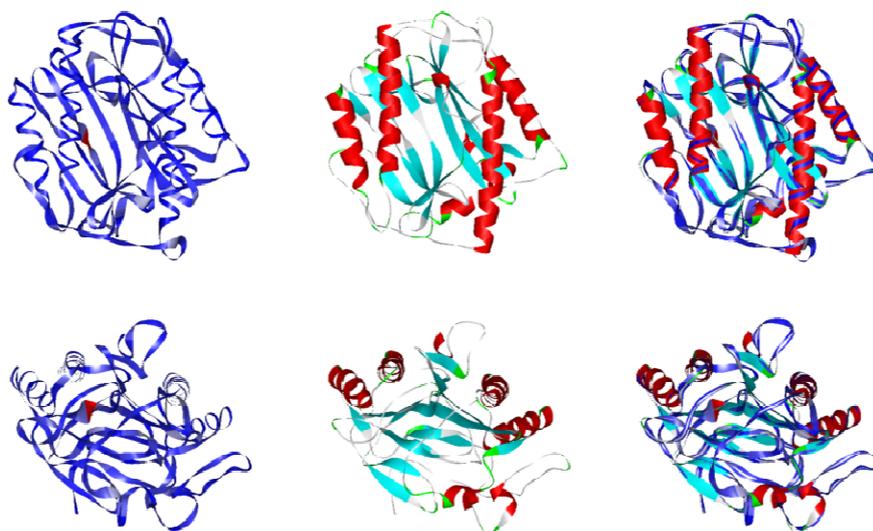
De acordo com os parâmetros utilizados nos testes enzimáticos com o substrato flourogênico MET-AMC, constatou-se que a proteína recombinante não apresentou atividade enzimática. Foram feitas várias tentativas a fim de otimizar as condições dos testes, tais como: utilização de aditivos, como DTT, íons metálicos e vários tampões para enzima descritos em protocolos na literatura. Novas condições de clonagem serão testadas no vetor de expressão pET19b.

## 7. Teste de inibição

Para os testes de inibição com TNP470, foi observado pelas contagens na câmara de Neubauer que nos intervalos de tempo a taxa de sobrevivência dos parasitos permaneceram constante na presença do inibidor e nos experimentos controle.

## 8. Modelagem MAPTc

Foi realizado um modelo da estrutura de *MAPTc* construído com base na estrutura cristalográfica da Metionina Aminopeptidase Humana tipo I, PDB 2B3H, com o auxílio do programa Discovery Studio 2.5 (Accelrys). A modelagem de uma proteína (proteína-problema) baseia-se no conceito da evolução molecular. Isto é parte-se do princípio de que a semelhança entre as estruturas primárias da proteína e de proteínas homólogas de estruturas tridimensionais conhecidas (proteínas-molde) implica em similaridade entre elas. A modelagem demonstrou, após minimização de energia, que a estrutura da *MAPTc* apresenta-se bem enovelada, com poucas alças diferentes daquelas encontradas na estrutura cristalográfica. Essa estrutura é característica da família *pita-bread*, Clan MG24, das metaloproteases, que apresenta domínios assimétricos entre as regiões amino e carboxi-terminal, formados por folhas  $\beta$  (Fig. 22).



**Figura 22. Modelagem molecular por homologia de sequência da metionina aminopeptidase humanos e de *T. cruzi*.** O modelo (coluna da esquerda) e o molde (PDB 2B3H; coluna central) foram sobrepostos (coluna da direita) em duas visões diferentes para melhor observação do posicionamento das estruturas secundárias.

Estudos de modelagem molecular dão suporte para entendimento da estrutura da proteína em questão e análises de dinâmica molecular de relaxamento serão necessárias para averiguarem-se possíveis interações intramoleculares desfavoráveis possam levar a uma perda de estrutura.



## Discussão

Apesar do alcance de grandes avanços tecnológicos e incentivos políticos para erradicação, a doença de chagas ainda destaca-se por ser um grande problema de saúde pública. Os números ainda indicam a importância social desta enfermidade, 100 anos após a descrição do primeiro caso agudo no Brasil (Silva *et alii*, 2010). Segundo dados da OMS, no Brasil há cerca de 6 milhões de habitantes infectados pelo *T. cruzi*, acentuando-se em populações pobres, que residem em condições profiláticas inadequadas associada a intensas migrações urbanas (Villela *et alii*, 2007).

O fato de ainda não existir uma quimioterapia eficaz para o tratamento da doença de Chagas com os antiparasitários tradicionais, nifurtimox e benzonidazol, tem impulsionado grupos de pesquisa a atuarem em busca de um tratamento eficaz da doença (Molina *et alii*, 2009). Nesse sentido, muitos estudos têm sido realizados com proteases que agem em fases vitais do ciclo de vida do parasito. Para vários autores, Knowles *et alii.*, 1993; Gavigan *et alii.*, 2001; Bastos *et alii.*, 2005, as proteases em geral são consideradas alvos importantes para produção de drogas devido a sua importância de suas atividades enzimáticas no ciclo de vida de diversos patógenos como *T. brucei*, *Leishmania* spp. e o *T. cruzi*, o que as tornam potenciais alvos terapêuticos. Estudo também tem sido realizado sob a biologia do sistema imunológico e a atuação do parasito na resposta imune, o que auxiliará na compreensão da imunopatologia da doença de Chagas e outras patologias. O conhecimento dos aspectos imunológicos leva ao desenvolvimento das diferentes formas clínicas e dos mecanismos responsáveis pela fase grave da doença (Neto, 1998).

Nesse contexto, 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 potenciais para ação de drogas. Esse estudo teve como enfoque uma metaloprotease, metionina aminopeptidase (MAPTc), cuja função é de grande relevância para os organismos uma vez que sua função é essencial para a fisiologia dos mesmos; caso ocorra deleção ou inibição desta enzima, o organismo alvo pode morrer.

O alinhamento de sequências protéicas de MAPs de cinetoplastídeos em relação à MAPTc permitiram concluir que há um alto grau de identidade entre essas sequências. Por outro lado o alinhamento realizado com as sequências de MAPs de humanos e *E.coli* revelaram uma similaridade de até 12% e uma identidade inferior a 3,5%, o que demonstra que MAPTc não apresenta uma homologia considerável entre as MAPs analisadas. 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 da árvore filogenética permitem concluir que a separação do clados evidencia que MAPs são mais semelhantes entre as espécies diferentes do que entre si. Estudos filogenéticos demonstrados por (Bradshaw *et alii*, 1998) explicam que as MAPs divergiram evolutivamente o que explicaria, por exemplo a divisão de classes em classes de MAPs em eucariotos. E que essas classes de eucariotos estariam intimamente relacionadas com as de procariotos.

O gene foi amplificado no tamanho esperado, em quantidade suficiente e com relativa pureza. Posteriormente, foi realizada as etapas de clonagem no vetor pCR2.1(Invitrogen) e subclonagem no vetor pET19b (Novagen). Os vetores pET19b da Novagen e o pCR2.1 da Invitrogen e foram selecionados de acordo com trabalhos anteriores que demonstraram sucesso na clonagem de genes (Topcu, 2000; Ferchichi *et alii*, 2008). 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. 10 e Fig. 11B). E a 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 do vetor de clonagem, pET19b, foi realizada de acordo com resultados de outros trabalhos e com a disponibilidade no laboratório (Passaglia *et alii*, 1998; Rea *et alii*, 2006). Com a confirmação no vetor de clonagem pet19b por análise de restrição e o sequenciamento do gene, iniciou-se os testes de expressão de MAPTc. Para isso, foram necessárias várias tentativas de induções, variando a quantidade de inóculo bacteriano, concentração do agente indutor, IPTG, temperatura e tempo de indução. Outra etapa crítica consiste na expressão da proteína recombinante, que pode ser bastante dificultada pelo sistema de expressão utilizado (Rosano *et alii*, 2009) ou ainda pelas condições utilizadas para a indução (Joshi *et alii*, 2005).Dentre vários testes foi possível obter uma MAPTc expressa na fração solúvel a 37 °C por 16 h com 1 mM de ITPG.

Após padronização do protocolo de expressão de MAPTc, observou-se uma dificuldade de purificação da proteína no tamanho esperado de 47 kDa, uma vez que uma



banda contaminante próximo a de MAPTc permanecia nos testes de purificação. Contudo, utilizou-se um inibidor de cisteína protease, E-64, para que a purificação de MAPTc apresentasse apenas a banda no tamanho esperado. Foram testadas também outras condições de lise bacteriana, como lise por sonicação. Dessa forma, foi possível obter a MAPTc pura no tamanho esperado e na fração solúvel. Muito provavelmente, este inibidor foi capaz de restringir degradação da proteína de interesse e possivelmente de outras que eram co-purificadas.

Em seguida realizaram-se ensaios enzimáticos com MAPTc, utilizando o substrato fluorogênico MET-AMC. Primeiramente foram analisados protocolos a fim de obter uma melhor condição de atividade de MAPTc. Para isso, foram testados tampões como: Tris-HCl, NaCl, Hepes e DTT em concentrações de 25 e 50 mM, variou-se também, a temperatura e o pH ótimo da enzima de 6,5, 7,0 e 8,0. Testou-se também, tampões com e/ou sem íons metálicos já que os mesmos influenciam na atividade de muitas enzimas. Para (Lu *et alii* 2009) esses íons são excelentes ativadores de atividade de metaloenzimas. Após várias tentativas, foi possível concluir que MAPTc não apresentava atividade enzimática nas condições conduzidas no experimento. Uma das hipóteses para essa ausência de atividade seria o fato de que a posição da cauda de histidina presente na região N-terminal no pET19b estaria impedindo dessa forma a exposição do sítio catalítico. Outra hipótese seria a o enovelamento incompleto ou errado da enzima pela *E. coli*.

Em paralelo foram realizadas imunizações em camundongos no intuito de conseguir anticorpos com MAPTc. Para isso, a proteína recombinante foi devidamente purificada com confirmação do tamanho esperado pelo perfil eletroforético necessários para imunização. Após as etapas de imunizações, foi retirado o soro dos camundongos e a produção dos anticorpos foi confirmada por *immunoblotting* utilizando extratos total, solúvel e insolúvel da forma epimastigota de *T. cruzi*. Realizou-se também experimentos de imunofluorescência com os soros imune utilizando parasitas na forma epimastigota de *T. cruzi*. As análises por microscopia permitiram concluir que MAPTc está presente em vesículas distribuídas por todo o citoplasma do *T. cruzi*. Isto significaria que o processamento de proteínas em nível de remoção de resíduo de metionina de suas porções N-terminais ocorre em todo o citoplasma do parasito, mas de forma bem organizada já que a enzima está localizada em vesículas.

Por fim, foram executados testes com o inibidor TNP470, utilizando parasitas nas suas formas epimastigotas. TNP 470 é um inibidor sintético derivado de fumagilina, atuando de forma covalente, modifica um dos sítios conservados de histidina presente em metionina aminopeptidase. MAPs de humanos foram identificadas como o primeiro alvo de fumagilina



e ovacilina, por ter apresentado um potente inibidor da angiogênese e demais tipos de câncer, demonstra uma baixa toxicidade e um efetividade inibitória (Addlagata et alii, 2005). Muitos estudos de inibição têm sido realizados em mecanismos de angiogênese em humanos, impedindo a vascularização e a metástases de tumores. Pelo fato de ter sido reconhecido como um potente inibidor, TNP470 tem sido utilizado em estudos de inibição com parasitas como, por exemplo, em *P. falciparum*, *Leishmania donovani* e outros parasitas (Chen et alii, 2009).

Nestes testes de inibição foi avaliada a taxa de sobrevivência desses parasitos na presença de TNP470 em um determinado intervalo de tempo de até 72 h por contagem na câmara de Neubauer. Após contagem dos parasitas observou-se que a 24 e 36 h houve um decréscimo na taxa de sobrevivência dos parasitas. Em contrapartida, nas demais tempos de contagem a taxa de sobrevivência dos parasitos na presença do inibidor e no controle permaneceram constantes. Várias tentativas foram feitas para o sucesso no teste de inibição, as hipóteses prováveis para esses resultados seria a ineficiência inibitória de TNP470 para *T. cruzi* ou as condições padronizadas no experimento. É possível que esse inibidor não possua atividade inibitória na enzima do parasito e/ou atravesse sua complexa membrana. A obtenção da MATPTc ativa poderá dar indicações sobre o entendimento na ineficácia deste inibidor sobre o *T. cruzi*.

Por fim, estudos foi proposto o estudo de modelagem da MAPTc que revelaram uma estrutura protéica característica das melaloproteases de “*Pita bread*”. Os estudos de modelagem molecular é uma ferramenta mais bem sucedida de predição de estruturas tridimensionais (Filho et alii, 2003). Em análises cristalográficas essas estruturas são bastante enoveladas, no qual é apresentada uma pseudo-simetria em domínios conservados. Esses domínios são formados por duas  $\alpha$  hélices e duas fitas  $\beta$  antiparalelas com metais divalentes ( $\text{Co}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$ ) situados no sítio catalítico (Lowther et alii, 2000). A família “*Pita bread*” incluem outras subfamílias de aminopeptidases que são relacionadas à MAPs: prolidase (peptidase D, imidopeptidase ou aminopeptidase P de *E. coli*) (Gigliante et alii, 2004).



## Conclusões

A partir dos experimentos realizados é possível concluir que:

- O alinhamento de sequências de cinetoplastídeo e MAP<sub>Tc</sub> demonstraram uma alta identidade.
- A análise por alinhamento também permitiu inferir que não há homologia s entre as MAPs de humanos e *E. coli*. Com uma similaridade significativa de 12% e uma identidade inferior a 3,5%.
- Por meio da análise filogenética com as 22 sequências de MAPs sugerem que a MAP II surgiu a partir de um evento ancestral. E que a conservação das duas famílias de MAPs em eucariotos, sugere a diversificação das funções das mesmas.
- O gene codificante da proteína analisada foi clonado com sucesso, como previsto pelas análises de informática realizadas anteriormente;
- De acordo com os parâmetros analisados a proteína recombinante MAP<sub>Tc</sub> é expressa em sua forma solúvel e não ativa;
- Os anticorpos anti-MAP<sub>Tc</sub> produzidos apresentaram especificidade;
- A proteína MAP<sub>Tc</sub> é expressa em *T. cruzi* em suas formas epimastigotas;
- A análise da modelagem molecular indica que MAP<sub>Tc</sub> apresentou-se uma estrutura protéica característico das demais MAPs de diversos organismos.



## Perspectivas

Com o intuito de prosseguirmos com a pesquisa proposta nesse estudo, serão realizados novos testes de clonagem em vetores de expressão que possuem cauda de histidina em uma posição diferente do vetor utilizado na pesquisa realizada, o que possivelmente poderia estar influenciando na falta de atividade da proteína recombinante. Outra alternativa seria uma mudança no sistema de expressão, tendo em vista que muitos trabalhos descrevem a impossibilidade de alcançar sucesso na atividade da proteína recombinante com o sistema de expressão testado nesse trabalho e que utilizaram dessa estratégia. Em seguida, iniciaremos novas tentativas de ensaios enzimáticos para obtenção da proteína ativa. Serão realizados também novos experimentos de imunofluorescência com diferentes formas do *T. cruzi* para que se possa ter um resultado mais amplo da expressão de MAPTc. O inibidor TNP470 também será analisado nesses testes a fim de averiguar a ocorrência de possíveis mudanças fenotípicas em formas do parasito.

Por fim, após a obtenção da proteína recombinante ativa, iniciaremos estudos em relação à estrutura de MAPTc, como a dinâmica molecular, o que permitiria uma melhor caracterização funcional e molecular da proteína uma vez que essas análises são de grande relevância para o desenho racional de novos inibidores.



## Referências bibliográficas

1. Addlagatta, A., Hu, X., Liu, O. J., Matthews, B. W. (2005). Structural Basis for the Functional Differences between Type I e Type II Human Methionine aminopeptidase, Biochemistry, 44, 14741-14749.
2. Alcamí, J. (2004). Advances in the immunopathology of HIV infection. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica, v.22, n.8, Oct, p.486-496. 2004
3. Andrews, N.W. *et alii.* (1990). A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. Cell, v.61, p.1277-1287.
4. Alvarez, V. E. *et alii.* (2008). Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Journal of Biological Chemistry, v.283, n.6, p.3454-3464.
5. Arrick, B. A. *et alii.* (1998). Inhibition of Glutathione Synthesis as a Chemotherapeutic Strategy for Trypanosomiasis. Journal of Experimental Medicine, v.153, n.3, p.720-725.
6. Barbosa, R. Como deter o *T. cruzi*. (2008) Revista Maguinhos.
7. 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.
8. Barret, A.J. e Mc Donald, J.k (1986). Nomenclature: protease, proteinase, and peptidase, Biochem Journal, 237-935.
9. Barret, A. J. & Rawlings, N.D. (1991). Proteinases. Biochemical Journal, v.19, p. 707-715.
10. Bradshaw .R.A, Brickey.W.W, Walker. K.M. (1998) N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N<sup>α</sup>-acetyl transferase families. Trends Biochem, 23, 263-267.



11. Brener., Z., Andrade, Z.A., Barral, M.N. (2000). *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. Rio de Janeiro, Editora Guanabara.
11. Bertin, P.B. Lozzi, P. S. Howell, K. J., Cadavid-Restrepo, G. Neves, D. Texeira, A. R. L. de Sousa, M. V. Norris, S. J. Santana, J. M. (2005). The Thermophilic, homohexameric Aminopeptidase of *Borrelia burgorferi* is a Member of the M29 family of Metallpeptidases. *Infection and Immunity*. 73(4):2253-2261.
12. Bestetti, R. B. *et alii*.(2009) 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.
13. Bond, J. S. e P. E. Butler. (1987) Endopeptidase-24.5 Is Not a Metalloendopeptidase. *Biochemical Journal*, v.246, n.2, p.559-559.
14. Burleigh, B.A.,Caler, E.V.,Webster, P,and Andrews,N.W. (1997) A cytosilic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca (2<sup>+</sup>) AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma*, *Infect Immun*,68,660266-10.
- 15.Burleigh, B. A. & Woolsey, A. M. (2002). Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cellular Microbiology*, v.4, n.11, p.701-711.
16. Buscaglia, C. A. e Di Noia, J. M. (2003). *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and Infection*, v.5, n.5, Apr, p.419-427.
17. Buscaglia, C. A. *et alii*.(2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature Reviews Microbiology*, v.4, n.3, p.229-236.
18. Caler, E. V. *et alii*. (1998). Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Embo Journal*, v.17, n.17, p.4975-4986.
19. Chang, K.P. and McGwire, B.S. (2002). Molecular determinants and regulation of *leishmania* virulence,*Kinetoplastid Biol Dis*,1,1.
20. Chen.X.*et alli*, (2009).Fumagilin e Fumarronol interact with *P.falciparum* Methionine aminopeptidase 2 and Inhibit Malaria Parasite Growth In vitro and In vivo. *Chemistry and Biology*,16,193-202.



21. Cutrim *et alii.*, (2010). Doença de Chagas no Estado do Maranhão, Brasil: registro de casos agudos no período de 1994 a 2008.
22. Dias, J. C. (2007). "Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives." Mem Inst Oswaldo Cruz 102 Suppl 1: 11-8.
23. Dias, J. C. (2009). "Elimination of Chagas disease transmission: perspectives." Mem Inst Oswaldo Cruz 104 Suppl 1: 41-5.
24. Engel, J.C., Doyle, P.S., Palmer, J., Hsieh, I., Bainton, D.F. and McKerrow, J.H (1998b) Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex and function in *Trypanosoma cruzi*, J. Sci., 111 (Pt5), 597-606.
25. Engel, J.C., Doyle, P.S., Hsieh, I and McKerrow, J.H (1998a) cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection, Exp Med 34.7, 188, 725.,
26. Epting, L.C., Coates, M.B., Engman, M. (2010). Molecular mechanisms of host cell invasion *T. cruzi*. Parasitology. 126, 283-291.
27. Ferchichi, M. *et alii.* (2008) 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.
28. Fujinaga, M *et alii.*, (2004). 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.
29. Fumaz, C. R. *et alii.* (2009) 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.
30. Filho, S.A.O., Alencastro, B.R. (2003). Modelagem molecular por homologia. Química nova, vol 26, nº2, 253-259.
31. Grellier, P., Vendeville, Joyeau, R., Bastos, I.M., Dobeçq, H., Frappier, F., Teixeira, A.R., Schrevel, J., Davioud-charchet, E., Sergheraert, C. and Santana, J.M (2001) *Trypanosoma cruzi* oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigote, J. Biochem, 276, 47078-47086.



32. Giglione, C., A. Boularot, T. Meinel. (2004). Protein N-terminal methionine excision. CMLS, 1455-1 excision. CMLS, 1455-1
33. Goldberg, A.I e Rock, K.L (1992), Proteolysis, proteasomes and antigen presentation, Nature, 357, 375-379.
34. Gonzalez, T. and Baudouy-Robert, J. (1996 J). Bacterial aminopeptidase: Properties and function. Microbiology Reviews. **18**:319-344.
35. Hall, B.F. *et alii.* desialylation of liposomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. J. Exp. Med., v.176, p.313-325.
36. Inouye, K., Kusano, M., Hashida, Y., Minoda, M. and Yasukawa, K. (2007) Engineering, purification, and production of recombinant thermolysin, Biotechnol Annu Rev, 1343-64.
37. Klemba, M. e Golberg, D.E. (2002) Biological roles of proteases in parasitic protozoa. Annu Rev Biochem, 71, 275-305.
38. Kropf, S.P., Azevedo, N., Ferreira, O.L. (2000). Doença de Chagas: a construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil. Ciência e Saúde Coletiva, 5(2):347-365.
39. Lowe, J. *et alii.* (1995). Crystal-Structure of the 20s Proteasome from the Archaeon *T. Acidophilum* at 3.4-Angstrom Resolution. Science, v.268, n.5210, p.533-539..
40. Lowndes, C.M., Bonaldo, M.C., Thomaz, N. and Goldenberg, S. (1996) Heterogeneity of metalloprotease expression in *Trypanosoma cruzi*, Parasitology, 112 (Pt4), 393-399.
41. Lu, P.J., Chai, C., Qi, Z. Y. (2010). Calalysis and Inhibition of Mycobacterium tuberculosis Methionine aminopeptidase. J. Medicinal Chemistry, 53, 1329-1337.
42. McKerrow, J. H., Sun, E., Rosenthal, P. J. e Bouvier, J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa, Annu Rev Microbiol, 47, 821-853.
42. Medina-Costa, (1993). Rapid isolation from trypanosomatid protozoa a “mini-prep” procedure. Biochemic. Parasitol 59:27-530.



43. Meirelles, M. N; Juliano, L. Carmona, E, Silva, S.Costa, E.M.Murta, A.C,Scharfstein,J. (1992). Inhibitors of the major cysteine protease (GP 57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. Molecular and Biochemical Parasitology, V.52 n.L,p.175-184.
44. Mitra S.,Bennet.B.,Holz.C.R.(2009). Mutation the H63 and its catalytic affect on the methionine aminopeptidase from *Escherichia coli*.Biochem Biophys,1794 (1):137-143
45. Motta, F. N. Prolil Oligopeptidases de tripanossomos: aspectos estruturais e funcionais (2010). Tese de doutorado.
47. Molina. P.J.A.(2009).Use of Benzonidazol to treat chronic Chagas's disease: a systemic review with a meta-analysis.
48. Muendel et.alii(2009).Antiparasitic activities of novel, orally available fumagilin analogs.Bioorganic e Medicinal Chemistry letters,5128-5131.
50. Neves, D. P. (1979). Parasitologia Humana. 4º ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.
50. Neto. E. C. (1994). Novos conhecimentos da patogênese da Doença de chagas. Revista de Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento,12:36.
49. Nocek, B., Mulligan, R., Bargassa, M., Collart, F., Joachimiak, A.(2008). Crystal structure of aminopeptidase N from human pathogen *Neisseria meningidis*. Proteins, 1;70(1):273-279.
50. Nonato, C. N. and Clardy, J. W. J. (2006). Human methionine aminopeptidase Type 2 in complex with L-and D-methionine. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 16:2580-2853.
51. Olaleye.O. et.alii., (2010). Methionine aminopeptidase from Mycobacterium tuberculosis as Novel Antimycobacterial Targets.Chemistry & Biology, 17,86-87.
52. 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.
54. Penna,A.L. et alii.(2005). Manual de Vigilância Epidemiológica/Secretaria de Saúde.



55. Piras, M.M., Henriquez, D., Piras, R.(1985). The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction *Trypanosoma cruzi*-fibroblasts. Mol. Biochem. Parasitol., v.14, p.151-163.
55. Pittela, J. E. H.(2009). 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.
56. Pontes,V.M.O.(2010).Reações adversas em pacientes com doenças de chagas tratados com Benzimidazol, no Estado do Ceará.Revista Brasileira de Medicina Tropical 43(2):182-187.
57. Topcu, Z.(2000). 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.
58. Artal,C.J.F.,G.J.(2010).Chagas and stroke.Lancet 2010;9:953-42.
58. Rawlings, N.D.,Barret, A.J (1995). Families of aspartic peptidases,those of unknown catalytic mechanism, methods Enzymol,248,105-120.
59. Rawlings, N. D. *et alii.*. MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Research, v.34, p.D270-D272. 2006.
60. Rea, D. *et alii.*(2006). 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.
61. Rosano, G. e Ceccarelli, E. (2009). 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.
62. Rosenthal, P. J. (1999). Proteases of protozoa parasites, Adv Parasitol, 43, 105-159.
63. Santana, J. M., Grellier, P., Rodier, M. H., Schrevel, J. e Teixeira, A. (1992). Purification and characterization of a new 120 kDa alkaline proteinase of *Trypanosoma cruzi*, Biochem Biophys Res Commun, 187, 1466-1473.
64. Santana, J.M. *et alii.*(1997). A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. Biochem. J., v.324, p.129-137.



65. Santana, J.M. *et alii* (1998). A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. Biochem. J., v.324, p.129-137. 1997.
66. Santanna, C *et alii*.(2008). All *Trypanosoma cruzi* developmental forms present lysosome-related organelles. Histochemistry and Cell Biology, v.130, n.6, p.1187-1198.
67. Urbina, J.A. e Docampo, R.(2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances, Trends Parasitol.,19,495-501. 20.Yoshida, N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*.Parasitology. (126) 283-291.by *Trypanosoma cruzi*. An Acad Bras Cienc,78,87-111.
68. Yazdani, S. S *et alii*.(2006).Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. Current Molecular Medicine, v.6, n.2, p.187-203.
69. Villela, M. M. Borba, M. J. Melo, V. P. and Dias, P. C. J. (2007). Vigilância epidemiológica da doença de Chagas em programa descentralizado: avaliação de conhecimentos e práticas de agentes municipais em região endêmica de Minas Gerais, Brasil. Caderno de Saúde Pública-Rio de Janeiro.23(10):2428-2438.
71. Voelker, R. (2009). "A century after Chagas disease discovery, hurdles to tackling the infection remain." JAMA 302(10): 1045-7.
72. Wang.J.*et alii*.(2003).Tumor Suppression by a rationally designed reversible inhibitor of Methionine aminopeptidase 2, Cancer Research 63,7861-7869.
73. Wang *et alii*.(2008).Correlation of tumor growth suppression and methionine aminopeptidase-2 activity blockade using an orally active inhibitor.PNAS,v.105,1838-1843.
74. Werneck,L.G.(2011). Hasselman.,H.Maria.Gouvêa.G.T.Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil.Ciência e Saúde Coletiva,16(1):39-62.
75. Who (2002). Control of Chagas disease, Techn. Rep. Ser. No.905, Geneva.
76. Yoshida, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*.Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.78, n.1, Mar, p.87-111. 2006.
77. Yoshida, N. (2008). *Trypanosoma cruzi* infection by oral route:how the interplay between parasite and host components modulates infectivity, Parasitol, Int,57,105-109.
78. Zhang. P. *et alii* (2002).Angiogenesis Inhibitors Specific for methionine aminopeptidase 2 as Drug for Malaria and Leishmaniasis, J.Biochemical Science,9:34-40.

