



UnB

Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro

**Caracterização Bioquímica e Análise Estrutural
in silico de Thimet Oligopeptidase de *Trypanosoma
cruzi***

Isabela da Cunha Costa Cardoso

Brasília, 21 de outubro de 2022

Isabela da Cunha Costa Cardoso

Caracterização Bioquímica e Análise Estrutural *in silico* de Thimet Oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular (PPG-BIOMOL) do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular

Orientadora: Izabela Marques Dourado Bastos

Brasília, DF

Outubro, 2021

“Do everything for love.
That way there are no little things.
Everything is big”
(The way, 813)

AGRADECIMENTOS

À Deus, que é a fonte de todo conhecimento e o criador de tudo o que é belo e bom. Ao longo da minha caminhada científica, aprendi que em meio às coisas mais materiais da terra, às atividades mais racionais e científicas, também aí posso encontrar a Deus. Quanto mais conheço e estudo o mundo que nos cerca, mais me sinto extasiada por Sua bondade e melhor experimento a alegria eterna de contemplá-Lo e conhecê-Lo. A Ele ofereço toda a minha vida e cada momento dela.

À prof. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos, que me cativou desde o primeiro dia em que a conheci com a sua acolhida calorosa, seu acompanhamento certo de perto e de longe, sendo uma verdadeira mentora em quem tenho muito o que me inspirar. Obrigada pela confiança depositada em mim para tocar esse projeto que me é de tanta estima e pela oportunidade incrível de conhecer um pouco da cooperação internacional do LIPH com o MNHN, que você ajudou a construir. Sinto-me muito honrada em fazer parte do seu grupo de pesquisa.

À minha mãe Eliana, que me deu a vida, que move montanhas para me proporcionar o melhor que ela pode dar, que não se cansa em ser um poço de eterno amor, carinho e dedicação. Não há maior exemplo do que o seu, nem há no mundo alguém por quem eu possa ser mais apaixonada e de quem eu seja a maior defensora.

Ao meu pai Mário, que sempre confiou e acreditou em mim, que nunca deixou de se fazer presente e que sempre me deu a maior força para perseguir os meus sonhos. Você sempre foi um grande entusiasta da minha carreira acadêmica e eu só pude ir até o fim porque tive o seu apoio e amor incondicional.

À minha irmã Bruna, que ao longo desses anos, desejou “que os meus dias fossem grandes dias para a ciência”, me incentivando a acreditar em mim mesma, a seguir em frente e a perseguir os meus sonhos. Nenhum sonho eu sonharia se não tivesse você ao meu lado, nos bons e maus momentos, para me amar com todo o coração e me ensinar que mais do que um título ou uma profissão, devo buscar ser a melhor versão de mim mesma. Espero um dia estar à altura de ser chamada de sua irmã. Te amo com todo o meu ser!

À minha avó Clotilde, que é exemplo de fortaleza que jamais conheci igual. Se eu for um pouquinho parecida com você em algum momento da vida, eu serei muito mais do que um dia pensei ser. Obrigada pela mulher incrível que és, por ser o orgulho meu e de toda a família, o nosso maior patrimônio e a pessoa para quem olhamos para nos tornarmos pessoas íntegras e honradas.

Aos meus tios Alcidina, Adriana e Guilherme, que me amam, me acolhem e fazem da minha família o lugar em que eu sei que estarei segura em todo e qualquer momento. Ao longo de toda a minha vida vocês me ajudaram a moldar o meu caráter, forjando a minha personalidade e me ensinando a pôr valor nas coisas certas. Meu eterno agradecimento, amor e admiração.

Ao meu eterno amigo Agnelo, que muito precocemente partiu nos deixando um vazio enorme e uma saudade imensa. Sua alegria contagiante e sua garra perante os desafios da vida (e que desafios!) sempre foram um grande exemplo para mim e, tenho certeza, para muitos à sua volta. Você foi gigante, meu amigo! Que você descanse em paz nos braços do Bom Deus.

Aos meus colegas e amigos do lab, Beatriz Argolo e Lorena; foi maravilhoso partilhar o pouco tempo que tivemos no laboratório durante a pandemia. A vocês desejo todo o sucesso do mundo e dedico todo o meu carinho e admiração pelas pessoas incríveis que são. À Camila Lasse, que com muita paciência e disponibilidade transmitiu a maior parte da experiência que adquiri durante o mestrado. Obrigada por todo o tempo e dedicado a mim e ao meu projeto. À Marta, Isabela Roma, Arthur, Kaio, Yanna, Clênia, Milene, Paula, Alexandra, Gabriel, Karen, Suelen, Amanda, Tarcila, Natalia, Alessandro, Sofia, Sara e todos os colegas de laboratório. Foi incrível partilhar cada momento com vocês e tê-los como parceiros de laboratório. Contem sempre comigo e espero poder encontrá-los novamente muitas outras vezes.

Aos meus amigos da vida: Laura e Renan Fiel e família, Ariele e Alana, Amanda Ávila e família, Gabizinha e Erno, Rafael Corrêa, Juliana e Igor Gallisa, Aníssima, Lívia, Gui, Amanda e Malu. Ter amigos como vocês faz a vida valer à pena. Amo vocês hoje e sempre!

Aos meus amigos da Bthek: Rayane, Luana, Amanda, Ana Carolina, Victor, Letícia Alves, Davi, Lucas, José Eduardo, Juliano, Guilherme, Letícia Gomes, André, Marcos, Gilvan, Jonas, Hemerson, Francielly, Rafael Munareto, Natasha Kuniechick e Dourival. Obrigada pela compreensão, pela amizade, por todas as vezes que se preocuparam comigo, pela presença e participação real em minha vida, pelo exemplo de profissionais que são, pelos desafios que superamos juntos, pelo trabalho em equipe e pela incrível capacidade de se doarem e de entenderem uns aos outros. A minha vida sem vocês para me espelhar e apoiar seria muito mais sem graça e vazia. Amo muito cada um e tenho muito orgulho de fazer parte desse time de cientistas e profissionais maravilhosos!

À professora Melina Mottin, pela prontidão em transmitir o conhecimento de maneira tão clara e paciente, estando sempre disposta e acessível para ensinar, mentorar e contribuir para a realização desse projeto.

À professora Carla, que me fez sentir acolhida na minha estadia em Paris e que é um exemplo de profissional para mim, sempre disposta a ajudar e tratando a todos com muito carinho e respeito. Foi muito bom aprender com você e conviver com a pessoa incrível que você é. À professora Flávia, que com paciência e conhecimento contribui grandemente para a minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Ao professor Phillippe Grellier, por todo o apoio fornecido durante a minha estadia, pelo conhecimento e experiências agregados, pelo acolhimento com que me recebeu em Paris. Guardo com muito carinho os meses em que pude aprender com uma das referências na minha área de estudo, que marcaram a minha vida e pelos quais serei eternamente grata!

Ao Prof. Jaime, que com sua experiência e liderança exemplar, permitiu que eu fizesse parte de um laboratório com uma grande história dentro da UnB. Tenho muito orgulho de ter contribuído, de alguma forma, com o desenvolvimento da pesquisa acadêmica na UnB. A experiência adquirida ao longo desses anos é de valor inestimável.

Às agências de fomento CNPq, CAPES, FINATEC pelos financiamentos da pesquisa e das bolsas, que permitiram que esse projeto fosse realizado.

Sumário

AGRADECIMENTOS	- 3 -
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	- 9 -
LISTA DE FIGURAS	- 10 -
RESUMO	- 11 -
ABSTRACT.....	- 12 -
INTRODUÇÃO	- 13 -
A doença de Chagas	- 13 -
Ciclo de vida do T. cruzi.....	- 13 -
Manifestações clínicas da doença de Chagas	- 15 -
Epidemiologia da doença de Chagas	- 16 -
Tratamento da doença de Chagas	- 18 -
Proteases.....	- 20 -
A Thimet Oligopeptidase (TOP)	- 21 -
Aspectos bioquímicos, físico-químicos e estruturais.....	- 22 -
Funções da Thimet Oligopeptidase	- 24 -
A thimet oligopeptidase no T. cruzi	- 26 -
Modelagem estrutural como ferramenta para a busca de inibidores	- 27 -
JUSTIFICATIVA	- 30 -
OBJETIVO.....	- 31 -
Objetivo geral:.....	- 31 -
Objetivos específicos:	- 31 -
Materiais e Métodos.....	- 32 -
Cultura de Trypanosoma cruzi	- 32 -
Análise in silico da TOPTc.....	- 32 -
Transformação bacteriana	- 32 -

Preparação de DNA plasmidial	- 33 -
Padronização de protocolo de expressão da proteína recombinante (rTOPTc)	- 33 -
Purificação por cromatografia de afinidade de rTOPTc	- 34 -
Quantificação das frações de TOPTc purificadas	- 35 -
Análises por Western Blot	- 35 -
Testes de atividade enzimática	- 36 -
Determinação da quantidade ótima de enzima	- 36 -
Estabelecimento do pH ótimo para atividade enzimática.....	- 36 -
Estabelecimento do tampão ótimo para atividade enzimática.....	- 36 -
Efeito dos íons NaCl e Zn ²⁺ na atividade enzimática.....	- 37 -
Dependência da temperatura.....	- 37 -
Influência de agentes redutores	- 37 -
Determinação do Km	- 37 -
Determinação do IC ₅₀ dos inibidores	- 37 -
Estabilidade de armazenamento	- 38 -
Influência de Albumina na atividade da enzima	- 38 -
Modelagem molecular	- 38 -
Produção de anticorpos policlonais anti-rTOPTc.....	- 39 -
Imunofluorescência	- 40 -
Resultados.....	- 41 -
Análise in silico da TOPTc.....	- 41 -
Predição de domínio transmembrana	- 41 -
Predição de cauda GPI	- 42 -
Predição de modificações lipídicas	- 42 -
Predição de peptídeo sinal	- 43 -

Predição de domínios	- 44 -
Verificação da clonagem do vetor e preparação plasmidial:	- 44 -
Expressão de proteína recombinante rTOPTc	- 45 -
Purificação de rTOPTc	- 46 -
Reconhecimento de rTOPTc por Western Blot.....	- 48 -
Determinação da quantidade ótima de enzima para ensaios enzimáticos.....	- 49 -
Caracterização do pH ótimo	- 49 -
Caracterização do tampão ótimo	- 50 -
Influência do NaCl na atividade enzimática de TOPTc.	- 51 -
Influência do íon Zn^{2+} na atividade de rTOPTc.....	- 52 -
Influência da temperatura na atividade enzimática de rTOPTc.	- 53 -
Estabilidade de armazenamento	- 54 -
Influência do BSA na atividade enzimática de rTOPTc	- 54 -
Efeito de inibidores de proteases	- 55 -
Testes de inibição.....	- 56 -
Predição de estrutura secundária.....	- 57 -
Composição aminoacídica	- 59 -
Modelagem tridimensional.....	- 59 -
Árvore filogenética.....	- 63 -
Imunocitocalização	- 64 -
DISCUSSÃO.....	- 65 -
CONCLUSÃO.....	- 78 -
PERSPECTIVAS.....	- 79 -
BIBLIOGRAFIA.....	- 80 -

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-His	Anticorpo anti-cauda de Histidina
Binding buffer	Tampão de ligação; utilizado na cromatografia de afinidade para eluir o ligante ou a proteína de interesse.
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Albumina Sérica Bovina)
Cpp-Ala-Ala-Phe-pAb	N-1-(R,S)carboxy-3-phenylpropyl-Ala-Ala-Phe-p- aminobenzoate
DAPI	4'6'-diamino-2-fenil-indol
Elution Buffer	Tampão de eluição
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IPTG	Isopropil- β -D-galactopiranosídeo
kb	kilobase
kDa	Kilodalton
K_i	Constante de inibição
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LIT	Liver Infusion Tryptose
Mca	7-methoxycoumarin-4-acetyl
pb	Pares de base
rTOPTc	Thimet Oligopeptidase recombinante de <i>T. cruzi</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
S.O.C	Caldo super ótimo com repressão de catabólitos
TOP	Thimet Oligopeptidase
Wash buffer	Tampão de lavagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> (CDC, 2022).....	14 -
Figura 2: Morfologia das diferentes formas de vida de <i>T. cruzi</i>	15 -
Figura 3: Manifestações clínicas da doença de Chagas.....	18 -
Figura 5: Atividade de TOP de murinos após cromatografia sob condições redutoras e não redutoras.....	23 -
Figura 6: Estrutura tridimensional da Thimet Oligopeptidase humana cristalizada, disponível no PDB (1S4B).....	24 -
Figura 7: Mapa do plasmídeo pET100/D-TOPO utilizado para clonagem e expressão de TOPTc.....	33 -
Figura 8: Predição de domínio transmembrana ausente na TOPTc, realizada através do programa DeepTMHMM.....	41 -
Figura 9: Predição de cauda GPI na TOPTc utilizando o programa PredGPI.....	42 -
Figura 10: Predição de modificações lipídicas na TOPTc utilizando o programa GPS-lipid.....	42 -
Figura 11: Predição de presença de sítio de peptídeo sinal da TOPTc realizada pelo servidor SignalP 5.0.....	43 -
Figura 12: Predição de domínios presentes na TOPTc realizada no programa ProSite.....	44 -
Figura 13: Preparação do DNA plasmidial para expressão heteróloga de rTOPTc.....	45 -
Figura 14: Ensaio de expressão em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) de rTOPTc.....	46 -
Figura 15: Purificação da rTOPTc expressa em BL21 (DE3) utilizando um gradiente de imidazol.....	47 -
Figura 16: Purificação da rTOPTc expressa em BL21-AI TM com lavagem da resina apenas com 5mM de imidazol antes da eluição.....	48 -
Figura 17: Western-blot da fração de proteína purificada.....	48 -
Figura 18: Concentração ótima de enzima a ser utilizada nos testes enzimáticos.....	49 -
Figura 19: pH ótimo para TOPTc testado com tampão AMT.....	50 -
Figura 20: Tampão ótimo para atividade de TOPTc.....	51 -
Figura 21: Influência do NaCl na atividade de rTOPTc testada no tampão fosfato nos três diferentes pHs.....	52 -
Figura 22: Influência do íon Zn ²⁺ na atividade da rTOPTc.....	53 -
Figura 23: Influência da temperatura na atividade da rTOPTc.....	53 -
Figura 24: Estabilidade de armazenamento da rTOPTc ao longo de 21 dias.....	54 -
Figura 25: Influência do BSA na atividade da rTOPTc.....	55 -
Figura 27: Efeito do DTT na atividade de rTOPTc. Controle: atividade de rTOPTc sem adição de DTT.....	56 -
Figura 28: IC50 do inibidor de metaloproteases fenantrolina (A) e do inibidor de TOP Cpp-Ala-Ala-Phe-Abz (B).....	56 -
Figura 29: Atividade de rTOPTc segundo plot de Hanes-Woolf.....	57 -
Figura 30: Predição da estrutura secundária da TOPTc a partir da sequência primária no servidor NetSurfP2.0.....	58 -
Figura 31: Composição aminoacídica da TOPTc.....	59 -
Figura 32: Modelos tridimensionais da estrutura de TOPTc realizada nos diferentes servidores.....	61 -
Figura 33: Alinhamento das estruturas de TOPTc preditas pelos diferentes servidores.....	62 -
Figura 34: Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento realizado com a sequência primária de Thimet Oligopeptidase ou membros próximos da família de diversas espécies.....	63 -
Figura 35: Imunocitocalização da TOPTc em parasitos epimastigotas.....	64 -

RESUMO

A Doença de Chagas é uma doença negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que é transmitido principalmente através da picada do inseto barbeiro e da ingestão de alimentos contaminados, atingindo de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo. A doença é caracterizada por causar sintomas agudos leves, mas em cerca de 30% dos casos evolui para a fase crônica com acometimento de órgãos como o coração e o intestino. Até o momento, não existe vacina e o tratamento baseia-se em dois medicamentos de pouca eficácia sobretudo na fase crônica da doença. O desenvolvimento de alternativas quimioterápicas menos tóxicas requer a busca por moléculas-alvo vitais para o protozoário que possam ser inibidas de maneira específica, como as enzimas. A thimet oligopeptidase (TOP) é uma metaloprotease dependente de zinco pertencente à família M3 que tem como principal substrato a bradicinina, peptídeo vasoativo que aumenta a permeabilidade vascular. Em humanos, a TOP é uma das principais processadoras intracelulares de oligopeptídeos, atuando na seleção de antígenos apresentados pelo MHC-I em casos de infecção viral e câncer, por exemplo. Devido à escassez de informações acerca da TOP em protozoários, pouco ou quase nada se sabe sobre o papel da TOP de *T. cruzi* (TOPTc). Diversos estudos apontam a sua presença em secretomas ou na superfície do parasito em diferentes fases do seu ciclo de vida, indicando uma possível e provável interação direta com a célula hospedeira. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi expressar a TOPTc recombinante em *E. coli*, realizar sua caracterização bioquímica e elaborar uma análise estrutural por meio de modelagem molecular. Dentre os principais resultados, foi observado que a enzima foi ativa sobre o substrato Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(Dnp) com K_m de 24,89 μ M em 50 mM de tampão fosfato pH 7.0 como tampão ótimo de atividade. A atividade da TOPTc é dependente de zinco, apresenta termofilicidade e sua inibição não é afetada por EDTA, porém é inibida por Cpp-Ala-Ala-Phe-pAb com IC50 de 54,29 nM. Dentre os modelos 3D gerados, o obtido pelo Alphafold apresentou melhores parâmetros tais quais menor *MolProbability score* e maior *Ramachandran Favored score*. Por fim, anticorpos específicos produzidos contra a enzima, mostraram uma marcação próxima a bolsa flagelar do parasito, local de intensa troca de moléculas com o meio extracelular. Esse trabalho representa o primeiro estudo de TOP de protozoários, com a caracterização de parâmetros bioquímicos, de localização e de estrutura, que contribuirá especialmente para a busca de inibidores capazes de romper o ciclo de vida do parasito, visando um futuro tratamento para a doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas; Metaloprotease; Thimet Oligopeptidase; Caracterização Bioquímica; *Trypanosoma cruzi*; Análise Estrutural

ABSTRACT

Chagas disease is a neglected disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, that is mainly transmitted by the insect vector commonly known as kissing bug, affecting over 6 million people worldwide. The symptoms are generally mild and acute, but approximately 30% of the cases evolve to the chronic phase where organs such as the heart and intestine are compromised. To this moment, there is no effective vaccine and the treatment is based on two drugs of small efficacy that are not capable of treating the chronic phase of the disease. The development of less toxic chemotherapeutic alternatives requires the search for target molecules that are vital for the protozoan and can be inhibited in a specific manner, such as enzymes. Thimet oligopeptidase (TOP) is a zinc-dependent metallopeptidase belonging to the M3 family that cleaves bradykinin, a vasoactive peptide that increases vascular permeability. In humans, TOP is one of the main intracellular oligopeptides processor, selecting antigens presented by the MHC-I in cases of viral infections and cancer. Due to scarce information on TOP in protozoans, little is known about the role of TOP in *T. cruzi* (TOPTc). However, TOPTc has been identified in the secretome and in the surface of the parasite in different phases of its life cycle, indicating a possible interaction with the host cell. In this context, the objective of this work was to express recombinant TOPTc in *E. coli*, perform its biochemical characterization and elaborate a structural analysis through molecular modelling, providing, thus, relevant information for the study of this enzyme, such as optimal pH, temperature and buffer, optimal concentration of ions, inhibitory effect and kinetic aspects of the enzyme. Among the main results, we observed that the enzyme is active towards the substrate Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(Dnp), with K_m of 24,89 μ M in 50mM phosphate buffer pH 7.0. TOPTc activity is dependent on zinc and the enzyme is thermophilic. Inhibition is not affected by EDTA, but the enzyme is inhibited by Cpp-Ala-Ala-Phe-pAb, with an IC₅₀ of 54,29nM. The 3D model generated by AlphFold showed the best parameters such as smaller MolProbity score and larger Ramachandran Favored score. Finally, anti-TOPTc specific antibodies colocalized in the flagellar pocket, where molecules are released to the extracellular milieu. This work represents the first study of TOP in protozoans and presents new observations related to this class of enzymes that will contribute to the development of new inhibitors molecules capable of disrupting the parasite life cycle and aid in the search for a treatment for Chagas' disease.

Keywords: Chagas Disease; Metalloprotease; Thimet Oligopeptidase; Biochemical Characterization; *Trypanosoma cruzi*; Structural Analysis.

1. INTRODUÇÃO

1.1.A doença de Chagas

Também conhecida como tripanossomíase americana, a doença de Chagas recebeu esse nome em homenagem ao médico e sanitarista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, que, em 1909, ao descrever a enfermidade, foi o primeiro pesquisador a caracterizar o ciclo completo de uma doença infecciosa, identificando o agente etiológico, vetor e reservatório doméstico (Chagas, 1909; Secretaria de Vigilância em Saúde & Ministério da Saúde, 2022). Endêmica em 21 países das Américas, a doença de Chagas é uma antropozoonose de impacto global que atinge sobretudo populações vulneráveis, sendo caracterizada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença tropical negligenciada (OMS, 2022). O agente etiológico da doença de Chagas é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, cuja transmissão vetorial acontece por meio do inseto comumente denominado barbeiro.

1.2.Ciclo de vida do *T. cruzi*

Pertencente à ordem dos protozoários Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, o *T. cruzi* é um parasito obrigatório uniflagelado que possui cinetoplasto, uma estrutura rica em DNA mitocondrial que adquire morfologias e posições distintas ao longo do seu ciclo de vida heteroxênico. O parasito apresenta quatro formas de vida distintas entre si que transitam entre dois tipos de hospedeiros, invertebrados (triatomíneos) e vertebrados (mamíferos). Cada uma dessas formas possui características morfológicas, metabólicas e bioquímicas específicas para que possam se adaptar tanto nos ambientes intracelulares e sanguíneo do hospedeiro vertebrado quanto no trato digestivo do invertebrado (Bringaud et al., 2006; Moretti et al., 2020; Tielens & van Hellemond, 2009).

As quatro formas de vida do *T. cruzi* se dividem entre replicativas e infectivas (Figura 1). Formas infectivas e não replicativas encontradas na porção posterior do intestino do inseto hematófago são denominadas tripomastigotas metacíclicas e possuem formato alongado e delgado, com um cinetoplasto circular localizado na região posterior ao núcleo, próximo da bolsa flagelar, de onde emerge o flagelo (Wiser, 2021). Essas formas são liberadas nas fezes do inseto vetor durante o seu repasto sanguíneo e infectam o hospedeiro na lesão gerada no local da picada ou através de mucosas intactas como a conjuntiva ocular. Durante o processo de invasão da célula hospedeira, o parasito é envolto pelo vacúolo parasitóforo, uma estrutura caracterizada por possuir pH baixo que induz a diferenciação em amastigotas intracelulares, processo chamado de amastigogênese (Bern, 2011; CDC, 2022).

Amastigotas são formas replicativas e não infectivas que possuem formato arredondado e flagelo atrofiado, imperceptível sob microscopia ótica. São capazes de secretar proteínas que conseguem destruir o vacúolo parasitóforo, de onde se liberam para o citoplasma, local em que se multiplicam por fissão binária e diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos, que lesam a célula e são librados na corrente sanguínea (Campo, 2016; CDC, 2022).

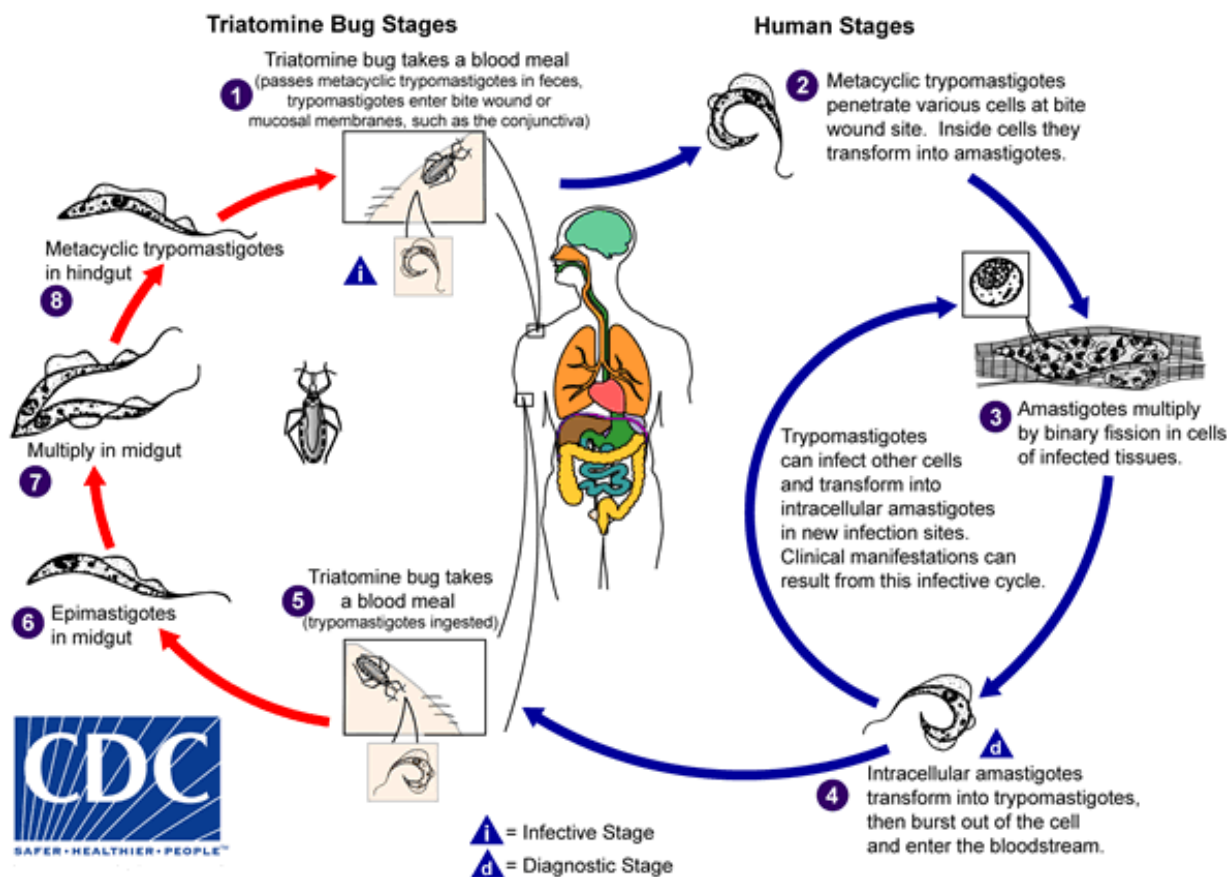


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (CDC, 2022). Disponível em <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

Tripomastigotas sanguíneos são formas infectivas não replicativas que infectam células de uma variedade de tecidos e se transformam sucessivamente em amastigotas intracelulares. As manifestações clínicas observadas na fase aguda podem resultar desse ciclo infeccioso. O inseto vetor se torna infectado através do repasto sanguíneo de humanos ou de animais que possuem os parasitos circulantes. Formas tripomastigotas sanguíneas ingeridas se diferenciam em epimastigotas no intestino médio do inseto (CDC, 2022). Essas formas replicativas e não infectivas se replicam por fissão binária e possuem forma alongada e cinetoplasto em forma de bastão na porção anterior ao núcleo (Figura 2^a). Com o consumo dos nutrientes após o repasto sanguíneo, os epimastigotas, submetidos à privação nutricional e estresse metabólico, aderem-se ao endotélio epitelial através do flagelo e diminuem sua taxa de replicação para então se diferenciarem em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior,

em um processo chamado metaciclologênese. Nesse momento, os parasitos estão prontos para invadir uma nova célula hospedeira quando forem liberados nas fezes durante um novo repasto sanguíneo do inseto hematófago (CDC, 2022; Wiser, 2021).

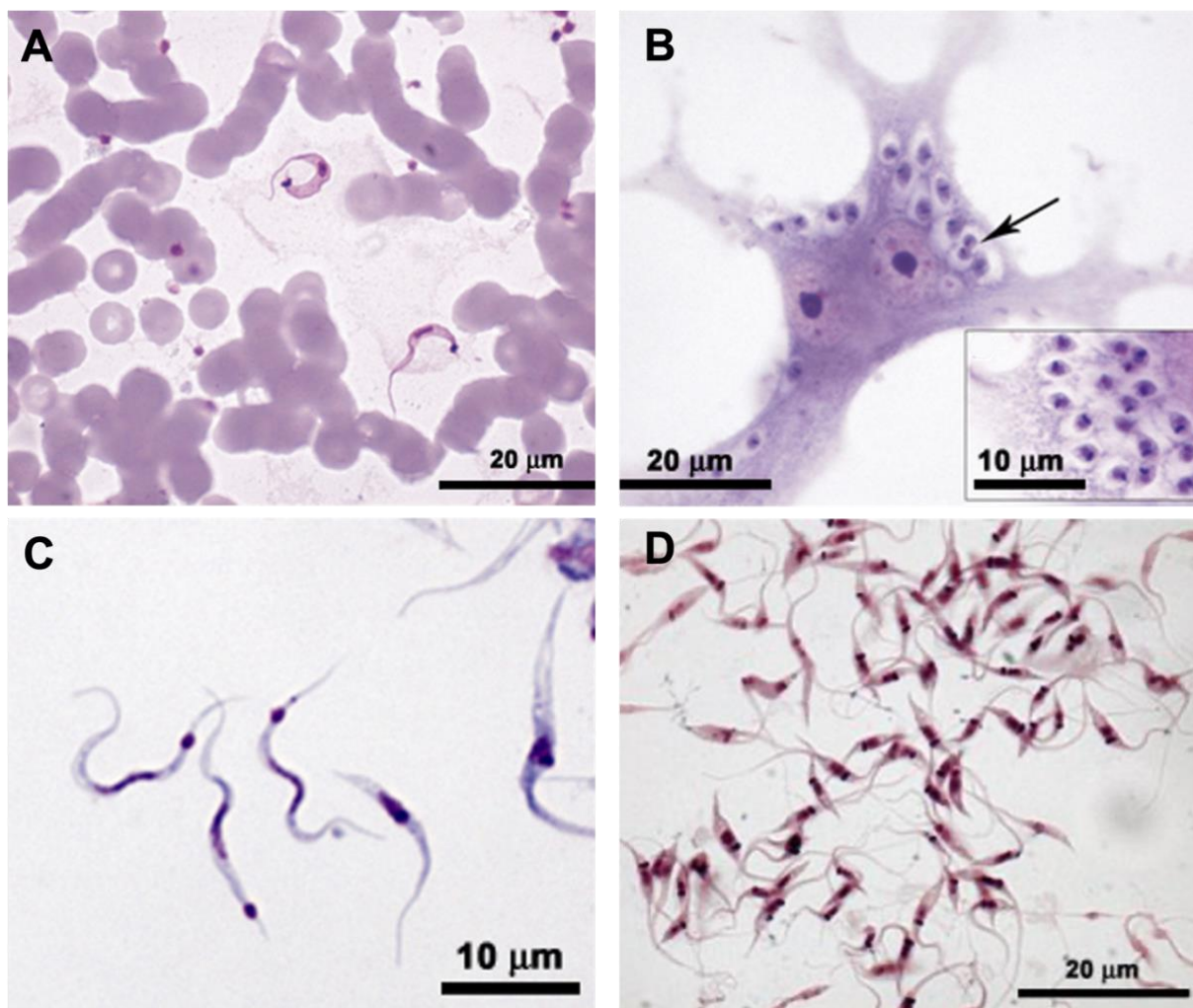


Figura 2: Morfologia das diferentes formas de vida de *T. cruzi*. Cada forma de vida possui um formato, tamanho do flagelo e posição do kinetoplasto característicos. (A): Formas tripomastigotas sanguíneas. (B): Formas amastigotas intracelulares. (C): Formas tripomastigotas metacíclicas. (D): Formas epimastigotas. Adaptado de Portal da Doença de Chagas, Fiocruz. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/organizacao-estrutural/>, acessado em 2 de outubro de 2022.

1.3. Manifestações clínicas da doença de Chagas

A doença é caracterizada por possuir uma fase aguda e uma fase crônica, que pode se manifestar na forma assintomática, também denominada de indeterminada, ou nas formas sintomáticas, caracterizadas pelo acometimento da função cardíaca, digestiva ou ambas. As manifestações clínicas da fase aguda podem começar de 1 a 2 semanas após a infecção pela via direta, isto é, contato com as fezes do triatomíneo, ou de 3 a 22 dias após a ingestão de alimentos contaminados (CONITEC, 2018). Nesta fase, podem ser observados sintomas leves a moderados como febre, que pode ser prolongada, devido à alta parasitemia, inchaço dos gânglios linfáticos, do fígado e

do baço, dor de cabeça e vermelhidão. Pode ocorrer uma inflamação no local da penetração do parasito que persiste por até 8 semanas, chamada de chagoma de inoculação. Em 10 a 20% dos casos pode acontecer o aparecimento do sinal de Romaña (Figura 3), um inchaço característico em uma das pálpebras que ocorre quando o parasito entra na corrente sanguínea através da mucosa ocular (conjuntiva) (CONITEC, 2018; Viotti et al., 2014). Em grande parte dos casos, a fase aguda pode ser assintomática, e até que os primeiros sinais da doença crônica e grave apareçam, é comum que não se note nenhum sintoma característico durante anos, de modo que grande parte dos infectados não sabem que possuem a doença (DNDi, 2022; OMS, 2022). Somente cerca de 1% dos infectados apresentam, durante a fase aguda, sintomas graves que acometem o sistema cardíaco ou nervoso, causando inflamações do coração e da meninge (CONITEC, 2018; Viotti et al., 2014).

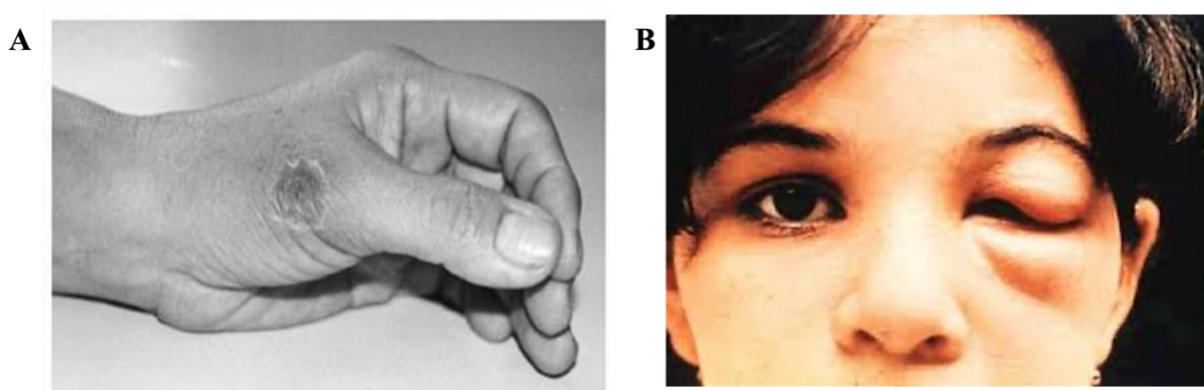


Figura 3: Manifestações clínicas da doença de Chagas. A- Chagoma de inoculação, inflamação no local de entrada do parasito. B- Sinal de Roamaña, inchaço unilateral na pálpebra, local em que ocorreu a entrada do parasito.

A fase crônica da enfermidade pode perdurar por até 30 anos ou mais após a infecção e aparecimento dos sintomas agudos e em 10 a 30% dos casos, é caracterizada pelo aparecimento de complicações que podem levar ao óbito como cardiomegalia, esplenomegalia e esofagomegalia. Tais manifestações em que ocorre o aumento do volume de órgãos como o coração, o esôfago e o estômago são graves, pois geram alterações no ritmo de contração do coração e comprometem o funcionamento do tubo digestivo (Viotti et al., 2014). Na fase crônica, é possível detectar a presença de anticorpos circulantes na corrente sanguínea, contudo os parasitos não são mais detectáveis na microscopia direta (CONITEC, 2018).

1.4. Epidemiologia da doença de Chagas

A doença de Chagas é a enfermidade parasitária que causa o maior número de mortes por ano na América Latina, sobretudo devido aos sintomas cardíacos e digestivos que se manifestam anos após a infecção (DNDi, 2022; OMS, 2022). Estima-se que existam entre 6 a 7 milhões de pessoas infectadas no mundo e em torno de 70 milhões vivem em áreas de risco de contrair a doença. Mesmo com a

adoção de iniciativas bem sucedidas para o controle da doença de Chagas, os óbitos anuais ainda são expressivos e giram em torno de 14 mil a nível mundial, enquanto surgem cerca de 30 mil novos casos por ano (Dias et al., 2016; OMS, 2022; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2022).

No Brasil, a doença de Chagas é uma das quatro principais causas de morte decorrentes de complicações cardíacas causadas por doenças infecciosas. Os dados mais atualizados do Ministério da Saúde sugerem que existe ao menos 1 milhão de infectados no país, sendo que esse número pode ser maior, chegando a representar até 2,4% da população brasileira (Dias et al., 2016; Ministério da Saúde, 2020). Apesar da adoção de políticas públicas de combate à doença implementadas de forma eficiente ao longo dos anos, o número de óbitos decorrentes da doença de Chagas no Brasil ainda gira em torno de 4 mil por ano, sendo ainda expressivo o número de pessoas infectadas que não tem acesso ao diagnóstico e ao tratamento, evidenciando-se, com isso, o importante custo social que a doença representa para o país (DIAS et al., 2016; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2022).

A transmissão vetorial em países endêmicos ocorre através do contato com as fezes dos triatomíneos infectados com o *T. cruzi* e animais domésticos e selvagens, bem como indivíduos infectados servem como reservatórios do parasito (Clayton, 2010; Ministério da Saúde, 2020). Outras formas de transmissão incluem ingestão de alimentos contaminados, transmissão congênita, transfusão sanguínea e transplante de órgãos. Apesar da certificação de erradicação da transmissão pelo *Triatoma infestans* no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020), surtos da doença continuam a acontecer, sobretudo devido à transmissão oral pelo consumo de alimentos não pasteurizados como açaí, caldo de cana e sucos, que podem conter as fezes contaminadas ou partes do inseto infectadas com o *T. cruzi*.

Com o aumento dos movimentos migratórios nas últimas décadas, países não endêmicos passaram a registrar números significativos de infecção por *T. cruzi*, como é o caso dos Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália, Espanha, Itália, entre outros (Figura 4). Na Europa, estima-se que existam aproximadamente 72 mil pessoas infectadas, enquanto os Estados Unidos abrigam mais de 300 mil (Bern & Montgomery, 2009; Dias et al., 2016). A presença da doença de Chagas em países não endêmicos mostra a importância do combate às vias de transmissão não vetoriais, como a transfusão sanguínea, a via congênita e o transplante de órgãos.

Global distribution of cases of chagas disease, based on official estimates, 2006–2010

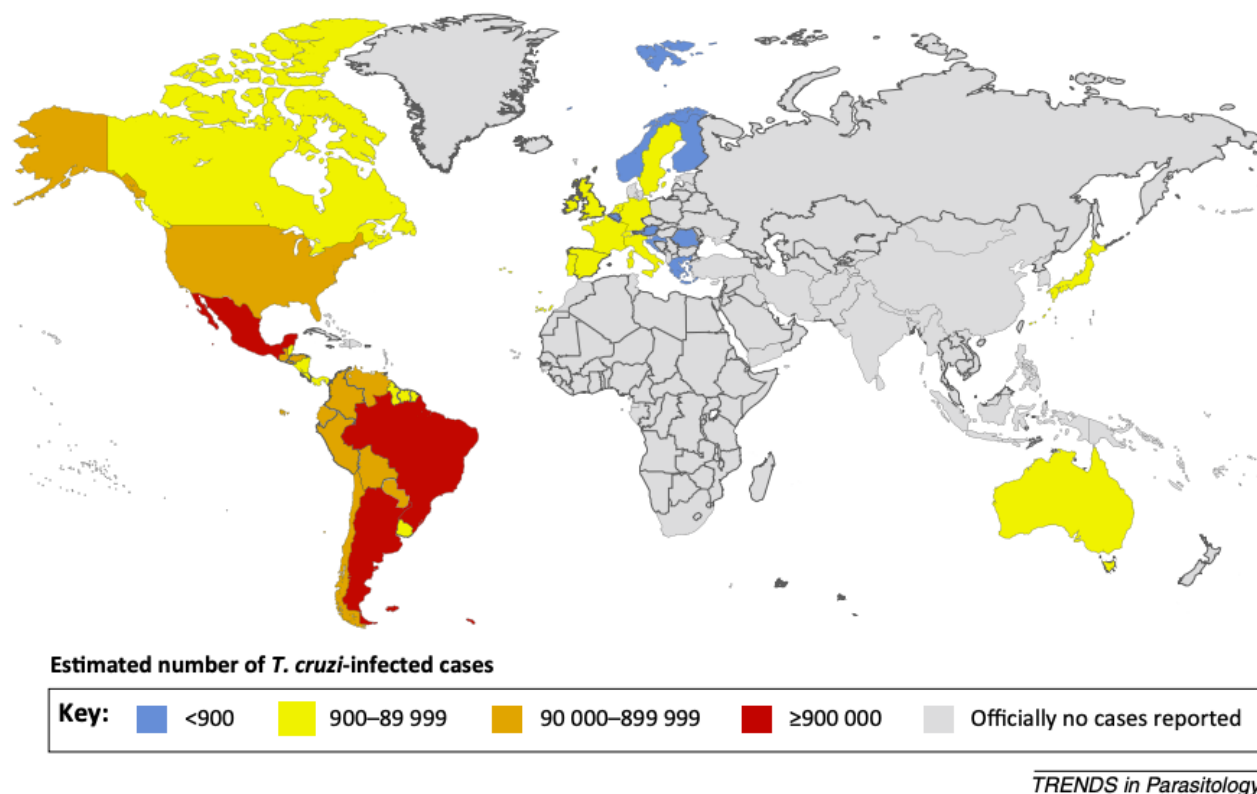


Figura 4: Distribuição global da doença de Chagas. Retirado de (PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2015).

1.5. Tratamento da doença de Chagas

Até o momento não existe nenhuma vacina e o tratamento para a doença de Chagas baseia-se em dois medicamentos com alta toxicidade, o nifurtimox e o benznidazol, os quais não são capazes de tratar a fase crônica da doença sem causar efeitos adversos na maioria dos pacientes (Clayton, 2010). O benznidazol, apesar de ser o medicamento de escolha no Brasil para o tratamento da doença de Chagas, causa eventos adversos importantes em cerca de 53% dos casos, podendo persistir por meses após a interrupção do tratamento. Os principais eventos adversos são dermatites, exantemas, parestesias, artralguas e intolerância gastrointestinal. O uso do benznidazol também está associado ao aparecimento de sintomas que geram grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, como neutropenia e depressão da medula óssea (CONITEC, 2018).

O nifurtimox é adotado apenas em casos muito específicos para indivíduos que apresentem intolerância ao benznidazol ou desenvolvam eventos adversos graves com seu uso na fase aguda. O uso do nifurtimox só pode ser adotado na fase crônica ou indeterminada em crianças ou adolescentes que necessitem de uma segunda linha de tratamento alternativa ao benznidazol. O ministério da saúde não recomenda o uso de nifurtimox em adultos e nem em pacientes de qualquer faixa etária que sejam portadores da doença crônica cardíaca. Isto porque o nifurtimox causa eventos adversos em cerca de

85% dos casos, sendo a intolerância gastrointestinal a mais frequente, seguida de eventos reumatológicos e dermatológicos. Devido ao conhecimento restrito acerca do nifurtimox, de sua menor disponibilidade no Brasil e sua maior taxa de eventos adversos, o nifurtimox é fornecido no Brasil pelo ministério da Saúde apenas por demanda em casos específicos que necessitem de uma segunda linha de tratamento e deve ser acompanhado com cautela (CONITEC, 2018).

Diante da inexistência de alternativas terapêuticas, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Doença de Chagas, documento oficial do SUS que institui os critérios para diagnóstico, o tratamento e posologia adequados, dentre outros cuidados, estabelece o benznidazol como o tratamento de primeira linha para a doença. Dessa maneira, a fim de minimizar os danos que a doença de Chagas causa para a economia e saúde da população nos países afetados, faz-se necessária a descoberta de novos medicamentos eficazes e seguros (CONITEC, 2018).

Para o desenvolvimento de alternativas quimioterápicas menos tóxicas, é importante buscar moléculas que sejam vitais para o protozoário, mas não para o hospedeiro, como enzimas e receptores, que podem ser inibidos de maneira específica. Dentre as enzimas que participam de processos exclusivos e essenciais para o *T. cruzi*, destacam-se aquelas relacionadas com a invasão da célula hospedeira, fatores de virulência e as enzimas que atuam no metabolismo de biomoléculas e na clivagem de proteínas internalizadas do hospedeiro, dentre outros processos essenciais para a sobrevivência do parasito (Chang & McGwire, 2002). Enzimas comuns ao patógeno e ao hospedeiro, porém localizadas em diferentes compartimentos no parasita, como aquelas que são liberadas ou localizadas na superfície do agente infeccioso, também compreendem potenciais alvos terapêuticos, pois facilitam a entrega do medicamento, diminuindo a toxicidade para o hospedeiro (Queiroz et al., 2014).

No *T. cruzi*, uma classe de proteínas que atuam como fatores de virulência, na invasão da célula hospedeira e em diversos outros processos vitais são as proteases (ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012; BASTOS et al., 2010; BAYER-SANTOS et al., 2013). Proteases são enzimas amplamente distribuídas em todos os tipos de organismos e que desempenham o importante papel de hidrolisar fragmentos proteicos ou proteínas. Como consequência, processos patológicos como doenças cardiovasculares, condições inflamatórias, desordens neurodegenerativas e câncer podem estar relacionadas a alterações na atividade proteolítica (Schilling, 2014).

1.6. Proteases

Através da hidrólise proteica, as proteases ocupam papel vital nos diversos processos celulares, como por exemplo fornecendo aminoácidos para a síntese de novas moléculas e para os processos de crescimento e remodelação da célula, atuando na conversão de proteínas em suas formas bioativas, promovendo a remoção do peptídeo-sinal para o correto endereçamento de proteínas, participando de eventos relacionados à sinalização celular, morte celular, ativação do sistema imune, dentre diversos outros processos (Barrett, 2000).

As proteases podem ser subdivididas em endopeptidases (proteases que clivam ligações peptídicas internas) ou exopeptidases (proteases que clivam ligações peptídicas nas extremidades da cadeia proteica). Ademais, as proteases são classificadas de acordo com o seu mecanismo catalítico e a susceptibilidade a inibidores em 6 classes: aspártico, cisteíno, metálico, serino, treonino e glutâmico-proteases. Cada uma dessas classes é subdividida em famílias que podem ser novamente divididas em clãs de acordo com a similaridade sequencial e estrutural, respectivamente (Barrett, 2000).

Diferentes tipos de proteases são expressos nas diferentes fases do ciclo de vida dos parasitos, a fim de auxiliar na replicação e na transição entre elas. Parasitos intracelulares como o *T. cruzi* utilizam eficiente e expressivamente diversos tipos de proteases que participam de processos importantes, como a degradação de proteínas do hospedeiro como a hemoglobina, imunoglobulinas, proteínas da matriz extracelular, entre outros (Mckerrow et al., 1993). Também se destaca o papel da oligopeptidase B, uma serino-protease citoplasmática responsável por gerar aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} , que leva ao recrutamento lisossomal em direção à membrana e culmina na invasão celular (Klemba & Goldberg, 2002).

Diferentes estudos de proteoma identificaram proteases secretadas para o meio extracelular ou expostas na superfície do protozoário, o que demonstra a participação dessas enzimas em mecanismos relacionados à interação patógeno-hospedeiro (Bayer-Santos et al., 2013; Mandacaru et al., 2019; Queiroz et al., 2014). Entre essas proteases, destacam-se as metaloproteases, que são proteases que contêm um íon metal no sítio ativo e que desempenha papel fundamental na ligação ao substrato, direcionando a ligação peptídica a ser hidrolisada. Geralmente, o íon presente no sítio ativo é um Zn^{2+} ou um Ca^{2+} , cátions bivalentes que também são responsáveis por estabilizar a proteína e que podem ser quelados por íons bivalentes que são, em geral, seus inibidores, como a 1,10-fenantrolina e o fosforamidon. Dentre as principais representantes das metaloproteases, podemos citar as collagenases, a matrizmetaloprotease (MMP) e a termolisina. Estudos demonstram que a collagenase e/ou MMP têm um papel na ruptura da barreira hematoencefálica em doenças neuroinflamatórias, uma vez que as

mesmas clivam componentes críticos da matriz vascular como colágenos, fibronectinas e laminina, (Bastos et al., 2010).

Em tripanossomatídeos, a gp63 destaca-se como uma relevante glicoproteína e metaloprotease que exerce uma função importante na entrada do parasito na célula hospedeira. Estudos demonstram que ela está presente em todas as formas de vida do parasito e nos diferentes estágios de desenvolvimento (Kulkarni et al., 2009). Outros estudos mostram que a metalopeptidase leucil aminopeptidase, expressa em todas as formas de vida de *T. cruzi*, medeia a atividade peptidolítica do aminoácido essencial leucina, e pode estar envolvida no suprimento nutricional do parasito (Cadavid-Restrepo et al., 2011).

1.7. A Thimet Oligopeptidase (TOP)

A enzima thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15), é uma metalo-oligopeptidase dependente de zinco pertencente à família M3 juntamente com a neurolisina e a peptidase mitocondrial intermediária (MIP). Seu nome (**thi**ol-dependent **met**alopeptidase) indica a presença de um metal no sítio ativo e a dependência de compostos tiólicos para sua completa atividade (Barret, Alan J; Chen, 2012).

Previamente conhecida como Pz-peptidase, a TOP foi primeiro descoberta durante experimentos com o substrato sintético Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg. O primeiro nome sugerido para a enzima devia-se à sua capacidade de clivar o peptídeo Pz, que foi descoberta durante um experimento com colagenase de bactérias *Clostridium* (Barret, Alan J; Chen, 2012; Tisljar, 1993). Devido a sua ação colagenolítica em bactérias, inicialmente pensou-se que a Pz-peptidase era uma colagenase que agia na degradação de matriz extracelular, mas estudos posteriores mostraram que a enzima não agia na molécula de colágeno, mas apenas contribuía nas fases finais do processo de degradação do mesmo (MORALES; WOESSNER, 1977). Mais tarde foi descoberto que a atividade de Pz-peptidase era, na verdade, de duas enzimas: a thimet oligopeptidase e a neurolisina, também pertencente à família M3 (BARRET, ALAN J; CHEN, 2012).

Nos anos 1980 foi descrita uma oligopeptidase dependente de tiol, a qual foi denominada kininase A ou endo-oligopeptidase A (Coelho et al., 1981). Foi proposto, à época, que a endo-oligopeptidase A era a enzima que hoje conhecemos como thimet oligopeptidase, mas essa afirmação permanece em debate. A TOP também foi descrita como uma metalopeptidase capaz de hidrolisar peptídeos bioativos chamada de metaloproteinase solúvel (ORLOWSKI; MICHAUD; CHU, 1983).

1.7.1. Aspectos bioquímicos, físico-químicos e estruturais

Por ser uma metaloprotease, a thimet oligopeptidase possui o íon zinco no sítio ativo e apresenta o motivo HexxH, que é uma assinatura única de metalopeptidases dependentes de zinco e que na TOP é encontrado como HEFGH. Como acontece para a neprilisina, também uma endopeptidase, a histidina é essencial para a atividade catalítica da TOP (SHRIMPSON et al., 1997; TISLJAR, 1993).

Quanto às suas propriedades bioquímicas, a TOP possui a marcante característica de ser dependente de tiol, o que não é visto em outras metalopeptidases. O grupo funcional tiol (-SH) é também denominado grupo sulfidrilo ou mercaptano e tem importância na estabilização e estrutura da proteína principalmente devido à sua baixa energia de dissociação e capacidade de reagir e se ligar com a cisteína, que possui alta reatividade e funciona tanto com atividade nucleofílica quanto redox (ZEIDA et al. 2014). A característica de ser dependente de tiol faz com que a sua atividade máxima seja atingida apenas na presença de baixas concentrações de compostos tiólicos como o β -mercaptoetanol ou dithiothreitol (DTT), enquanto altas concentrações ou a ausência de compostos tiólicos possuem efeito inibitório (Tisljar, 1993).

A inatividade da TOP em condições oxidantes, ou seja, na ausência de tiol, se deve pela formação de pontes dissulfeto que geram oligômeros inativos. Em contrapartida, a presença de baixas concentrações de tiol gera um ambiente redutor que causa a dissociação dos oligômeros em monômeros ativos, conforme mostrado na Figura 5 (SHRIMPSON et al., 1997). Já concentrações muito altas de tiol são inibitórias devido à ligação dos compostos tiólicos ao zinco catalítico, necessário para a atividade enzimática (ICIMOTO *et al.*, 2017). Essa hipótese pôde ser confirmada a partir de um experimento com a enzima na forma ativa em que o zinco foi substituído por manganês, mostrando não haver inibição da atividade em altas concentrações de tiol (Barrett & Brown, 1990).

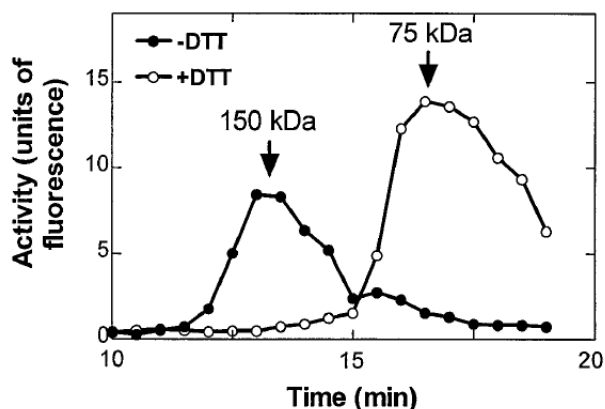


Figura 5: Atividade de TOP de murinos após cromatografia sob condições redutoras e não redutoras. O gráfico mostra o experimento em que a TOP de murino foi testada na presença e na ausência de 0,1mM de DTT após fracionamento por cromatografia por exclusão (SHRIMPSON et al, 1997).

Apesar de a TOP ser uma metalopeptidase, o EDTA, conhecido inibidor dessa classe de enzimas, não parece inibir a atividade de TOP prontamente, como seria esperado para um agente quelante. Em alguns estudos foi necessário um tempo longo de incubação com EDTA para atingir a completa inibição da atividade da TOP, chegando a até 24h (Tisljar, 1993). Sabe-se, também, que a atividade da enzima tratada com EDTA é restabelecida com a adição de $ZnCl_2$. O mesmo acontece, parcial ou completamente, na presença de baixas concentrações de cátions bivalentes. Em contraste com baixas concentrações de metal, os íons Zn, Mn, Pb, Ni, Hg, Ag, Cu na faixa de mM inibem a atividade da enzima (TISLJAR, 1993).

Já a 1,10-fenantrolina possui ação inibitória completa ou quase completa mesmo após alguns minutos de incubação. Contudo, essa inibição pode ser reversível, uma vez que a atividade é restabelecida após diluição da enzima em novo tampão sem adição de metais. Isso se dá pela fraca ligação da 1,10-fenantrolina com o metal no sítio ativo, que leva à inativação. Quando a enzima é diluída, a fenantrolina é removida e a atividade é restaurada sem necessidade de adição de metais (Tisljar, 1993).

A TOP também é inibida reversivelmente pelo composto carboxilado Cpp-Ala-Ala-Phe-pAb, adotado como seu principal inibidor sintético, cujo grupo carboxil interage com o Zn^{2+} do sítio ativo enquanto a porção restante interage com o sítio de reconhecimento do substrato de forma a inibir a sua atividade (Orlowski et al., 1988).

Até o momento, a única estrutura tridimensional de thimet oligopeptidase resolvida é a de humano, disponível no banco de dados PDB. Nela é possível observar que o centro catalítico se localiza em uma fenda onde se encaixa o substrato, que, por esse motivo, deve ter um tamanho pequeno e limitado

(Oliveira et al., 2001), demonstrando sua especificidade para hidrolisar apenas oligopeptídeos de até 17 aminoácidos, conforme mostrado na Figura 6.

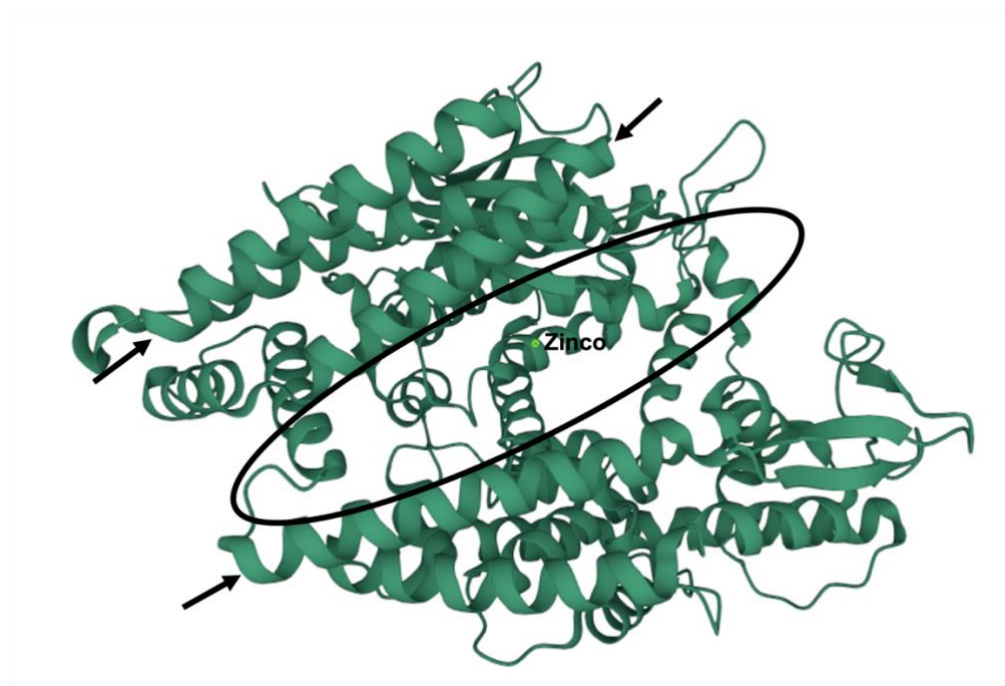


Figura 6: Estrutura tridimensional da Thimet Oligopeptidase humana cristalizada, disponível no PDB (1S4B). O íon zinco representado em verde claro mostra que o sítio ativo se localiza no fundo da fenda (região oval delimitada) formada entre as estruturas de α -hélice indicadas pelas setas.

1.7.2. Funções da Thimet Oligopeptidase

A TOP possui a particularidade de clivar, especificamente, ligações internas de cadeias de peptídeos que contenham de 6 a 17 aminoácidos nos resíduos hidrofóbicos (que não Isoleucina) na posição P1 e P3' (Oliveira et al., 2001). O principal substrato *in vivo* da TOP é a bradicinina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe | Ser-Pro-Phe-Arg), um peptídeo vasoativo que aumenta a permeabilidade vascular e cuja hidrólise pela TOP acontece entre Phe e Ser. A TOP também pode atuar de maneira menos expressiva sobre outros peptídeos de forma a - 24 -ílic-los inativos, pois também cliva Prolina na posição P2'e ligações localizadas 3 a 6 resíduos de aminoácidos distantes do C-terminal. Este é o caso da neurotensina na ligação: Glp-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg | Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu), a angiotensina I, a gama-endorfina e a nocicpetina (Orlowski et al., 1988).

Envolvida tanto no processamento e formação quanto na degradação de peptídeos bioativos, a TOP está presente nas mais diversas células mamíferas, sendo altamente expressa no cérebro e nos testículos (Oliveira et al., 2001). Algumas hipóteses podem ser sustentadas quanto ao possível papel da TOP nos organismos. Em alguns tipos de câncer, como também em infecções virais, foi

demonstrada a participação da TOP na degradação de peptídeos liberadas pelo proteassoma para formar epítomos de linfócitos T citotóxicos (KESSLER et al., 2011). Em vertebrados, a TOP é uma das principais processadoras intracelulares de oligopeptídeos, desempenhando importante papel na seleção de antígenos a serem apresentados pelo MHC de classe I a partir da ação do proteasoma 26S, enquanto a neurolisina, pertencente à mesma família, tem como principal função a degradação da neurotensina extracelular (Visniauskas et al., 2019).

A geração de peptídeos a serem apresentados pelo MHC-I se dá através da degradação de proteínas irreversivelmente oxidadas pelo proteasoma, o que gera diversos peptídeos que são posteriormente digeridos por peptidases como a TOP. Alguns peptídeos, porém, escapam da degradação por peptidases no citosol e são translocados pelo complexo proteico TAP para o retículo endoplasmático, onde se ligam ao MHC -I que é transportado para a superfície celular para ser reconhecido por linfócitos T (ICIMOTO *et al.*, 2017).

Em células de mamíferos, a síntese da TOP ocorre no citosol, em ribossomos, sem zimogênios. Até o momento, não foi encontrado nenhum inibidor de TOP endógeno. Diferentemente das proteínas responsáveis pela produção de peptídeos antigênicos, a TOP não é regulada por interferon gama. Contudo, considerando a sua provável participação na apresentação de antígenos pelo MHC-I, infere-se que a TOP possua um mecanismo de regulação a nível transcricional ainda desconhecido (ICIMOTO *et al.*, 2017).

Também, considerando seu alto conteúdo de tiol, é possível inferir que a regulação dessa enzima seja feita por um mecanismo redox associada aos grupos tíóis. Alguns estudos sugerem uma provável regulação de atividade da TOP por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que participa de cadeias de sinalização celular. Sabe-se que resíduos de cisteína são os principais alvos de sinalização redox de moléculas de H_2O_2 , a qual requer a oxidação reversível do grupo tiol a intermediários do ácido sulfênico ou sulfônico, que podem ser associados à morte celular. A TOP pode ser oxidada por H_2O_2 , gerando maiores estados oxidativos da cisteína e formando ácido sulfênico, o que mantém a TOP na sua forma dimérica. Isso já foi observado na família das MMPs (matriz metaloproteinases), que são reguladas por H_2O_2 e possuem sua expressão e ativação reguladas por espécies reativas de oxigênio, o que parece ser o caso da TOP, que também é uma metaloproteinase (ICIMOTO *et al.*, 2017).

A redução da expressão da TOP em células mononucleares sanguíneas parece ser o mecanismo responsável pela apresentação anormal de antígenos que contribui para a patogênese da artrite reumatoide e outras doenças inflamatórias. Do mesmo modo, a expressão diminuída da TOP pode ser um provável biomarcador para um bom prognóstico do câncer de pulmão de células não pequenas,

mas, em contrapartida, parece ser um indicador de risco aumentado de carcinoma hepatocelular, conforme estudos realizados em pacientes portadores da neoplasia (Ferro et al., 2020).

A TOP foi associada a um importante papel de ativar serino-proteinases que degradam o peptídeo β -amiloide, principal componente da placa amiloide que se acumula causando o efeito tóxico na doença de Alzheimer (PHILIBERT et al., 2014; YAMIN et al., 1999). Estudos identificaram a superexpressão de TOP em neurônios submetidos à toxicidade mediada pelo peptídeo β -amiloide, em camundongos utilizados como modelo para deposição de placa amiloide, bem como em tecido cerebral de pacientes portadores de Alzheimer. Ao todo, esses resultados sugerem que a TOP humana desempenha um efeito compensatório e neuroprotetor no cérebro contra o acúmulo de peptídeo β -amiloide e consequentemente, contra o desenvolvimento das fases iniciais do Alzheimer (Ferro et al., 2020).

No contexto de doenças infecciosas, camundongos duplo nocaute para TOP (TOP^{-/-}), apresentam maior porcentagem de granulócitos e monócitos e menor porcentagem de linfócitos circulantes no sangue, demonstrando maior sobrevivência pós-indução de sepse polimicrobiana, o que foi acompanhada de uma leve diminuição dos níveis de TLR4 e TNF- α no hipocampo (Ferro et al., 2020). Apesar de a TOP não ter sido associada a nenhuma outra doença infecciosa, foi descrita, em *Entamoeba histolytica*, agente etiológico da amebíase, uma tiol-protease dependente de agentes redutores que exibia isoformas abrangendo uma massa de 16 kDa a 66 kDa e desempenhando um possível papel de invasão tecidual observada em cepas virulentas de *E. histolytica*. Hipotetiza-se que essa protease, que é secretada, seja responsável pelo mecanismo citotóxico observado no estabelecimento da infecção por *E. histolytica* (Mckerrow et al., 1993).

Já em plantas, a TOP desempenha um importante papel na defesa contra microorganismos avirulentos através da regulação da morte celular programada e no controle do stress oxidativo (McConnell et al., 2019), o que sugere sua possível participação em processos similares aos desempenhados por SODs durante a infecção por *T. cruzi* (Mateo et al., 2008).

1.7.3. A thimet oligopeptidase no *T. cruzi*

Apesar de ser muito descrita como uma enzima solúvel do citosol, a TOP também já foi muitas vezes encontrada associada à membrana e também secretada em células AtT20 e MDCK (OLIVEIRA et al., 2002). No contexto da infecção pelo *T. cruzi*, pouco se sabe sobre o papel da TOP, porém diversos estudos apontam a sua presença em secretomas ou na superfície do parasito em diferentes fases do seu ciclo de vida (Bayer-Santos et al., 2013; Mandacaru et al., 2019; Queiroz et al., 2014). Um desses estudos analisou o subproteoma de membrana de *T. cruzi* por duas metodologias

complementares e mostrou que a TOP é encontrada na superfície de amastigotas em maior quantidade que de tripomastigotas (Queiroz et al., 2014).

Um outro estudo utilizando análise proteômica quantitativa *label-free*, demonstrou que a TOP é diferencialmente secretada pelas formas tripomastigota e epimastigota, dentro de vesículas e livremente no meio extracelular por vias não convencionais (Bayer-Santos et al., 2013). A TOP foi também encontrada no exoproteoma de formas tripomastigotas em um estudo que comparou as proteínas secretadas de amastigotas e tripomastigotas (Mandacaru et al., 2019). Contudo, a real função desempenhada pela TOP no contexto da infecção pelo *T. cruzi* ainda não é conhecida.

É sabido, porém, que durante a infecção pelo *T. cruzi*, formas tripomastigotas liberam proteoliticamente a bradisinina, principal substrato *in vivo* da TOP, o que leva à maturação de células dendríticas e ao início da resposta protetora do tipo 1 (Monteiro et al., 2007). Além disso, foi demonstrada a modulação da expressão de MHC classe I e da síntese do imunoproteossoma por *T. cruzi* em células de mamífero infectadas através de um mecanismo pós-transcricional desconhecido (Camargo et al., 2014).

1.8. Modelagem estrutural como ferramenta para a busca de inibidores

Atualmente, existem mais de 230 milhões de sequências depositadas no Uniprot, principal base de dados que reúne as sequências conhecidas de proteínas e informações sobre suas funções (UniProt, 2022). No entanto, apenas pouco mais de 190 mil estruturas proteicas foram depositadas no PDB até hoje, principal repositório de coordenadas atômicas e informações referentes à estrutura de proteínas (PDB, 2022). Apesar de ter crescido substancialmente nos últimos anos, o número de estruturas elucidadas, ainda representa uma pequena fração de aproximadamente 0,8% do total de proteínas conhecidas. A ausência de uma estrutura tridimensional resolvida dificulta o conhecimento da função de uma proteína e de suas interações bem como a exploração de possíveis aplicações biotecnológicas da mesma (Waterhouse et al., 2018).

Diante das dificuldades oferecidas por abordagens experimentais de resolução estrutural de proteínas, torna-se mister a busca por abordagens computacionais que venham a minimizar problemas como a laboriosidade dos métodos, o alto custo e a complexidade dos equipamentos de raio-X ou ressonância magnética nuclear necessários para a elucidação da estrutura de uma proteína. Além disso, há altas chances de o experimento gerar conformações discordantes com a real estrutura da proteína devido a mudanças físico-químicas adquiridas durante o processo de cristalização de uma proteína (Waterhouse et al., 2018).

Sabe-se que prever a estrutura de uma proteína a partir da sequência de aminoácidos apenas não é suficiente para gerar uma estrutura acurada e necessariamente condizente com a realidade. Uma das maneiras de se reverter esse problema é utilizar-se de estruturas homólogas já resolvidas experimentalmente a fim de que sirvam como molde ou referência para a predição da estrutura de uma proteína de interesse (Jumper et al., 2021). Sem oferecer altos custos, demandar tempo em excesso ou equipamentos complexos, a modelagem computacional torna-se uma excelente estratégia para entender a função desempenhada por uma proteína. Nesse contexto, destacam-se algumas abordagens capazes de gerar modelos tridimensionais de proteínas.

A modelagem por homologia baseia-se em sequências primárias idênticas que apresentam homólogos estruturais conservados para criar modelos baseados em um *template* ou molde. Esse método, utilizado pelo servidor Swiss Model, por exemplo, modela interações não caracterizadas utilizando-se de estruturas experimentais 3D encontradas em banco de dados de proteínas evolutivamente relacionadas à proteína de interesse (Bertoni et al., 2017). Para isso, as sequências depositadas devem ter no mínimo 25% de identidade sequencial com a proteína alvo. Nessa metodologia, a predição do modelo está intimamente relacionada com a similaridade entre o alvo e o molde. A partir de uma sequência primária, o servidor procura proteínas resolvidas experimentalmente no banco de dados PDB (protein databank), e gera um modelo com base em estruturas resolvidas de sequências homólogas. O resultado é a classificação dos moldes PDB encontrados em porcentagem de identidade de sequência, porcentagem de cobertura de resíduos da proteína molde e atribui valores estimados globais de qualidade, como o QMEAN (*Qualitative Model Energy Analysis*), pontuação dos aspectos geométricos da estrutura de proteínas (Benkert et al., 2008).

Outro método de predição de modelo tridimensional leva em consideração o enovelamento (*protein folding*) ou *threading* da proteína. Nessa metodologia, são identificados moldes de proteínas com estruturas experimentalmente resolvidas possivelmente similares à proteína alvo depositadas em banco de dados de enovelamento (Zheng et al., 2019). Pelo fato de a metodologia de *threading* se basear em estruturas 3D, que são mais conservadas que sequências primárias, o servidor pode utilizar como molde sequências com baixa identidade sem diminuir a confiabilidade das estruturas produzidas. O I-Tasser é um servidor que utiliza a metodologia de *threading* localizando *templates* ou moldes estruturais e não sequenciais por meio de um alinhamento múltiplo de estruturas do PDB. São feitas simulações de fragmentos contínuos de estruturas presentes nos *templates* obtidos do PDB. As predições da função são derivadas da comparação do modelo gerado com proteínas de funções conhecidas (Yang & Zhang, 2015). Como resultado, é gerada uma lista com 10 moldes no formato PDB, sendo designados 5 modelos da proteína alvo aos quais são atribuídos valores de confiabilidade

(C-score), conferindo, assim, uma pontuação de qualidade global estimada que varia de -5 a 2 (Du et al., 2021; Zheng et al., 2019).

Outro método consiste no aprendizado de máquina ou *machine learning*, que incorpora o conhecimento físico e biológico da estrutura da proteína realizando alinhamentos de múltiplas sequências, gerando modelos de alta acurácia. O aprendizado de máquina pode ser utilizado para predição de estruturas tridimensionais de proteínas que não possuem homólogas em bancos de dados e ainda assim geram modelos muito precisos. Os algoritmos utilizados viabilizam a predição das orientações e distâncias entre os resíduos de aminoácidos definindo uma estrutura tridimensional otimizada. Um exemplo é o servidor trRosetta, que aplica redes neurais profundas e modelagem por homologia para construir o modelo. Isso induz o modelo a ter características gerais de estruturas de proteínas conhecidas, gerando, assim, uma alta probabilidade de o resultado refletir proteínas ideais que ocorrem naturalmente. Dos parâmetros que avaliam a qualidade do modelo gerado, o TM-score predito representa a estimativa de confiança do modelo, variando de 0 a 12, tendo um TM-score > 0,6 um modelo com topologia predita corretamente.

O AlphaFold (Jumper et al., 2021) é um programa que possibilita a modelagem tridimensional de proteínas com acurácia em nível anatômico, ainda que não haja uma estrutura similar resolvida. Apesar de também operar com aprendizado de máquina, o AlphaFold utiliza outro tipo de rede neural para formar a estrutura tridimensional sugerida, que é dividido em 2 etapas. A primeira acontece a partir do dado de entrada, que é processado sendo construídas diversas camadas de sequências alinhadas, separadas em blocos de interesse e não interesse, de acordo com a interpretação da rede. Posteriormente, é produzida uma estrutura tridimensional conforme a translação e rotação de cada resíduo da proteína, obedecendo as relações espaciais e evolucionárias. Como parâmetro, o programa avalia o resultado da estrutura e atribui scores de confiabilidade para cada resíduo elaborado com pontuação específica que varia de 0 a 100. Todos os parâmetros avaliados para os modelos foram detalhados na metodologia do trabalho.

Assim como outras proteínas de *T. cruzi*, a estrutura tridimensional da TOPTc ainda não foi experimentalmente resolvida, de modo que ainda restam muitas questões a serem esclarecidas acerca das possíveis funções desempenhadas pela TOPTc no contexto da infecção por *T. cruzi* e no estabelecimento da doença de Chagas. Outra questão importante a se considerar é o pequeno progresso na busca pelo desenvolvimento de novos medicamentos, o que reforça a necessidade de se avançar as pesquisas básicas a respeito de vias bioquímicas cruciais no *T. cruzi*, a fim de se identificar novos alvos terapêuticos.

2. JUSTIFICATIVA

As doenças tropicais negligenciadas recebem esse nome por afetarem sobretudo as populações mais vulneráveis e de baixo poder aquisitivo, que não se qualifica como público alvo atrativo para a indústria farmacêutica. Além disso, pouco investimento é feito por parte dos governos na pesquisa e desenvolvimento de alternativas para o combate a essas doenças.

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada de grande importância que impacta a vida de milhões de pessoas. Apesar disso, o único tratamento disponível é obsoleto e ineficaz sobretudo para a fase crônica da doença, produzindo importantes efeitos colaterais nos pacientes (Clayton, 2010). Com base no exposto, é de suma importância que se aprofundem os estudos e pesquisas acerca do parasito para que se possa adquirir um maior conhecimento da patologia e abrir caminho para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e seguros do que os que se tem atualmente para a doença de Chagas.

As proteases desempenham papéis importantes no ciclo de vida do parasito e estão envolvidas em mecanismos moleculares de invasão da célula hospedeira e infecção. Por isso, caracterizam-se como alvos terapêuticos de destaque. Evidências sugerem que a thimet oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* é secretada pelo parasito em quantidades significativas (Mandacaru et al., 2019), o que indica uma potencial participação no processo de infecção da célula hospedeira. Todavia, a presença da TOPTc no exoproteoma do parasito não foi associada a nenhum mecanismo conhecido do parasito até o momento. Torna-se necessário entender a função da proteína no parasito para elucidar o seu possível papel no estabelecimento da doença de Chagas. Assim, a determinação dos parâmetros físico-químicos, cinéticos e estruturais são pré-requisitos para estudos futuros visando a busca de inibidores específicos para validação dessa enzima como potencial alvo quimioterápico para a doença de Chagas.

Além disso, a pesquisa de base que refere-se ao estudo de moléculas como a thimet oligopeptidase são importantes pois podem contribuir para que se atinja um maior conhecimento das possíveis estratégias utilizadas pelo patógeno para obter sucesso na infecção, auxiliando na compreensão da biologia do patógeno, além de contribuir para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico, o que é de suma importância para o desenvolvimento da ciência e da sociedade como um todo.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral:

O presente trabalho tem como objetivo geral realizar a caracterização bioquímica e estrutural da Thimet oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi*, bem como avaliar a localização celular da proteína no parasito na sua forma epimastigota

3.2. Objetivos específicos:

- Clonagem e expressão da rTOPTc
- Purificação da enzima recombinante
- Determinação do pH ótimo
- Determinação do tampão ótimo
- Determinação da temperatura ótima
- Determinação da concentração ótima de íons
- Determinação de parâmetros cinéticos
- Geração de modelo da estrutura tridimensional
- Produção de soro murino anti-rTOPTc
- Imunocitocalização da enzima em formas epimastigotas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura de *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas da cepa CL – Brener de *Trypanosoma cruzi* foram cultivadas em meio Liver Infusion Tryptose (LIT) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) inativado e 100µg/ml de estreptomicina/penicilina. A cultura foi mantida em estufa de 28°C até atingir a concentração de até 1×10^6 células/ml para serem tratadas para realização de microscopia de fluorescência.

4.2. Análise *in silico* da TOPTc

A sequência do gene *toptc*, bem como a sequência de aminoácidos da proteína TOP foram obtidas na plataforma TriTrypDB. Os alinhamentos foram realizados pelo programa MUSCLE (ClustalW). Esse alinhamento foi utilizado para confecção da árvore filogenética através do programa FigTree. As características da proteína foram analisadas com diferentes servidores: ProtParam para análises das propriedades físico-químicas, DeepTMHMM, para prever presença de domínios transmembrana; PredGPI para prever presença de cauda GPI; GPS-Lipid, para prever presença de modificações lipídicas; SignalP 5.0, para prever presença de sítios de clivagem do peptídeo sinal; Prosite, para prever domínios presentes na proteína; NetSurfP-2.0, para prever a estrutura secundária de proteína a partir de sua sequência primária e PSIPRED para visualização da composição aminoacídica da proteína.

4.3. Transformação bacteriana

A sequência da TOPTc foi sintetizada e clonada por empresa particular no vetor pET100/D-TOPO (Figura 7). O plasmídeo foi multiplicado em *E. coli* One Shot™ TOP10 e a proteína recombinante foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3) ou BL21-AI™. As bactérias competentes foram incubadas em gelo por 30 minutos com 50 ng do plasmídeo seguidos de choque térmico de 90 segundos em banho-maria a 42°C e, por último, foram incubadas por 2 minutos em gelo. Foram adicionados 800µL de meio S.O.C às bactérias e o crescimento foi promovido com agitação em *shaker* a 37°C e 220 rpm por 1h antes de serem centrifugadas a 16000G por 3 minutos. O pellet foi ressuscitado com 200 µL de sobrenadante e as bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo 100µg/mL de ampicilina e incubadas overnight a 37°C.

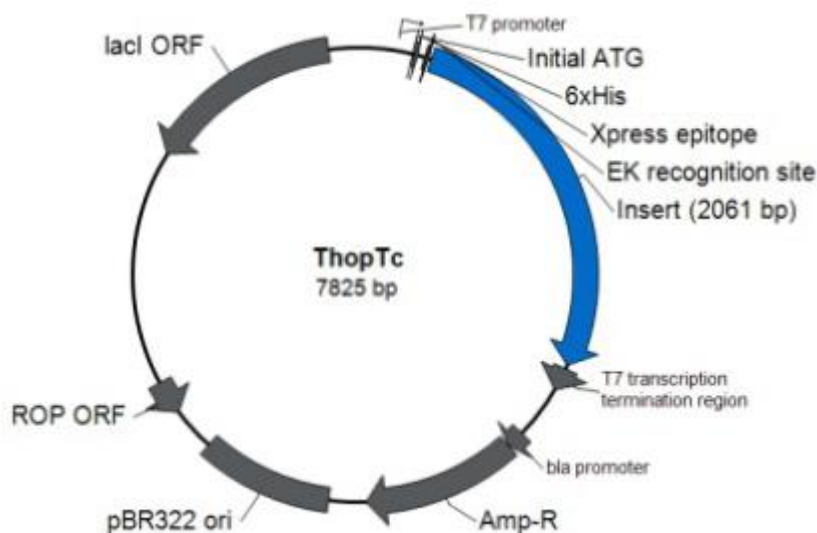


Figura 7: Mapa do plasmídeo pET100/D-TOPO utilizado para clonagem e expressão de TOPTc. A sequência da TOPTc contendo 2061pb está inserida após a cauda de histidina e o sítio de reconhecimento de enteroquinase e está flanqueada pelas regiões promotora e terminadora T7. O plasmídeo possui gene de resistência à ampicilina e um tamanho final de 7825 pb.

4.4. Preparação de DNA plasmidial

Um total de três colônias de bactérias *E. coli* One Shot™ TOP10 transformadas com o plasmídeo previamente sintetizado foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 100µg/mL de ampicilina (pré-inóculo) que foi mantido sob agitação de 220 rpm a 37°C por 1 hora. O pré-inóculo foi adicionado em 100 mL de meio LB contendo 100µg/mL de ampicilina e mantido a 37°C e 220 rpm overnight. O isolamento de DNA plasmidial foi realizado a partir de 20 mL da cultura bacteriana utilizando o kit PureLink® HiPure Plasmid Midiprep (ThermoFisher), conforme protocolo do fabricante. O resultado foi visualizado em gel de agarose 0,8% (m/v).

4.5. Padronização de protocolo de expressão da proteína recombinante (rTOPTc)

Um total de 3 colônias de bactérias *E. coli* BL21-AI™ transformadas com a preparação plasmidial (midiprep) previamente realizada foram selecionadas e inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 100µg/mL de ampicilina e cultivadas a 37°C em rotação de 220 rpm por 1h. O pré-inóculo foi então transferido para um - 33 -flico- 33 -yer contendo 100 mL de meio LB que foi cultivado nas mesmas condições anteriores até atingir densidade óptica (OD) de 0,4 – 0,6 no comprimento de onda de 600nm. A indução da expressão foi testada a 20°C e 220 rpm com 0,2% de arabinose em duas diferentes concentrações de IPTG (0,1mM e 0,5mM) durante 4h ou 16h. Após os respectivos tempos de indução de expressão, as bactérias foram centrifugadas a 2.000G por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet congelado a -20°C overnight. A lise bacteriana foi realizada com 1,8 ml do

reagente BugBuster Protein Extraction Reagent[®] (Novagen) e benzonase na concentração de 25µg/mL durante 20 minutos sob agitação constante. As amostras foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 16.000G e o sobrenadante foi separado do pellet, que foi acrescido de água e tampão de amostra Laemmli buffer (2% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 0,002% azul de bromofenol, 125mM Tris HCl, pH 6,8) 4X na proporção 4:1. Uma fração do sobrenadante também foi diluída em tampão de amostra Laemmli buffer 4X na proporção 4:1. As amostras diluídas em tampão de amostra foram fervidas por 10 min a 100° C e aplicadas em gel de poliacrilamida 10% (v/v).

4.6.Purificação por cromatografia de afinidade de rTOPTc

A fração solúvel lisada obtida de bactérias transformadas (16h de indução, 5mM IPTG, 20°C) foi purificada por cromatografia de afinidade em 500µL de resina de Níquel-Sepharose His•Bind[®] Purification Kit (Sigma) previamente equilibrada com binding buffer (Tris 20 mM pH 8, NaCl 500 mM). Inicialmente, foi testado um protocolo de purificação com múltiplas lavagens formando um gradiente de imidazol, conforme Tabela 1. Um segundo protocolo foi testado com repetições múltiplas de uma única concentração de sal para lavagem da resina antes da eluição, como mostrado na Tabela 2. O resultado foi analisado em SDS-PAGE 10% (v/v).

Tabela 1: Protocolo de purificação com múltiplas lavagens da resina testado inicialmente.

Etapa	Imidazol (mM)	Volume
Equilíbrio <i>(Binding buffer)</i>	Sem imidazol	3V
Lavagem <i>(Wash buffer)</i>	5mM	5V
	10mM	10V
	15mM	5V
	20mM	5V
Eluição <i>(Elution buffer)</i>	50mM	6V
	80mM	8V
	250mM	4V

Tabela 2: Protocolo de purificação otimizado para TOPTc em resina de níquel-sepharose.

Etapa	Imidazol (mM)	Volume
Equilíbrio <i>(Binding buffer)</i>	Sem imidazol	3V
Lavagem <i>(Wash buffer)</i>	5mM	15V
Eluição <i>(Elution buffer)</i>	80mM	3V
	250mM	3V

4.7. Quantificação das frações de TOPTc purificadas

A concentração das frações purificadas de TOPTc foram quantificadas utilizando o fluorômetro NanoDrop (ThermoFisher) ou o equipamento NanoBio. As amostras foram diluídas 10X em água mili-Q e 1 μ L da diluição foi aplicado no equipamento para quantificação. O resultado obtido foi multiplicado por 10 para ajuste da diluição. O branco foi lido com 10 μ L do tampão de diluição das frações.

4.8. Análises por Western Blot

600ng de proteína da fração eluída de purificação da TOPTc foi acrescida de tampão Laemmli 4x e fervida a 100°C por 10 minutos antes de ser aplicada em gel de poliacrilamida 10% (v/v). O mesmo foi realizado com 600 ng de POPTc purificada, que serviu como controle positivo. Ao término da corrida, realizou-se a transferência das amostras corridas para membrana de nitrocelulose Amersham™ Protran™ (GE Healthcare) previamente imersa por 15 minutos em tampão de transferência Towbin (Tris 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM; SDS 0,1% (w/v); e metanol 20% (v/v)) gelado utilizando sistema MiniProtean®3 Cell (BioRad™) com corrente constante de 350 mA por 14 minutos. A membrana foi corada com solução Ponceau (Ponceau S 0,2% (w/v); ácido acético 1%) por 5 minutos e lavada com água ultrapura a fim de visualizar as bandas transferidas e assegurar a transferência das amostras de interesse. Posteriormente, a membrana foi bloqueada em TBS (*Tris-Buffered Saline*, 50 mM Tris pH 7,5 e 150 mM NaCl) contendo 5% (m/v) de leite desnatado por 30 minutos. Depois, foi lavada duas vezes com TBS por 5 minutos e incubada por 1h com anticorpo primário anti-His-tag (Sigma Aldrich) diluído na proporção 1:2.000 em TBS 0,1% Tween 20 (TBS-T) (v/v) contendo 1% (m/v) de leite desnatado. A membrana foi lavada 5 vezes com TBS-T por 5 minutos cada lavagem. A seguir, foi aplicado o anticorpo

secundário (Goat Anti-Mouse IgG horseradish peroxidase conjugated diluído na proporção 1:30.000 em TBST 1% (m/v) leite desnatado. A membrana foi lavada novamente por cinco vezes e a imunomarcação observada por quimioluminescência utilizando o substrato de peroxidase ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) no equipamento ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare).

4.9. Testes de atividade enzimática

A atividade enzimática foi medida através da aferição da fluorescência gerada pela clivagem do substrato Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(2,4-dinitrophenyl)-OH em Mca-Pro-Leu-OH + Gly-Pro-D-Lys(2,4-dinitrophenyl)-OH. 1 µg de proteína recombinante foram diluídos em tampão com volume final da reação de 100µL. A fluorescência emitida pela clivagem do fluoróforo Mca foi aferida sob excitação de 320 nm e emissão de 405 nm em uma placa de 96 poços a 25°C e em intervalos de 1 minuto durante até 30 minutos. Todos os testes foram feitos em triplicata

4.9.1. Determinação da quantidade ótima de enzima

Para determinar a quantidade de enzima a ser utilizada nos testes enzimáticos, foi realizada uma diluição seriada a partir de um volume inicial de 1 µg da rTOPTc purificada em 90µL de tampão HEPES 25mM pH 7,5. Foi usado 20µM do substrato Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(2,4-dinitrophenyl) e a fluorescência foi medida a cada 1 minuto durante 30 minutos.

4.9.2. Estabelecimento do pH ótimo para atividade enzimática

A fim de determinar o pH em que a enzima rTOPTc apresenta melhor atividade, foi realizado um teste de atividade enzimática utilizando o tampão AMT (Ácido acético 50mM, MES 50 mM, Tris 100mM) ajustado para diferentes pHs, variando entre 4 e 11. Os testes foram feitos em triplicata para os valores de pH 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 9, 10, 11. Os valores em mFU/min foram normalizados com a média da triplicata de maior atividade (considerado igual a 100%).

4.9.3. Estabelecimento do tampão ótimo para atividade enzimática

Buscando identificar o tampão ideal para a atividade enzimática da TOPTc, foram testados os tampões Tris-HCl 20mM, Hepes 50mM, Fosfato Monobásico (50mM) e MES (25mM) nos pHs 6, 6.5 e 7. Os valores em mFU/min foram normalizados com a média da triplicata de maior atividade (considerado igual a 100%).

4.9.4. Efeito dos íons NaCl e Zn²⁺ na atividade enzimática

Para investigar se a presença dos íons NaCl e/ou Zn²⁺ influenciam na atividade da enzima, foram realizados testes cinéticos de atividade enzimática com quatro diferentes concentrações de NaCl (0, 75mM, 150mM, 300mM) e de Zn²⁺ (0, 1µM, 5µM, 1mM, 1mM) acrescidos ao tampão. Os valores em mFU/min foram normalizados com a média da triplicata de maior atividade (considerado igual a 100%).

4.9.5. Dependência da temperatura

Para realizar o ensaio de temperatura, a enzima foi incubada em termociclador nas diferentes temperaturas por 15 minutos e, decorrido o tempo, foi adicionado 20µM de substrato ao volume final da reação de 50µL. Após 15 minutos, foram adicionados 150µL de etanol absoluto para parar a reação. A fluorescência acumulada gerada pela liberação do AMC foi aferida como leitura *endpoint*. Os valores em mFU/min foram normalizados com a média da triplicata de maior atividade (considerado igual a 100%).

4.9.6. Influência de agentes redutores

Foi testado o efeito de diferentes agentes redutores na atividade da enzima. 1 µg de rTOPTc purificada foram incubadas com diferentes agentes redutores por 15 minutos antes de ser adicionado o substrato Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(2,4-dinitrophenyl)-OH na concentração de 20µM . A fluorescência foi medida em espectrofotômetro através da leitura cinética a cada 1 minutos durante 15 minutos.

4.10. Determinação do Km

A constante de Michaelis-Menten (K_m) foi plotada no gráfico de Hanes-Woolf ($[S]/V \times [S]$) e determinada por regressão não linear através da equação ($[S]/V = 1/V_{\max} \times [S] + (K_m/V_{\max})$). Foram testadas diferentes concentrações do substrato diluído no tampão fosfato monobásico 50mM pH 7 com uma concentração final de enzima de 150ng. A fluorescência liberada através do tempo foi medida em uma cinética de 15 minutos com leituras a cada 1 minuto.

4.11. Determinação do IC₅₀ dos inibidores

O cálculo do perfil de inibição (IC₅₀) do inibidor clássico de metaloproteases fenantrolina e do inibidor da TOP Cpp-Ala-Ala-Phe-pAb foi realizado por análise de regressão não linear da atividade

residual versus a curva de concentração do inibidor. 1 µg da enzima rTOPTc foram incubados com 1.2 mM, 1mM, 0.8mM, 0.6mM, 0.5mM, 0.4mM, 0.3mM e 0.1mM de fenantrolina e com 300nM, 150nM, 75nM, 38nM, 19nM e 9nM do inibidor Cpp-Ala-Ala-Phe-pAb diluídos em tampão fosfato monobásico pH 7 por 15 minutos a 25°C. O substrato Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(2,4-dinitrophenyl)-OH foi adicionado em uma concentração final de 20µM e a leitura cinética da fluorescência liberada através do tempo foi feita em espectrofotômetro.

4.12. Estabilidade de armazenamento

Foram testadas 3 diferentes condições de armazenamento a fim de verificar qual a melhor temperatura e condição de armazenamento da enzima rTOPTc. Após purificação, uma fração da enzima foi dividida em 3 frações iguais e armazenada a 4°C, -20°C, -20°C + 50% glicerol e temperatura ambiente. As frações foram armazenadas por 30 dias e a atividade enzimática foi medida em espectrofotômetro com a adição de 1 µg de enzima com 20 µM de substrato Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(2,4-dinitrophenyl)-OH.

4.13. Influência de Albumina na atividade da enzima

A influência da Albumina Sérica Bovina (BSA) na atividade da enzima rTOPTc armazenada em geladeira foi testada tanto para o armazenamento da enzima quanto no momento do teste de atividade. Uma alíquota purificada de rTOPTc foi dividida em duas frações iguais após a purificação, e a uma das frações foi adicionado BSA (Promega) na concentração final de 0,1 mg/mL. Ambas foram armazenadas a 4°C durante 30 dias. No momento do teste de atividade enzimática, ambas as frações foram testadas com ou sem uma nova adição de 0,1 mg/mL de BSA no poço. A atividade foi medida em espectrofotômetro e os valores em mFU/min foram normalizados considerando como 100% a média da triplicata do controle (sem BSA tanto no armazenamento quanto no teste).

4.14. Modelagem molecular

A fim de gerar uma estrutura tridimensional da Thimet Oligopeptidase de *T. cruzi* que possa auxiliar na caracterização estrutural e funcional da proteína, foram gerados quatro modelos utilizando quatro diferentes servidores: I-TASSER, SwissModel, trRosetta e AlphFold, que adotam as seguintes abordagens computacionais para a predição dos modelos, respectivamente: enovelamento, homologia e aprendizado de máquina. A sequência primária obtida na base de dados TriTryp, como descrito anteriormente foi submetida nos quatro servidores para geração do modelo tridimensional.

Utilizando o Swiss-Model, a sequência primária foi submetida ao servidor e 50 moldes foram sugeridos. Dentre eles, um foi selecionado para gerar um modelo. Os critérios utilizados para a seleção do *template* foram a identidade sequencial, o valor de GMQE (*Global Model Quality Estimate*), o valor de QMEAN (*Quality Model Energy Analysis*) e a cobertura.

Para a predição no I-Tasser, a sequência primária da TOP foi submetida utilizando as configurações padrões do servidor sem a escolha de nenhum molde de PDB específico. Para cada um dos 3 modelos gerados pelo servidor, foi atribuída uma pontuação de confiabilidade denominada *C-score*, que varia de -5 a 2, sendo que pontuações próximas a 2 indicam que o modelo tem maior qualidade. Modelos com maior qualidade possuem uma qualidade global estimada ao modelo baseada computadorizadamente na qualidade de *template*, assim como na convergência da simulação REMC.

Utilizando o trRosetta, foi submetida a sequência primária com as opções padrão já selecionadas pelo servidor. O parâmetro de qualidade analisado foi o TM-score, que se refere a confiabilidade do modelo de modo estimado a partir da probabilidade da distância e convergência do melhor modelo em os outros modelos previstos.

No servidor AlphaFold, foi digitado no campo de busca “Thimet Oligopeptidase *Trypanosoma cruzi*” e o modelo correspondente ao gene de ID Tc00.1047053506411.10 foi selecionado e analisado. Os parâmetros analisados foram o pLDDT, que diz respeito à confiabilidade e pode variar entre os valores de 0 a 100, sendo que scores menores que 50 representam muito baixa confiabilidade; entre 50 e 70, baixa confiabilidade; entre 70 e 90, confiável e acima de 90, muito alta confiabilidade. O modelo foi analisado de acordo com a cor dos resíduos, que representa a qualidade de acordo com a pontuação pLDDT.

Todos os modelos gerados pelos diferentes servidores foram refinados e os parâmetros de cada um foram avaliados para comparar a qualidade dos modelos gerados. O refinamento foi feito com o servidor GalaxyREFINE para otimizar as conformações de regiões não confiáveis. Os modelos foram submetidos ao servidor MolProbity para a comparação dos parâmetros de qualidade. A visualização, alinhamentos e imagens dos modelos gerados foram realizadas com o programa Chimera. Os parâmetros avaliados foram Clashscore, Ramachandran favored e MolProbity Score.

4.15. Produção de anticorpos policlonais anti-rTOPTc

Para obter o soro anti-rTOPTc foram usados 4 camundongos BALB/c machos que receberam quatro imunizações intradérmicas contendo cada uma 5µg de proteína purificada, sendo que antes da primeira imunização foi retirado sangue dos camundongos para preparo do soro pré-imune. O sangue

foi incubado a 37°C por 30 minutos para retração do coágulo, centrifugado por 5 minutos a 3000g e assim o soro obtido foi estocado a -20°C. Na primeira imunização foi usado o adjuvante completo de Freud e nas subsequentes foi usado o adjuvante incompleto. O intervalo entre as imunizações foi de 15 dias e o soro total foi obtido após 7 dias da última imunização e testado por Western blot.

4.16. Imunofluorescência

Os parasitos *Trypanosoma cruzi* epimastigotas foram fixados a partir de uma cultura de $1,0 \times 10^7$ parasitos/ml divididos em dois tubos eppendorff de 1,5 ml para centrifugação durante 5 minutos a 300G para retirada do sobrenadante. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com PBS estéril e gelado, com descarte do sobrenadante e ressuspensão do pellet. Após a última lavagem, o pellet foi ressuspendido em uma solução contendo 90µl de PBS e 10µl de formaldeído 37%. Os parasitos foram colocados em lâminas que já continham poli-lisina. Após 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e acrescentado Triton X-100 0,5% por 15 minutos. Foi utilizado PBS com 0,1% Triton-X e 0.1% BSA como solução de bloqueio e para diluição dos anticorpos. O Anticorpo primário foi adicionado em uma concentração de 1:100 e o anticorpo secundário utilizado foi o anti-mouse AlexaFluor 488, em uma concentração final de 1:2000. As imagens foram adquiridas em microscópio de imunofluorescência e tratadas utilizando o Software Image J.

5. RESULTADOS

5.1. Análise in - 41 - flico da TOPTc

A sequência do gene *toptc* retirada da base de dados TriTryp ([BCY84_06545](#)) possui 2061 pares de bases que codificam 686 resíduos de aminoácidos. A sequência genômica é transcrita em uma sequência de RNA de mesmo tamanho, por não possuir íntrons, e conforme análise da sequência no programa ProtParam, é traduzido em uma proteína de 77,53 kDa, possuindo um ponto isoelétrico (pI) teórico de 5,66. A cauda de histidina e o sítio de clivagem de enteroquinase presentes no plasmídeo conferem 1,8kDa a mais para a massa da proteína, recombinante, que resulta em uma massa molecular final de 79,33 kDa.

5.2. Predição de domínio transmembrana

A predição de topologia da TOPTc realizada através da plataforma DeepTMHMM, não detectou domínio transmembrana na proteína. A partir da sequência de aminoácidos e utilizando a metodologia de *deep learning*, foi inferido que a proteína possui uma conformação globular, apresentando 100% de probabilidade de não apresentar domínio transmembrana conhecido, conforme mostrado na Figura 8. O servidor prediz, portanto, que a proteína se encontra no interior celular e não interage com a membrana, não possuindo regiões que interajam com a superfície externa da célula.

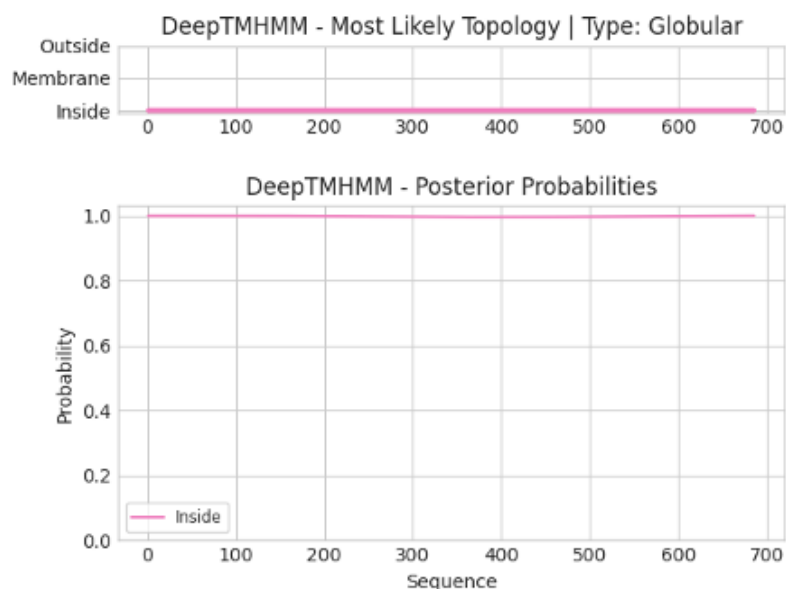


Figura 8: Predição de domínio transmembrana ausente na TOPTc, realizada através do programa DeepTMHMM. A linha rosa indica as regiões proteicas que ficam localizadas interiormente à membrana.

5.3. Predição de cauda GPI

A predição de cauda GPI (glicosilfosfatidilinositol) realizada através do programa PredGPI não detectou presença de cauda GPI na estrutura da enzima, conforme Figura 9. Desse modo, infere-se que a enzima não apresenta capacidade de se ancorar na membrana por meio de uma cauda GPI, contribuindo para a ideia de que ela fique restrita à porção extracelular ou intracelular.

Prediction Results	
Prediction accuracy summary:	
Highly probable	0
Probable	0
Weakly probable	0
Not GPI-anchored	0

Figura 9: Predição de cauda GPI na TOPTc utilizando o programa PredGPI. Não há predição para cauda GPI para ancoragem da proteína à membrana.

5.4. Predição de modificações lipídicas

O programa GPS-Lipid (<http://lipid.biocuckoo.org/webserver.php>) foi utilizado para prever sítios de modificações lipídicas na sequência da proteína (sendo elas palmitoilação, miristoilação, farnesilação e geranilgeranilação). Foram preditos 3 sítios de palmitoilação na TOPTc nas posições C28, C322 e C425, conforme mostrado na Figura 10. Não foram encontrados outros tipos de modificações lipídicas na sequência.

A

※ Prediction of lipid modification sites

Result has 3 items!

ID	Position	Peptide	Score	Cutoff	Type
Unnamed	28	FPKNVSACQVVAEEA	3.157	2.293	S-Palmitoylation: Cluster B
Unnamed	322	KKNLHESCILTEDGR	2.397	2.293	S-Palmitoylation: Cluster B
Unnamed	425	EGKYSHACCHSVVPP	1.332	1.079	S-Palmitoylation: Cluster A

Total 1 Pages

B

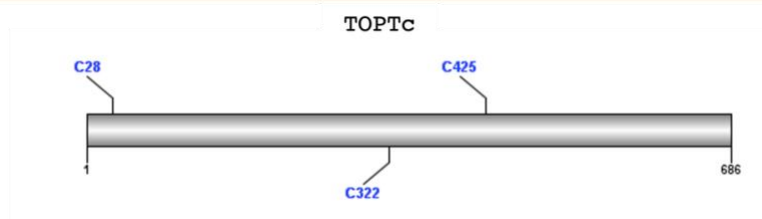


Figura 10: Predição de modificações lipídicas na TOPTc utilizando o programa GPS-lipid. (A) Tabela dos resultados especificando a posição na sequência do resíduo em que ocorre a modificação, o peptídeo em que a modificação se encontra,

o score e o cutoff das modificações e o tipo de modificação. (B) Representação esquemática na sequência linear (estrutura primária) da proteína.

5.5. Predição de peptídeo sinal

A predição de peptídeo sinal pelo servidor SignalP 5.0 mostrou que a proteína tem 0,19% de chance de possuir peptídeo sinal e 99,81% de não o possuir, conforme indicado pela linha alaranjada mostrada na Figura 11.

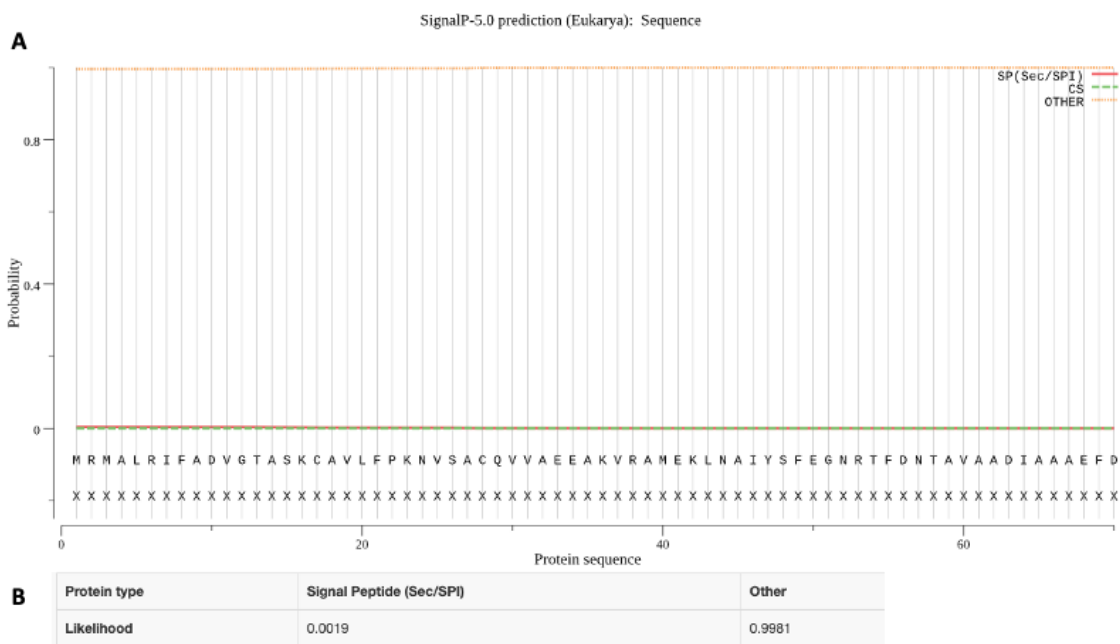


Figura 11: Predição de presença de sítio de peptídeo sinal da TOPTc realizada pelo servidor SignalP 5.0. (A) Localização da possível marca de peptídeo sinal ou sítio de clivagem na sequência. A linha rosa indica a probabilidade de determinada região da sequência ser um peptídeo sinal. A linha verde indica a região do sítio de clivagem do peptídeo sinal e a linha laranja indica a probabilidade de a sequência não possuir nenhum tipo de peptídeo sinal. (B) Probabilidade de haver peptídeo sinal na sequência) Signal Peptide (Sec/SPI) ou de não haver peptídeo sinal (Other).

5.6. Predição de domínios

A predição de domínios pelo programa ProSite – Expaty, reconheceu uma única assinatura na região de ligação de zinco nas posições H474 e H478, caracterizando a proteína como uma metalopeptidase. O sítio ativo da enzima foi reconhecido na posição E475, conforme mostrado na Figura 12.

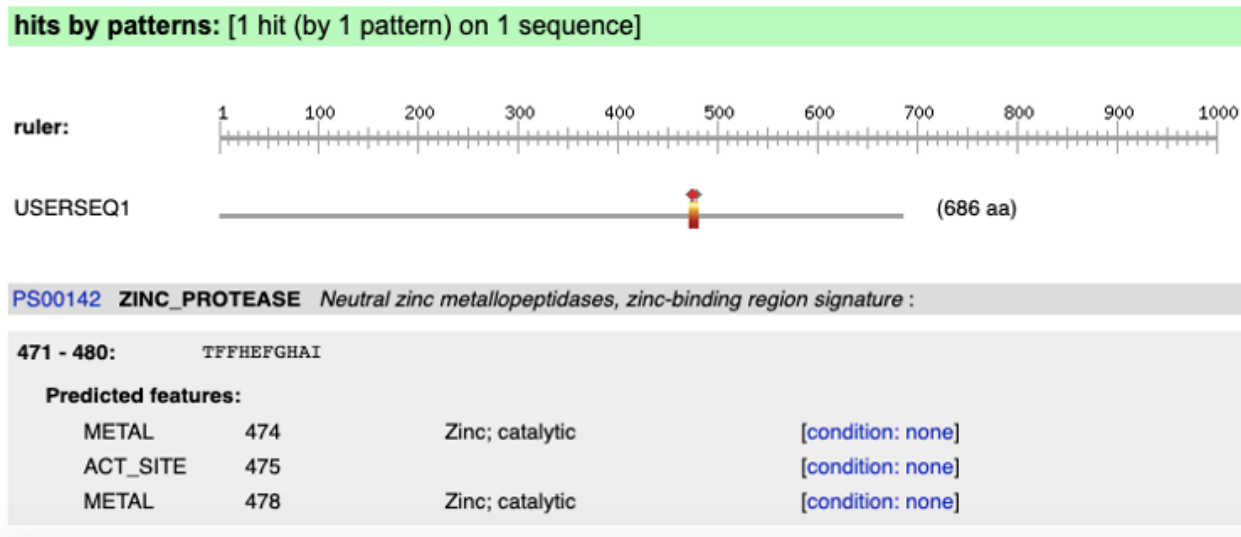


Figura 12: Predição de domínios presentes na TOPTc realizada no programa ProSite. A TOPTc possui o domínio de ligação de zinco nas posições H474 e H478, flanqueando o sítio ativo localizado na região E475.

5.7. Verificação da clonagem do vetor e preparação plasmidial:

A preparação plasmidial (midiprep) do DNA recombinante contendo aproximadamente 7,8kb foi visualizada em gel de agarose 0,8% (m/v) e resultou em duas bandas de DNA. Os dois tamanhos distintos eram esperados devido ao envelhecimento do plasmídeo durante o processo de preparação e isolamento, que pode ocorrer de diferentes formas e gerar bandas de tamanhos diferentes, conforme mostrado na Figura 13.

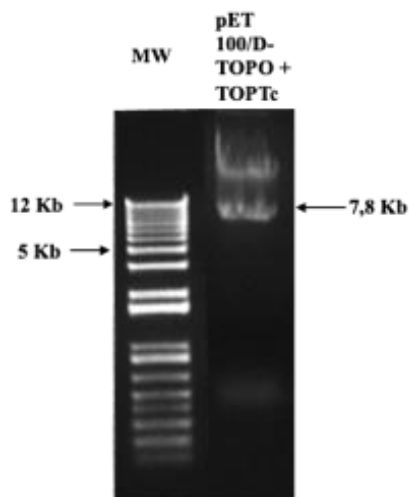


Figura 13: Preparação do DNA plasmidial para expressão heteróloga de rTOPTc. Eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) com resultado da preparação plasmidial realizada com kit PureLink® (ThermoFisher) evidenciando a presença do DNA plasmidial. MW: peso padrão molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). pET100/D-TOPO + TOPTc: plasmídeo contendo 7825 pb clonado em bactérias *E. coli* TOP10 quimicamente competentes e isolado em coluna de troca iônica.

5.8. Expressão de proteína recombinante rTOPTc

A análise de SDS-PAGE foi utilizada para identificar as melhores condições de expressão em *E. coli* BL21 (DE3) e BL21-AI de rTOPTc. Foram comparados os tempos de expressão (4h ou 16h), as concentrações do indutor IPTG (0,1mM ou 0,5mM) e a solubilidade da proteína quando expressa a 20°C. O resultado revelou a presença de uma banda de proteína na faixa correspondente ao tamanho da rTOPTc (79,33 kDa) em todas as condições testadas (Figura 14). Contudo, as bandas apresentaram-se consideravelmente mais espessas nas frações solúveis, sendo que a indução por 16 horas resultou em bandas ainda mais espessas e densas quando comparadas àquelas obtidas em 4h de indução. Não foi observada alteração substancialmente significativa entre as concentrações de IPTG testadas, tendo sido escolhida a concentração de 0,5mM a ser utilizada para os testes subsequentes. Dessa maneira, foi possível padronizar o protocolo para expressão ótima da TOPTc em *E. coli* BL21-AI por 16h com 0,5mM de IPTG e 0,2% arabinose.

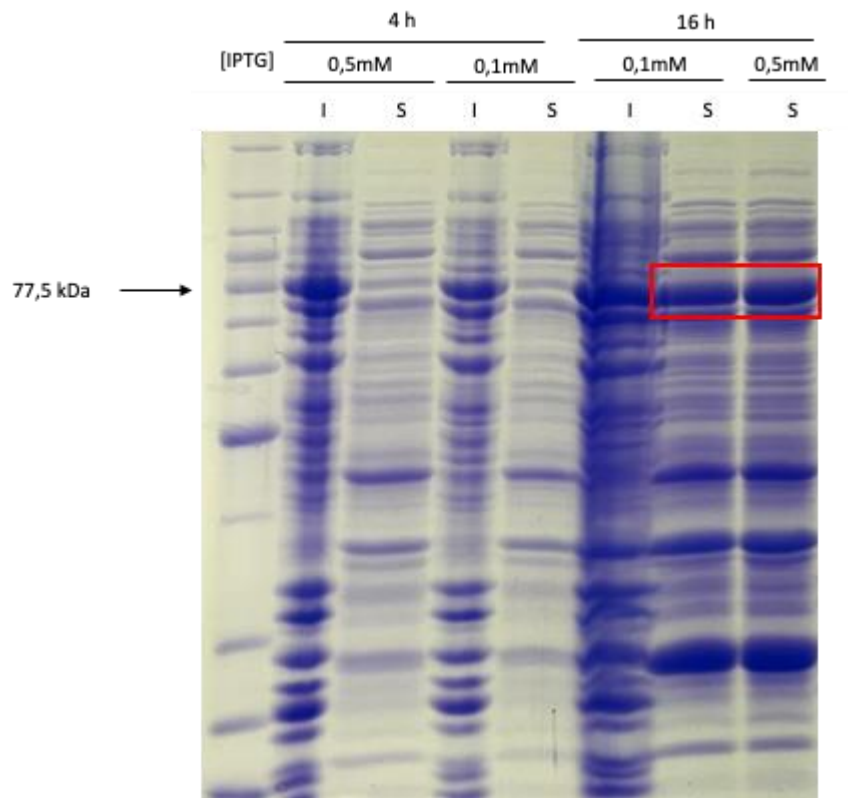


Figura 14: Ensaio de expressão em *E. coli* BL21 (DE3) de rTOPTc. 4h e 6h : duração da indução de expressão recombinante. [IPTG]: concentração de IPTG utilizada para indução de expressão. I : fração insolúvel. S: fração solúvel. Em vermelho estão destacadas as bandas que se apresentaram maior quantidade de proteína, indicando as melhores condições para expressão de rTOPTc.

5.9.Purificação de rTOPTc

Em um primeiro momento, foi testado um protocolo geral para proteínas em que é realizado um aumento progressivo do gradiente de imidazol a fim de retirar as proteínas contaminantes ligadas à resina antes da eluição da proteína de interesse. Este protocolo, que foi realizado a partir da expressão em BL21 (DE3), gerou a eluição precoce da proteína recombinante, resultando em um número grande de frações com proteína em baixa concentração. As frações também continham uma pequena quantidade de contaminante, como se pode observar nas bandas presentes na parte inferior do gel de SDS-PAGE sobretudo nas lavagens com 10 e 15mM de imidazol (Figura 16). A concentração de proteína pura e sem contaminantes presente nas frações de 20mM e 50mM mostradas no gel varia de 0,03mg/ml a 0,04 mg/ml, visto que estão diluídas na proporção de 1:10 a partir das frações originais coletadas na purificação e que foram quantificadas em NanoBio.

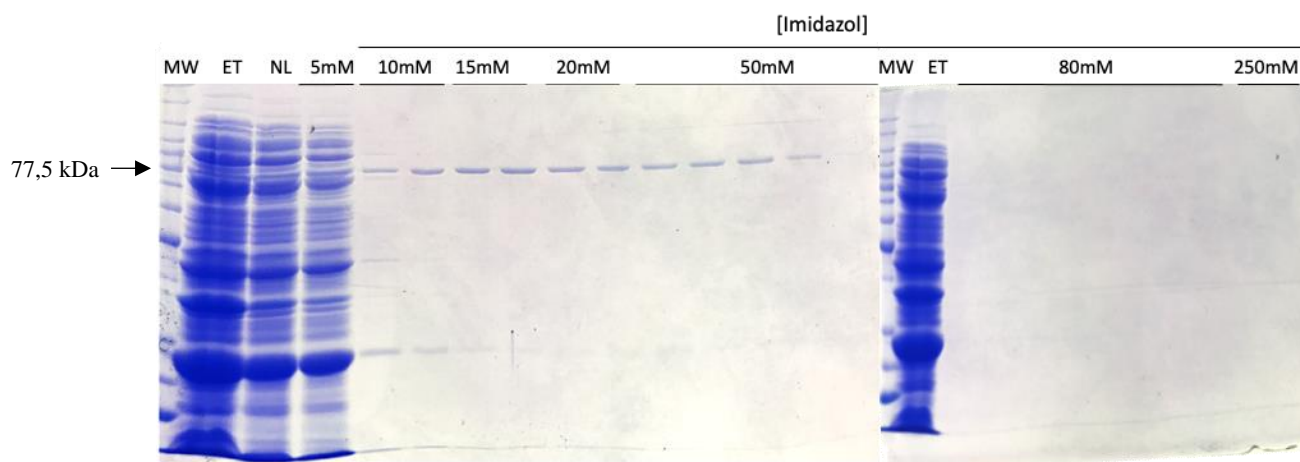


Figura 15: Purificação da rTOPTc expressa em BL21 (DE3) utilizando um gradiente de imidazol para lavagem da resina, partindo de 5mM até 250mM de imidazol. MW: Marcador de peso molecular; ET: Extrato total; NL: fração não-ligada à resina.

Um segundo protocolo utilizando a proteína expressa em BL21-AI™ foi testado sem aumento gradativo das concentrações de imidazol, o que gerou frações muito mais concentradas e puras da proteína de interesse. No segundo protocolo, a proteína recombinante se ligou fortemente à resina, havendo perda muito pequena de proteína recombinante na fração não-ligada. Após a lavagem com 5mM imidazol para retirada dos contaminantes, sucessivas lavagens com *elution buffer* contendo 80mM de imidazol resultaram em frações puras e concentradas de rTOPTc, que continuou a ser eluída com 250mM, concentração designada para a retirada final de proteína restante na resina, conforme Figura 15. O rendimento estimado de rTOPTc para este protocolo foi de 5mg/L. Desta maneira, este segundo protocolo foi o estabelecido como ideal para purificação de rTOPTc, visto que as frações contendo a proteína pura tiveram rendimento e concentrações maiores do que as frações obtidas na purificação anterior.

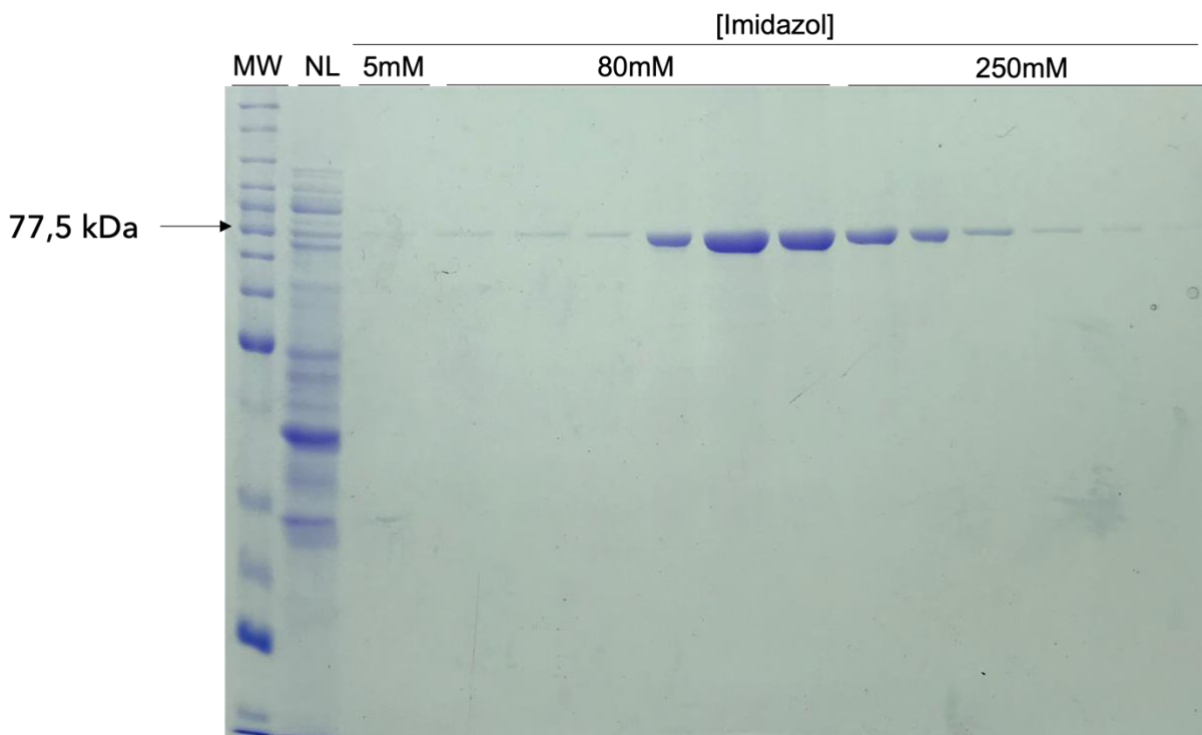


Figura 16: Purificação da rTOPTc expressa em BL21-AI TM com lavagem da resina apenas com 5mM de imidazol antes da eluição. MW: marcador de peso molecular; NL: fração não ligada à resina.

5.10. Reconhecimento de rTOPTc por Western Blot

A fim de certificar que a proteína visualizada nos géis de SDS-PAGE após a purificação correspondia à rTOPTc, e utilizando como controle positivo a proteína recombinante rPOPHs, foi realizada análise por Western-blot com anticorpos Anti-His, que reconhecem a cauda de histidina adicionada à proteína recombinante (Figura 17). Dessa maneira, foi confirmado que a proteína rTOPTc foi devidamente expressa e purificada.

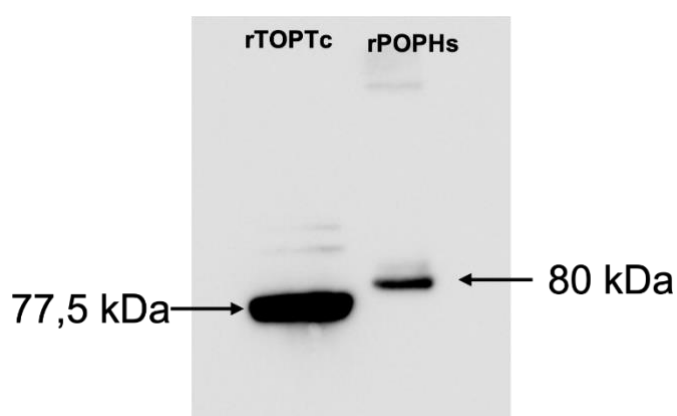


Figura 17: Western-blot da fração de proteína purificada. Foi realizada análise de Western-blot para certificar a presença de cauda de histidina na proteína purificada, confirmando ser a proteína de interesse. rPOPHs foi utilizada como controle positivo.

5.11. Determinação da concentração ótima de enzima para ensaios enzimáticos

A diluição seriada mostrou que a melhor atividade enzimática foi obtida com 1 μg da enzima TOPTc purificada. Quantidades menores que 1 μg resultam em atividade significativamente mais baixa com velocidade de conversão de substrato mais baixa, conforme observado na Figura 18.

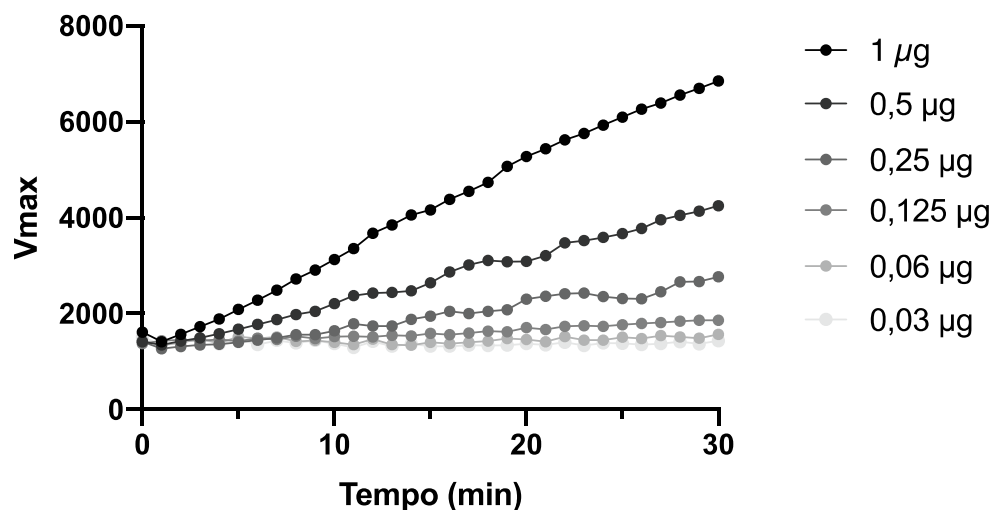


Figura 18: Concentração ótima de enzima a ser utilizada nos testes enzimáticos. Diluição seriada foi realizada utilizando uma enzima purificada na concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. O tampão utilizado foi HEPES 25mM e o substrato Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(2,4-dinitrophenyl)-OH foi utilizado na concentração de 20 μM .

5.12. Caracterização do pH ótimo

A fim de determinar a faixa de pH em que a enzima rTOPTc apresenta melhor atividade, foram realizados testes enzimáticos com o tampão AMT (Ácido acético 50mM, MES 50 mM, Tris 100mM) em diferentes valores de pH, variando entre 4 e 11 (Figura 19). Foi observado um pico de atividade enzimática nos valores de pH compreendidos entre 6 e 7, sendo o pH 6.5 o que permitiu maior atividade enzimática dentre todos, com diferença pequena de atividade para os valores de pH adjacentes 6 e 7. Valores de pH abaixo de 6 e acima de 7 estão associados a diminuição gradativa da atividade enzimática. É importante ressaltar a presença de um leve desvio na queda da atividade nos valores de pH compreendidos entre 7,5 e 8 em todos os testes realizados, demonstrando que a tendência observada na curva é um padrão característico da TOPTc que pode indicar uma mudança na forma da enzima em valores de pH alto.

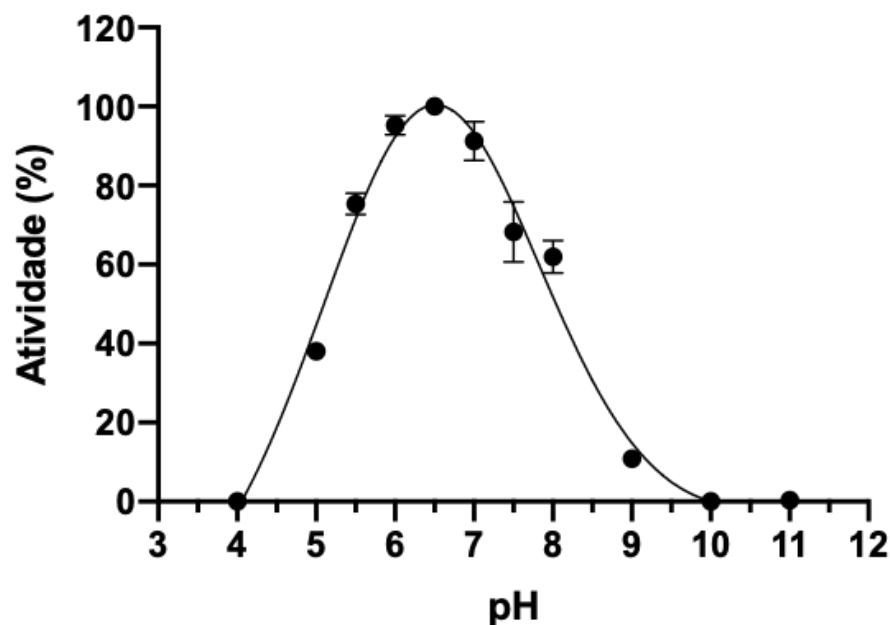


Figura 19: pH ótimo para TOPTc testado com tampão AMT. O teste foi feito em triplicata utilizando 1 μ g da enzima purificada.

5.13. Caracterização do tampão ótimo

Com base nos resultados do teste de avaliação do pH ótimo e nos dados recolhidos da literatura, foram selecionados diferentes tampões cuja faixa de tamponamento abrangem valores de pH neutros a levemente ácidos para serem testados, são eles: MES 50mM, HEPES 50mM, Tris-HCl 25mM e Fosfato Monobásico de Sódio 50mM. A fim de verificar a melhor condição para atividade da enzima, foram realizados testes de atividade enzimática com todos os tampões nos pHs 6, 6,5 e 7 (Figura 20). O tampão associado à maior atividade enzimática foi o Fosfato Monobásico de Sódio em todos os pHs. O tampão fosfato gerou maior atividade da enzima em todos os três pHs testados, sendo que não houve diferença significativa entre o pH 6,5 e 7, confirmando ser o tampão ótimo para testes enzimáticos da TOPTc na faixa de pH entre 6,0 e 7.

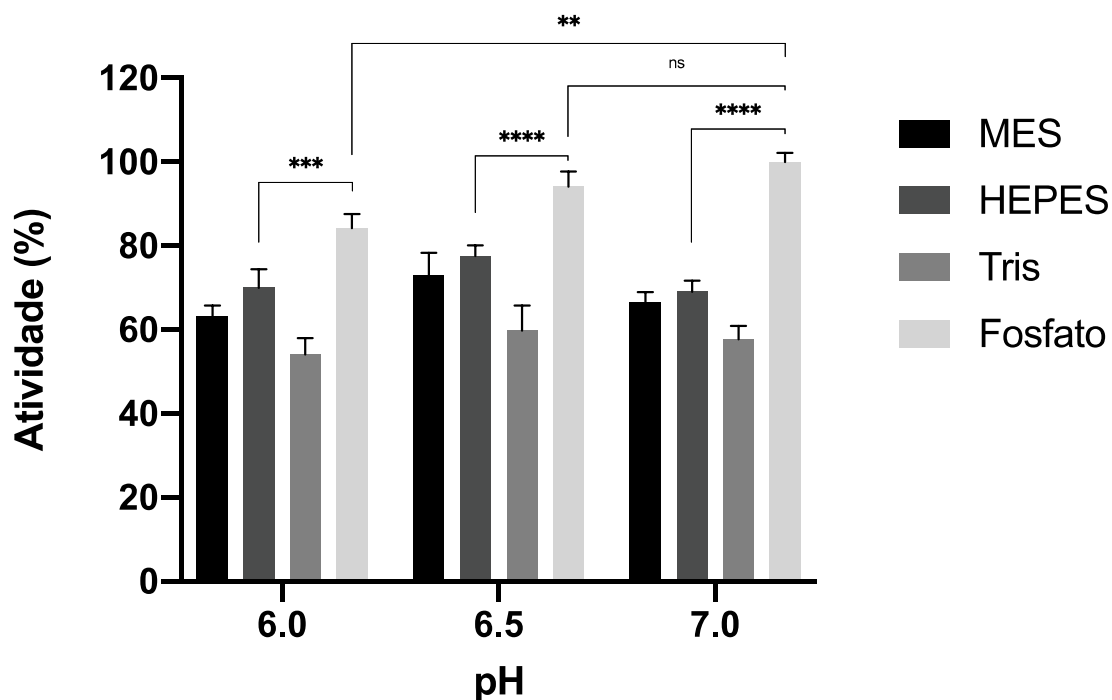


Figura 20: Tampão ótimo para atividade de TOPTc. O gráfico apresenta a porcentagem da atividade considerando como 100% o valor médio das triplicatas de maior valor (fosfato monobásico de sódio pH 7).

5.14. Influência do NaCl na atividade enzimática de TOPTc.

Tendo em vista que o NaCl é utilizado em diversos ensaios de metaloproteases com o intuito de aumentar a atividade enzimática e devido a sua presença no contexto fisiológico, o efeito da adição de diferentes concentrações de NaCl foi testada em um ensaio enzimático utilizando tampão fosfato e a faixa de pH entre 6 e 7, conforme mostrado na Figura 21.

No pH 7, a adição de 150mM e 75mM não gerou diferença significativa de atividade enzimática. Já a adição de 300mM de NaCl no pH 7 reduziu em aproximadamente 25% a atividade da enzima quando comparada à amostra controle. Já nos pHs 6 e 6,5, a atividade enzimática das amostras controle foi significativamente maior do que todas as amostras com NaCl. Houve diferença significativa entre os pHs 6 e 7 para as amostras contendo 150mM de NaCl. As demais concentrações não demonstraram diferença significativa, apesar de o fosfato apresentar uma tendência de aumento da atividade com o aumento do pH, como foi observado no teste de tampão ótimo (Figura 20).

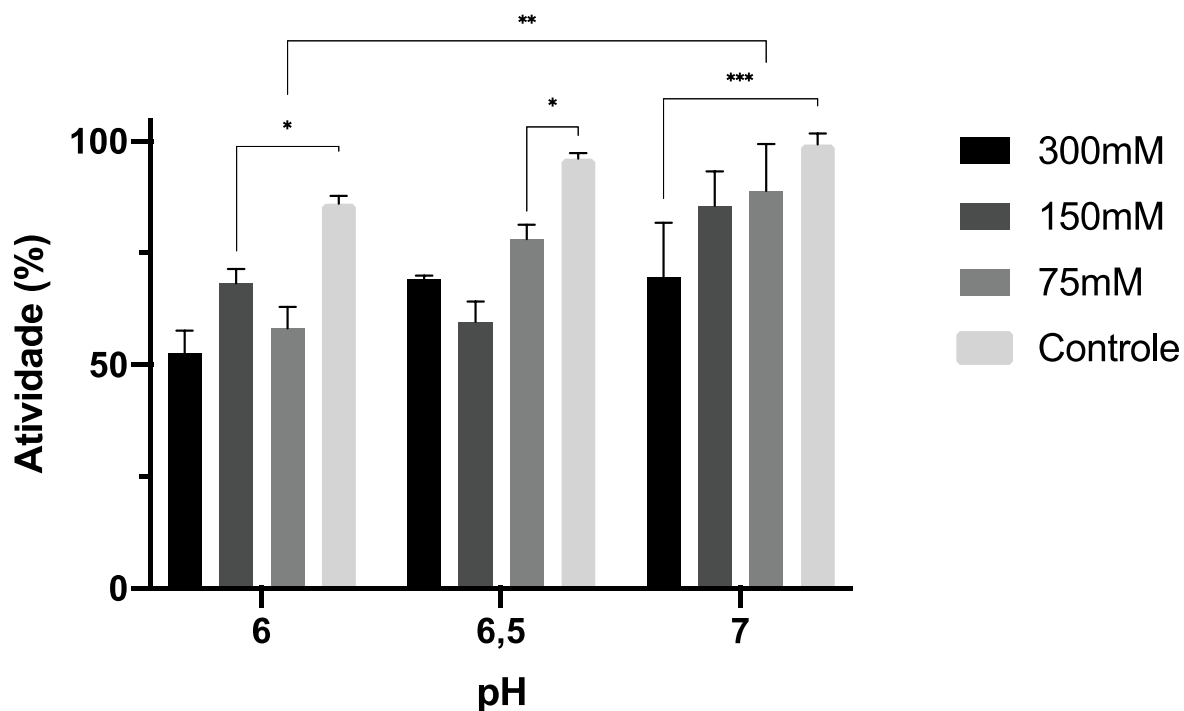


Figura 21: Influência do NaCl na atividade de rTOPTc testada no tampão fosfato nos três diferentes pHs. Estão indicadas apenas as análises que podem gerar duvidam quanto à significância.

5.15. Influência do íon Zn^{2+} na atividade de rTOPTc

Foi possível observar que a adição de $ZnCl_2$ ao tampão fosfato em geral aumenta a atividade da rTOPTc. As concentrações na faixa de 10^{-3} M (mM) não apresentaram diferença significativa entre os pontos testados (1mM e 5mM). Contudo, houve diferença significativa entre a atividade enzimática obtida nas faixas de 10^{-6} M (μ M), tanto para 1 μ M de zinco quanto para 5 μ M, sendo que 5 μ M aumentou em aproximadamente 300% a atividade enzimática quando comparada com o controle, conforme Figura 22.

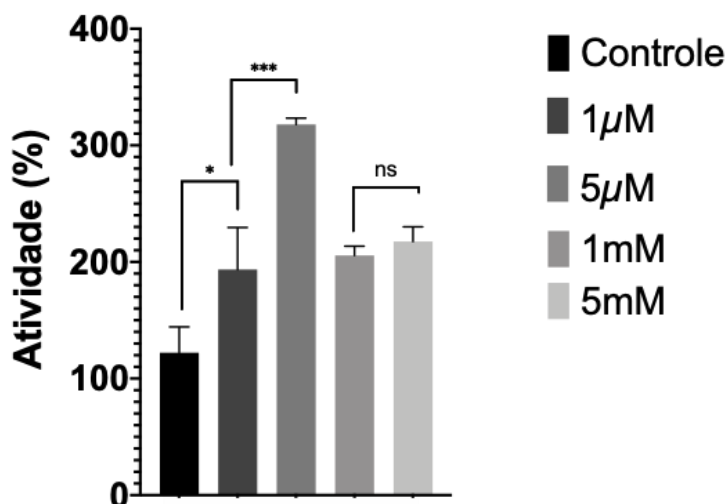


Figura 22: Influência do íon Zn²⁺ na atividade da rTOPTc. Controle: Tampão fosfato sem adição de ZnCl₂, considerado como 100%. 1µM, 5µM, 1mM, 5mM: concentração de ZnCl₂ adicionada ao tampão fosfato para a realização do teste.

5.16. Influência da temperatura na atividade enzimática de rTOPTc.

A temperatura ótima para a atividade da enzima foi testada com o tampão fosfato pH 7. A atividade enzimática se mostrou estável entre as temperaturas de 25°C a 50°C, apresentando um leve pico na temperatura de 37 °C e se mantendo sem variações significativas até 50 °C. A atividade enzimática sofreu um decaimento significativo a partir dos 60°C, que se manteve próximo do nulo para as temperaturas de 70°C e 80°C.

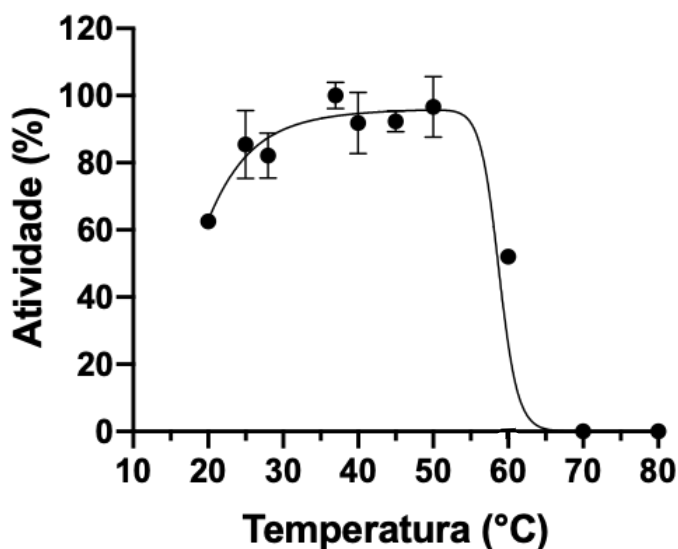


Figura 23: Influência da temperatura na atividade da rTOPTc. Foi utilizado o tampão fosfato pH 7 para testar a eficiência catalítica da enzima após incubação nas temperaturas de 20 a 80°C.

5.17. Estabilidade de armazenamento

Foi observado que a amostra rTOPTc permaneceu ativa por pelo menos 3 semanas quando armazenada a 4°C, tendo sua atividade diminuída para aproximadamente 70% da atividade inicial após 21 dias. Contudo, as amostras armazenadas em congelador (-20°C) tiveram a atividade enzimática significativamente diminuídas após 1h nessa temperatura. As amostras tratadas com glicerol permaneceram ativas após os 21 dias, porém com apenas 30% da atividade observada quando a enzima foi mantida a 4°C. Já as amostras que não foram mantidas com glicerol, apesar de apresentarem uma tendência de maior atividade, não significativa, porém, após 1h mantidas no congelador, não foram capazes de manter essa mesma atividade ao longo dos 21 dias como foi observado naquelas conservadas no glicerol, e apresentaram declínio significativo da atividade para próximo de 0 já após 7 dias da purificação, conforme mostrado na Figura 24.

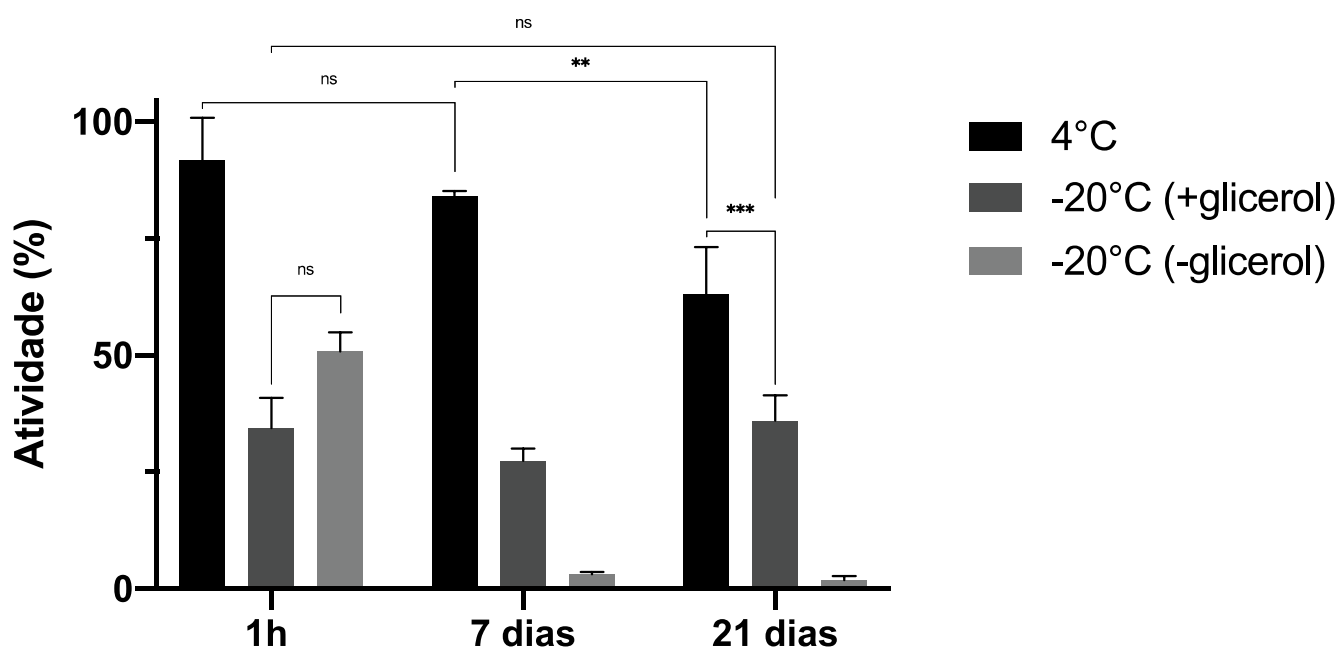


Figura 24: Estabilidade de armazenamento da rTOPTc ao longo de 21 dias. Uma mesma alíquota da purificação foi fracionada e armazenada em diferentes condições (com ou sem glicerol) e temperaturas por 1h, 7 dias ou 21 dias.

5.18. Influência do BSA na atividade enzimática de rTOPTc

Com base no observado na Figura 25, a adição de BSA no momento do teste pode levar a um aumento de aproximadamente 250% na atividade enzimática tanto para a enzima pura quanto para a enzima que já havia sido previamente armazenada com BSA, ambas mantidas a 4°C. A presença do BSA apenas durante o armazenamento e não no momento do teste gerou um acréscimo de

aproximadamente 50% da atividade quando comparada à enzima não tratada com BSA em nenhum momento.

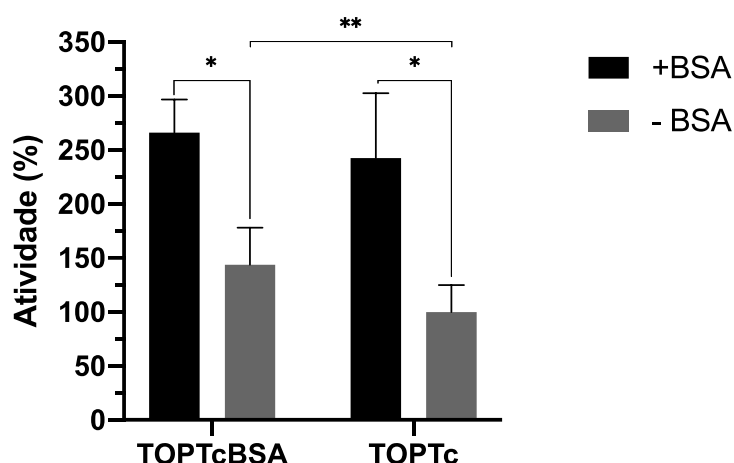


Figura 25: Influência do BSA na atividade da rTOPTc. TOPTcBSA: amostra de rTOPTc purificada armazenada com 0,1mg/mL de BSA em geladeira (4°C). TOPTc: amostra de rTOPTc não armazenada com BSA. -BSA: testes não realizados com adição de 0,1mg/mL de BSA. +BSA: adição de 0,1mg/mL de BSA no momento do teste.

5.19. Efeito de inibidores de proteases

Foram testados quatro inibidores, sendo que apenas a fenantrolina inibiu a atividade da rTOPTc. O agente quelante EDTA, por sua vez, aumentou a sua atividade, tanto na concentração de 1mM quanto de 10mM, conforme mostrado na Figura 26. Foram testadas também, duas concentrações de DTT que geraram uma leve queda da atividade quando comparada com o controle, conforme demonstrado na Figura 27.

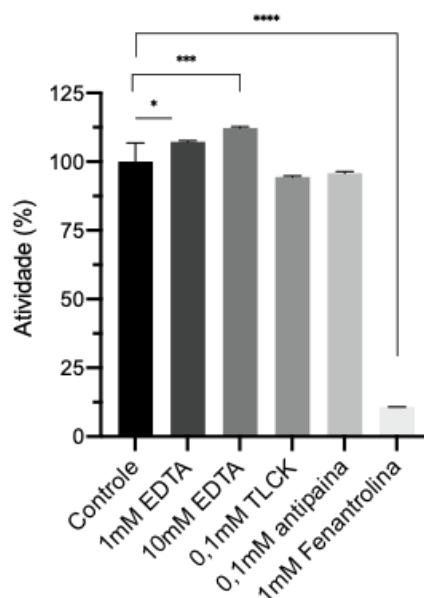


Figura 26: Efeito de inibidores de proteases na atividade de rTOPTc. Controle: rTOPTc sem adição de inibidores considerada como 100%.

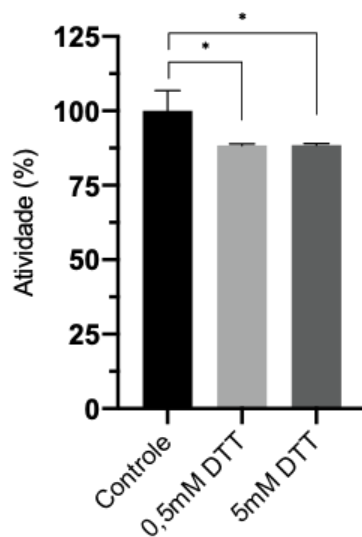


Figura 27: Efeito do DTT na atividade de rTOPTc. Controle: atividade de rTOPTc sem adição de DTT.

5.20. Testes de inibição

O IC₅₀ (concentração de fenantrolina capaz de inibir a atividade da enzima em 50%) foi calculado em 0,372 mM. Já o inibidor específico de TOP Cpp-Ala-Ala-Phe-pAb tem um IC₅₀ de 54,29 nM, conforme demonstrado na Figura 28.

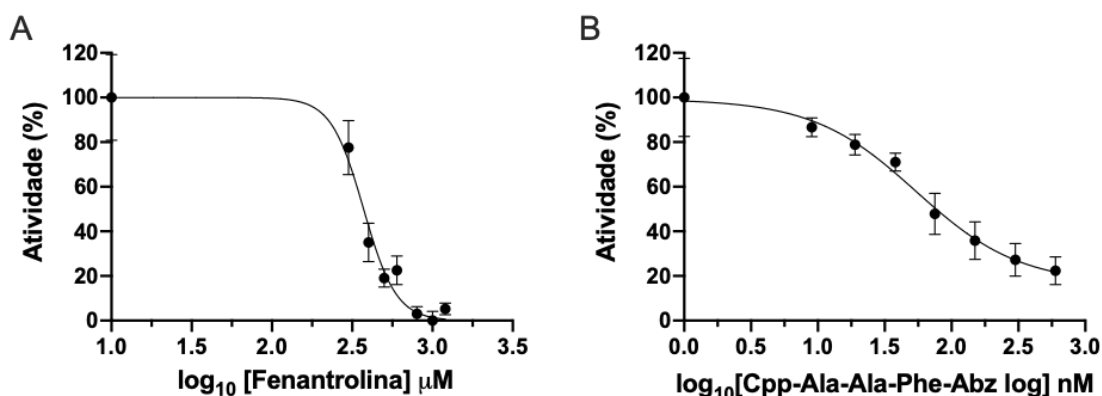


Figura 28: IC₅₀ do inibidor de metaloproteases fenantrolina (A) e do inibidor de TOP Cpp-Ala-Ala-Phe-Abz (B). Cinética e bioquímica – K_m

O K_m da rTOPTc para o substrato Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(Dnp) foi de 24,89 μM e o V_{max} de 471,0 mFU/min (Figura 29).

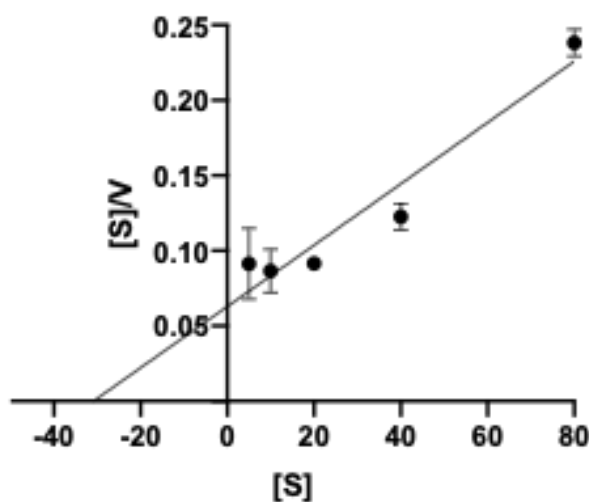


Figura 29: Atividade de rTOPTc segundo plot de Hanes-Woolf. Foram testadas diferentes concentrações do substrato (20 a 80mM) diluído no tampão fosfato monobásico de sódio 50mM pH 7 com uma concentração final de enzima de 1 μ g.

5.21. Predição de estrutura secundária

A predição de estrutura secundária de aminoácidos indica a presença de uma pequena região de desordem na porção C-terminal da proteína, o que é normal para as regiões iniciais. A estrutura conta com 28 α -hélices e 12 folhas β (Figura 30). É possível observar que o sítio de ligação ao zinco (sítio catalítico) se encontra em uma estrutura de α -hélice que não fica exposta na superfície, mas sim escondida na estrutura da proteína (Figura 30), provavelmente em forma de fenda como descrito na literatura. Além disso, é possível observar a presença de resíduos de cisteína enterrados na estrutura, muitos não estando disponíveis para formar pontes dissulfeto entre outras proteínas, mas apenas no interior da estrutura da proteína.

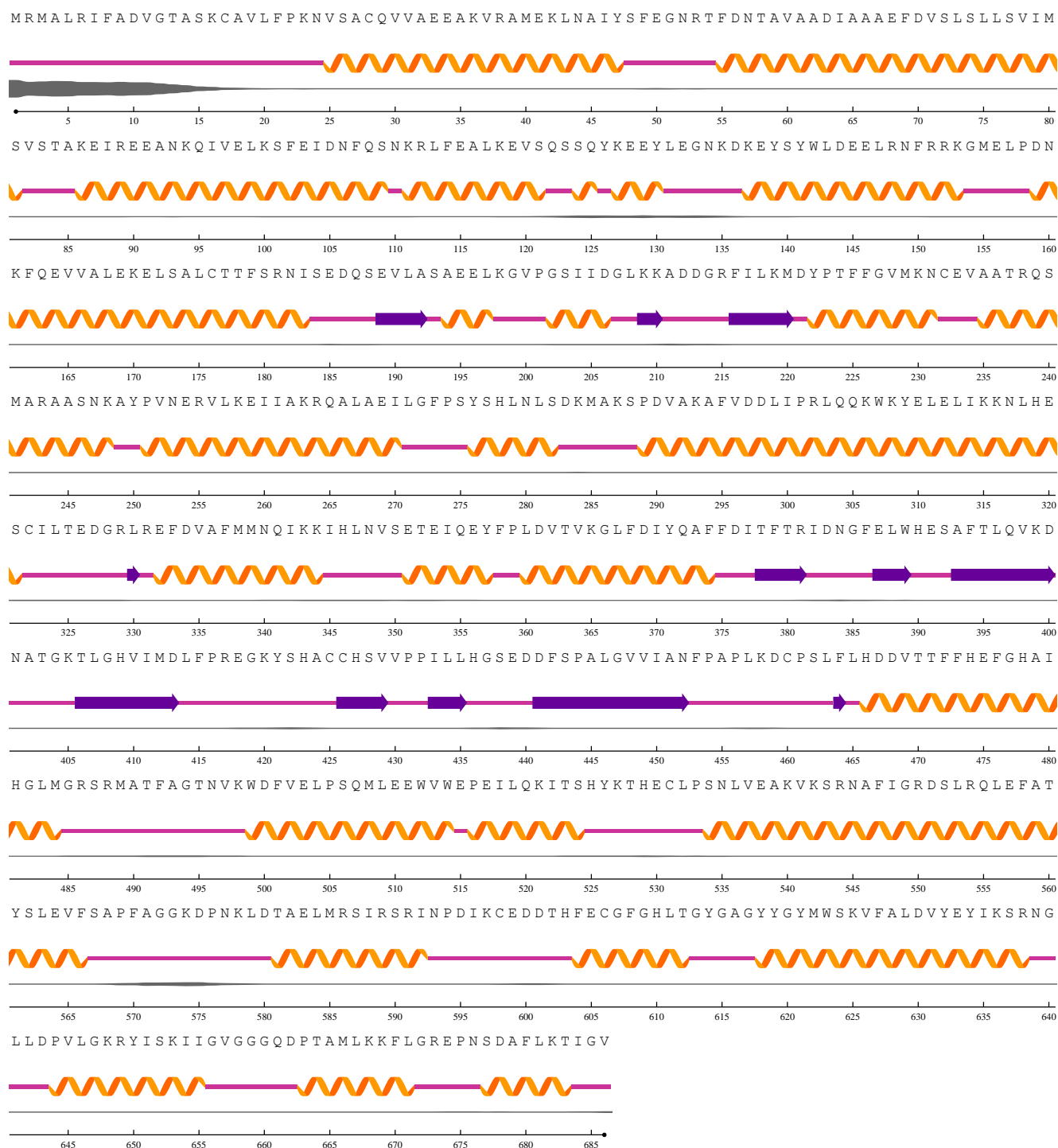


Figura 30: Predição da estrutura secundária da TOPTc a partir da sequência primária no servidor NetSurfP2.0. Na imagem, as voltas laranjas indicam regiões/regiões de predição de α -hélice, as setas roxas, folhas β , as linhas vermelhas, exposição a superfícies, as linhas azuis, não-exposição a superfícies e as linhas cinzas, o nível de desordem dos resíduos (quanto mais desordem, maior a espessura da linha).

5.22. Composição aminoacídica

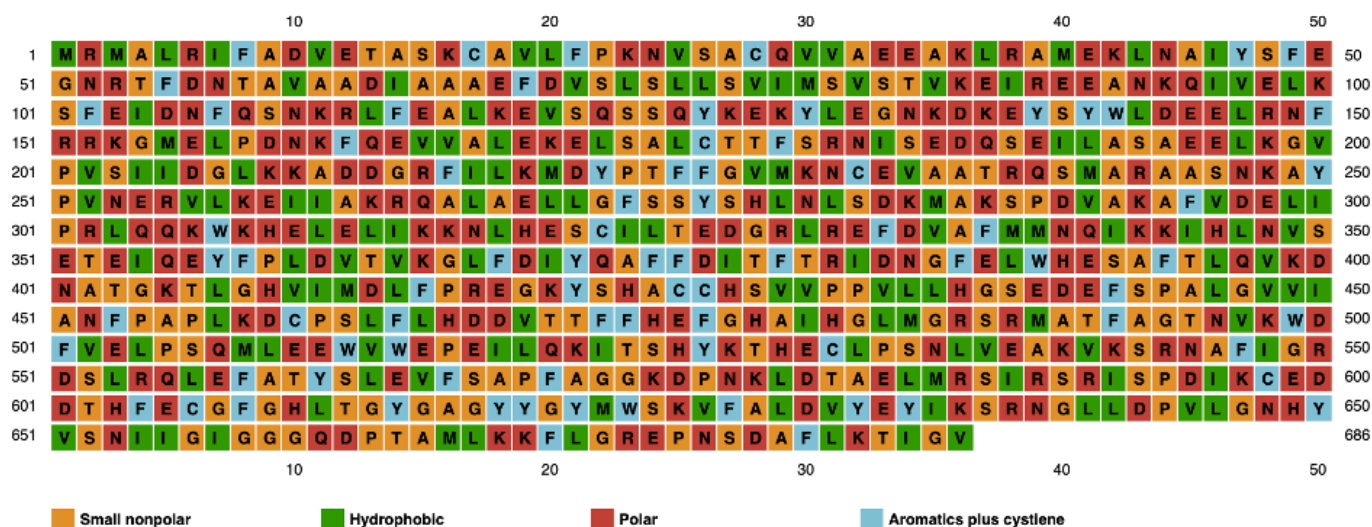


Figura 31: Composição aminoacídica da TOPTc. Resíduos identificados em laranja correspondem a aminoácidos pequenos e apolares. Resíduos pintados de verde correspondem a aminoácidos hidrofóbicos. Resíduos coloridos de vermelho representam aminoácidos polares e resíduos azuis correspondem a resíduos aromáticos e a cisteína.

5.23. Modelagem tridimensional

Utilizando os servidores AlphaFold, Swiss-Model, trRosetta e I-TASSER, foram obtidos 4 modelos de TOPTc que foram refinados, gerando, assim, 8 modelos no total, os quais foram comparados de acordo com os parâmetros estabelecidos, conforme tabela 3. Os parâmetros analisados mostraram que os modelos refinados, em geral, apresentaram qualidade menor, tendo sido descartados nas análises posteriores. Os modelos escolhidos estão mostrados na Figura 32.

O modelo gerado pelo Swiss-Model utilizou como molde a estrutura 3D da Thimet Oligopeptidase humana, (PDB 1s4b.1.A), que apresenta 36,31% de identidade de sequência, 78% de cobertura, QMEAN de 0,69 e GMQR igual 0,61. Após ser submetido ao servidor MolProbity, resultou em ClashScore de 5,96, Ramachandran Favored de 94,79% e MolProbity Score de 1,15. Já o modelo refinado apresentou clashscore de 6,54, Ramachandran favored de 98,54 e MolProbity Score de 1,36.

O servidor I-TASSER gerou uma estrutura secundária predita em que as regiões da proteína são separadas em C (Coil) e H (Hélice). O modelo original gerado pelo I-Tasser a partir da sequência primária da proteína apresentou ClashScore de 9,39, Ramachandran Favored de 97,36% e Mol Probity Score de 1,62. Já o modelo refinado obteve um ClashScore de 6,44, Ramachandran Favored de 96,64% e MolProbity Score de 1,57, apresentando um resultado melhor do que o não refinado.

O modelo original gerado pelo trRosetta obteve um ClashScore de 4,33, Ramachandran Favored de 95,91% e Molprobability Score de 1,49. Já o modelo refinado gerou um ClashScore de 7,91, Ramachandran Favored de 97,22% e MolProbability score de 1,57. O modelo da TOPTc disponibilizado na base de dados do servidor AlphaFold apresentou alto grau de confiabilidade em quase toda a proteína, com exceção da região N-terminal, que obteve *per-residue confidence score* (pLDDT) < 90. O clashscore do AlphaFold foi 2,48, Ramachandran Favored 97,37% e MolProbability score de 1,15.

O modelo do I-TASSER foi o único que apresentou uma melhora nos parâmetros de qualidade quando foi refinado, enquanto os demais refinados foram descartados. Utilizando o servidor Swiss-Model, foi obtido um modelo utilizando o PDB molde 1S4b, da TOPHs, que possui identidade de sequência de 36,31% e cobertura de 78%. De acordo com os parâmetros de qualidade gerados pelo MolProbability, o modelo gerado pelo AlphaFold parece ser o melhor modelo de estrutura tridimensional da TOPTc, possuindo o menor MolProbability Score e o melhor Ramachandran Favored, conforme mostrado na Figura 32.

Tabela 3: Parâmetros de qualidade dos modelos analisados da TOPTc. Valores em porcentagem mais próximos de 100% indicam boa qualidade do modelo.

Servidor	ClashScore	Ramachandran Favored	MolProbability Score
AlphaFold	2,48	97,37%	1,15
SwissModel	5,96	94,70%	1,69
iTasser	9,76	87,72%	3,02
trRosetta	4,33	95,91%	1,49

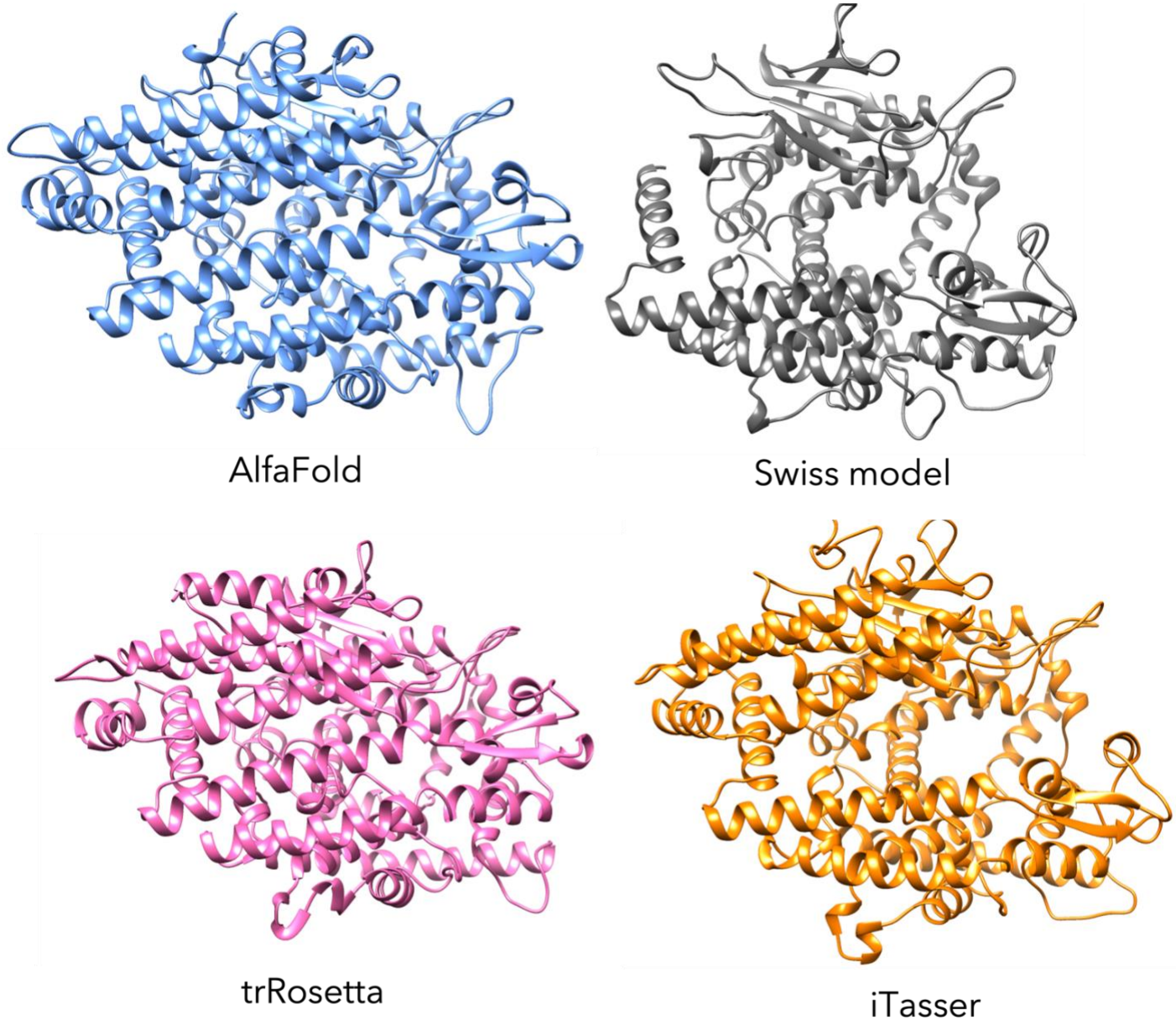


Figura 32: Modelos tridimensionais da estrutura de TOPTc realizada nos diferentes servidores

A sobreposição dos modelos mostrou que todos apresentam estruturas globais semelhantes, com algumas diferenças nas regiões de maior mobilidade como loops, conforme mostrado na Figura 33.

O alinhamento da estrutura da TOPTc obtida pelo servidor AlphaFold com a estrutura resolvida experimentalmente da Thimet Oligopeptidase de *Homo sapiens* (TOPHs), mostrou que a conformação dos aminoácidos que formam o domínio catalítico de ambas as estruturas se sobrepõem.

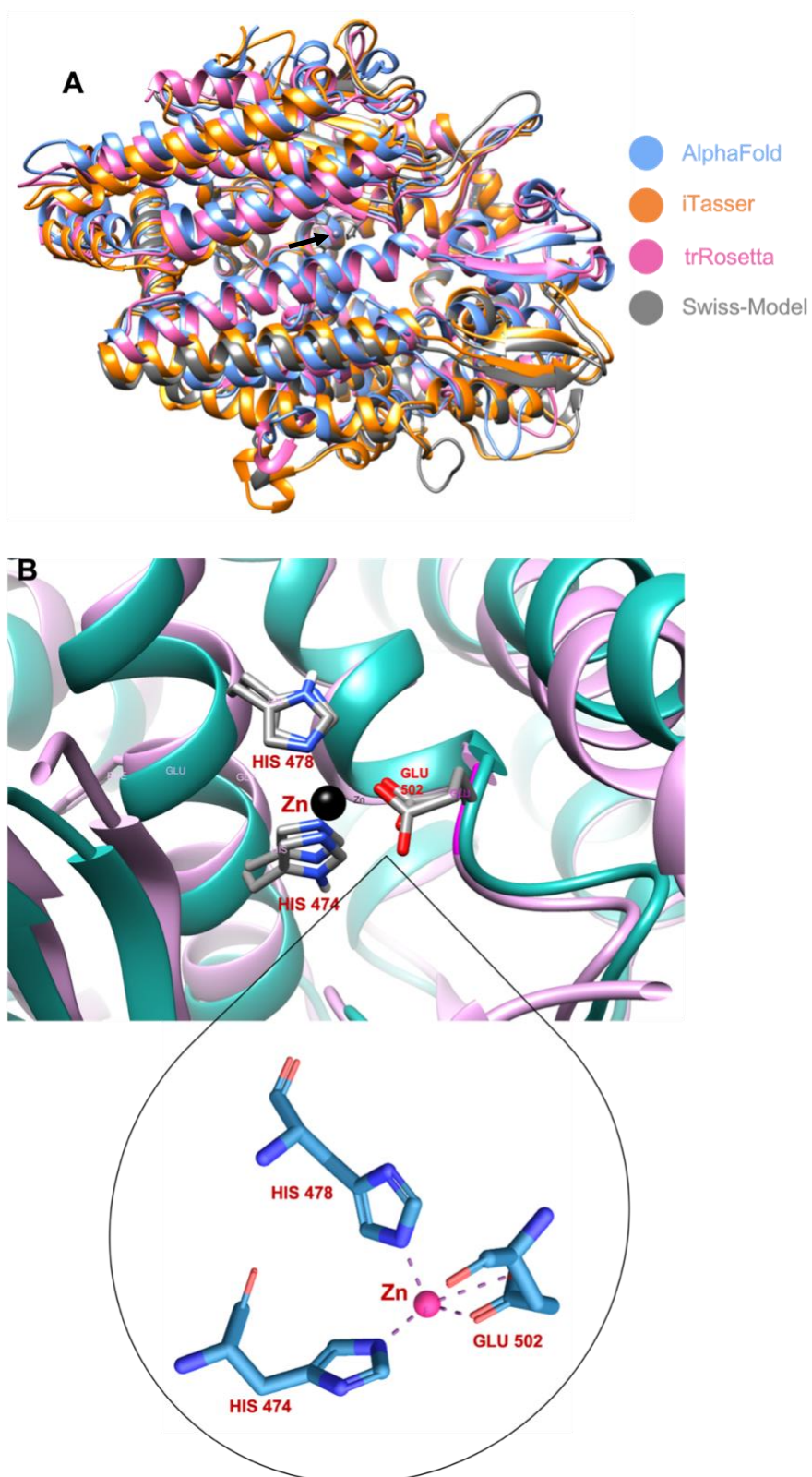


Figura 33: Alinhamento das estruturas de TOPTc previstas pelos diferentes servidores. (A): Alinhamento da estrutura tridimensional dos 4 modelos analisados. A seta preta indica o íon zinco, presente no sítio ativo (B): Alinhamento da tríade catalítica no modelo AlphaFold (verde) com o modelo cristalizado (PDB 1s4b). A figura mostra os aminoácidos His 474, His 475 e Glu 500, que formam a tríade catalítica, se ligando ao zinco.

5.24. Árvore filogenética

Após a seleção de algumas sequências de proteínas da mesma família ou de espécies diferentes, foi elaborada uma árvore filogenética a fim de identificar a proximidade evolutiva entre as diferentes espécies, mostrada na Figura 34. Observa-se, portanto, que pode haver um certo grau de proximidade da TOPTc com metalopeptidases de bactérias termofílicas e archeas, o que precisa ser melhor investigado, uma vez que poderiam apontar a presença de características peculiares de adaptação a condições extremas.

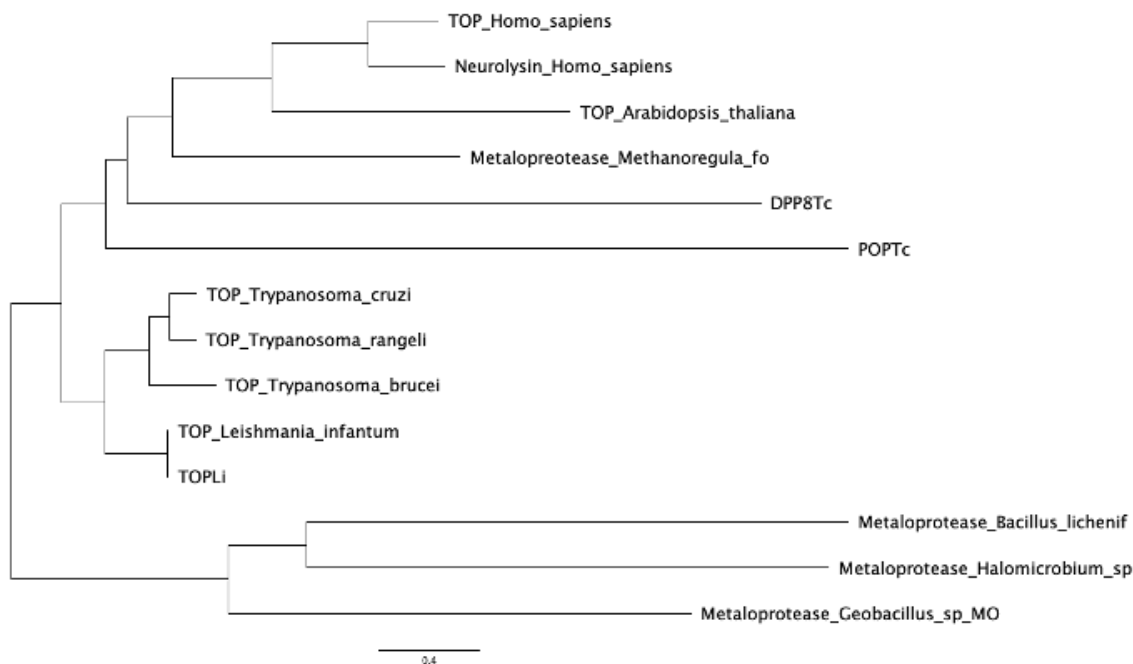


Figura 34: Árvore filogenética gerada a partir do alinhamento realizado com a sequência primária de Thimet Oligopeptidase ou membros próximos da família de diversas espécies.

5.25. Imunocitocalização

Os parasitos epimastigotas fixados com formaldeído foram marcados com DAPI e Alexa Fluor 488. É possível observar que as imagens tratadas com o soro pré-imune não apresentam marcação de Alexa Fluor, o que demonstra a ausência de anticorpos anti-rTOPTc em camundongos não imunizados com a rTOPTc. Em contrapartida, o soro dos camundongos imunizados gerou marcação significativa dos parasitos de forma bastante concentrada na região próxima ao bolso flagelar, sugerindo a sublocalização da TOPTc nesse compartimento celular.

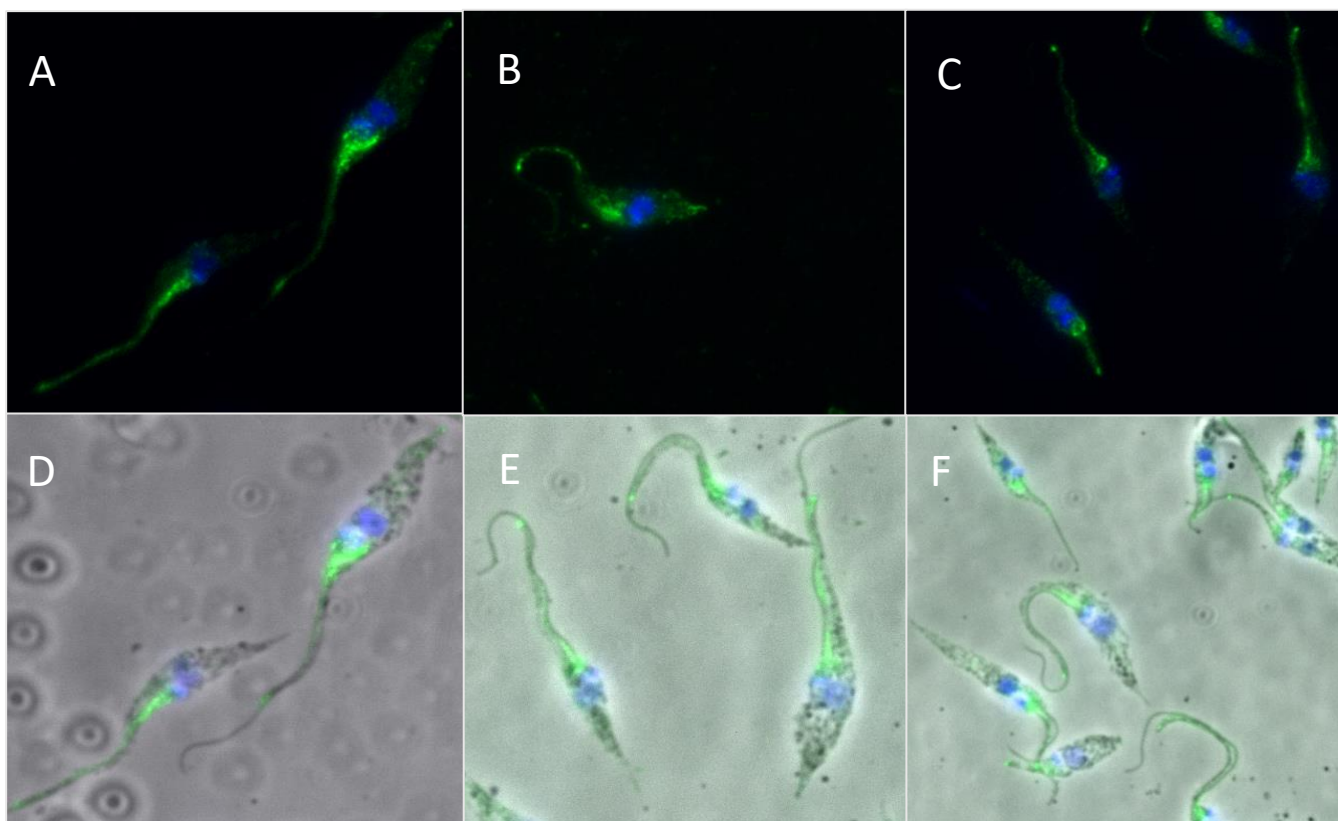


Figura 35: Imunocitocalização da TOPTc em parasitos epimastigotas. Azul: DAPI, cora o núcleo celular. Verde: marcação da proteína TOPTc. A, B, C: imagens adquiridas no modo de fluorescência. D, E, F: visualização da fluorescência sobreposta à imagem adquirida do campo claro.

6. DISCUSSÃO

Previamente conhecida como Pz-peptidase, endooligopeptidase A e metaloendopeptidase solúvel, a TOP demonstra ter um amplo espectro de atividades nos mais diversos processos fisiológicos e biológicos de muitas espécies. A TOP tem um papel importante no processamento e catabolismo de uma variedade de peptídeos biologicamente ativos, incluindo precursores de encefalinas, bradiginina, luliberina e neurotensina. Ultimamente, foi identificada uma metaloproteinase dependente de tiol com 32 resíduos idênticos ao da TOP humana purificada de cérebro de portadores de Alzheimer, mostrando que a enzima degrada proteína precursora de β -amiloide e gera fragmentos amiloidogênicos (YAMIN et al., 1999). Apesar de a enzima não ser uma metaloproteinase de matriz extracelular, também existem evidências de que ela participa de forma limitada nos estágios finais de degradação dos produtos derivados do processamento do colágeno (Tisljar, 1993).

Muitas proteínas de tripanossomatídeos ainda precisam ser estudadas para que se alcance um melhor entendimento da ação de protozoários no estabelecimento das doenças negligenciadas, a fim de que se combatam mais eficazmente enfermidades como a doença de Chagas. Neste contexto, torna-se imprescindível o estudo de proteases como a TOPTc, que foi encontrada em estudos de proteoma e exoproteoma de forma bastante expressiva (Mandacaru et al., 2019; Queiroz et al., 2014), indicando ser exportada para o meio extracelular, o que demonstra sua importância para o parasito e uma provável interação com o hospedeiro. Ainda assim, pouco se sabe atualmente a respeito da função dessa protease no parasito e qual seria sua importância na relação com o hospedeiro.

Como é sabido que a função de uma proteína está intimamente ligada às suas características físico-químicas, foi proposta a caracterização da proteína TOPTc como forma de obtermos um melhor entendimento de suas funções e propriedades para posterior investigação de sua possível relação com processos fisiológicos ou patogênicos. A análise *in ilico* dos parâmetros e características já descritas dessa proteína em outras espécies se mostraram semelhantes em *T. cruzi*: a TOPTc é uma metalopeptidase que possui um único domínio conhecido, de ligação ao íon zinco que é necessário para sua atividade, característico de metalopeptidases conforme Figura 12 (TISLJAR, 1993).

A TOPTc não apresenta nenhum domínio transmembrana, conforme predição mostrada na Figura 8, o que é compatível com o descrito na literatura para TOP de humanos, de acordo com a sua estrutura cristalizada depositada no PDB (Ray et al., 2004). A presença de, no mínimo, um domínio transmembrana, é a característica estrutural determinante para classificar uma proteína como proteína de membrana. Essas regiões são, normalmente, porções de aminoácidos hidrofóbicos que se organizam

como α -hélices e ocupam a bicamada lipídica (Guna & Hegde, 2018), o que não é observado na estrutura da TOPTc, conforme mostrado nas figuras 32 e 33.

Modificações pós-transcricionais de diversos tipos podem acontecer em proteínas com a participação de diversos grupos químicos. Proteínas que se encontram na superfície celular apresentam, em muitos casos, uma âncora de glicosilfosfatidil Inositol- 66 - (GPI), um lipídeo adicionado à proteína como uma modificação lipídica pós-traducional que, portanto, não faz parte da estrutura da proteína como acontece nos domínios transmembrana (Kinoshita, 2016). A adição da cauda GPI é a modificação lipídica pós traducional mais bem caracterizada que ocorre no retículo endoplasmático. Após a adição da cauda, a proteína trafega através da via secretora para a superfície celular, onde a cauda GPI ancora a proteína à face extracelular da membrana plasmática.

A ausência da cauda GPI e do domínio transmembrana na estrutura da TOPTc nos leva a inferir que a enzima não se encontra na membrana, ainda que possa trafegar entre elas eventualmente e até mesmo ser secretada por mecanismos não convencionais de exossomos e microvesículas, por exemplo. Contudo, existem outras modificações que englobam a adição ou remoção de grupamentos lipídicos a resíduos específicos de aminoácidos que também possuem o papel de determinar o destino e a localização de uma proteína na célula. Dentre as modificações lipídicas mais importantes, destacam-se a palmitoilação, a prenilação e a miristoilação. Tais modificações são importantes no tráfego intracelular dessas proteínas, na sinalização celular, bem como na associação dessas proteínas à membrana plasmática. Na TOPTc, foram encontrados 3 resíduos de cisteína que podem configurar sítios de S-palmitoilação, conforme Figura 10.

A S-palmitoilação ocorre na superfície citoplasmática de membranas e consiste na ligação tio-éster da cisteína de uma proteína ao ácido graxo palmitato de forma reversível. Uma proteína pode sofrer diferentes ciclos de palmitoilação e depalmitoilação, tanto constitutivamente quanto em resposta a sinais (Smotrys & Linder, 2004).

A palmitoilação não requer presença de nenhuma sequência ou assinatura específica para ocorrer, a não ser um resíduo de cisteína. As proteínas palmitoiladas podem ser subdivididas entre proteínas que são sintetizadas em ribossomos livres que se associam periféricamente a membranas, e as proteínas que contêm domínios transmembrana. A palmitoilação é frequentemente encontrada adjacente à outra modificação lipídica, sendo esta uma característica de diversas proteínas transdutoras de sinal. Como exemplo, podemos citar as proteínas G, em que a palmitoilação é encontrada adjacente a sítio de miristoilação; e as proteínas Ras e Rab, cujo sítio de palmitoilação é adjacente a sítios de farnesilação (Nadolski & Linder, 2007). Os sítios de palmitoilação de proteínas cuja única modificação

é a palmitoilação são encontradas em proteínas muitas vezes em pares ou *stretches* longos de resíduos de cisteínas próximas entre si. Proteínas com domínios transmembranas são frequentemente modificadas em resíduos de cisteína na interface do citoplasma e da membrana ou nas caudas C-terminais (Nadolski & Linder, 2007).

A palmitoilação pode exercer diversas funções, sendo a sua principal o aumento da afinidade de uma proteína solúvel pela membrana, o que pode afetar a sua localização e sua função (Nadolski & Linder, 2007), como ocorre na proteína Wnt, em que a S-palmitoilação é necessária para a sua correta sinalização celular (Smotrys & Linder, 2004). Com isso, torna-se imprescindível a posterior investigação dessa modificação na TOPTc, a fim de averiguar os possíveis papéis da proteína e sua participação nos mais diversos processos celulares, seja de sinalização, de tráfego ou ligação à membrana.

Um outro mecanismo importante para entender a localização da proteína é a presença de peptídeo sinal, uma pequena sequência de aminoácidos que endereça a proteína aos diversos compartimentos celulares. Analisando o resultado da predição de peptídeo sinal mostrada na Figura 11, a TOPTc possui apenas 0,19% de probabilidade de possuir peptídeo sinal e 99,81% de não o possuir. Dessa maneira, apenas com o dado da predição não se poderia deduzir que a TOPTc seja destinada a um compartimento celular específico. Contudo, é sabido que a enzima é, de fato, secretada pelo parasito, como já foi demonstrado por estudos de secretoma (Mandacaru et al., 2019; Queiroz et al., 2014). As imagens de imunofluorescência apresentadas na Figura 35 corroboram esse fato, uma vez que mostram uma clara predominância de TOP localizada na bolsa flagelar, compartimento celular de intensa liberação de moléculas para o meio externo.

Sabendo-se que o único domínio conhecido da TOPTc é o domínio de zinco catalítico, que a enzima não possui cauda GPI, mas 3 sítios de possível palmitoilação que podem estar associados à uma possível localização na membrana, e levando em conta que a proteína não apresenta peptídeo sinal que a destine a um compartimento específico, faz-se necessário investigar as características físico-químicas e bioquímicas da enzima a fim de caracterizá-la quanto à atividade ótima, substratos, inibidores e condições ideais de atividade.

Para a expressão da proteína, foram testados dois diferentes protocolos, que mesmo tendo ambos gerado a proteína na forma solúvel no citoplasma, demonstraram diferença na quantidade de proteína expressa. O tempo de indução foi o maior contribuinte para o aumento da expressão proteica, tendo sido observadas bandas consideravelmente maiores nas amostras de 16h de indução, contrariando os trabalhos já publicados que utilizam tempos menores, variando de 4h a 7h de indução

(Duzzi, 2014; Niemirowicz et al., 2007; Philibert et al., 2014). Já a variação da concentração de IPTG de 0,1mM para 0,5mM, valores que foram encontrados na literatura para expressão de TOP recombinante em diferentes cepas de *E. coli* (Duzzi, 2014; Niemirowicz et al., 2007; Philibert et al., 2014), não contribuiu substancialmente para o aumento da expressão em ambos os tempos. No que diz respeito à temperatura, a literatura mostra que a expressão da TOP é induzida sempre em temperaturas abaixo de 37°C, podendo variar de 16°C até 30°C, porém em tempos menores do que 10h (Duzzi, 2014; Niemirowicz et al., 2007; Philibert et al., 2014). Dessa forma, foi escolhido o protocolo de indução da expressão da TOPTc utilizando 0,1mM de IPTG durante 16h a 20°C, que resultou em uma concentração ótima de rTOPTc para ser utilizada nos próximos experimentos.

Para a purificação da TOPTc, utilizou-se, inicialmente, um protocolo de aumento da concentração de imidazol na coluna de forma gradativa, saindo de lavagens da resina com 5mM até chegar nas eluições a 80mM e 250mM. Porém, essa metodologia gerou a eluição precoce da proteína em baixas concentrações de imidazol, produzindo muitas frações pouco concentradas de proteína purificada. A fim de produzir frações mais concentradas de rTOPTc purificada, foram utilizadas, no lugar de BL21 (DE3), células *E. coli* BL-21Ai que são especializadas em produzir proteínas tóxicas para a célula e tendem a produzir uma quantidade maior de proteínas recombinantes. Além disso, o gradiente de imidazol foi removido e adotada uma única lavagem da resina antes da eluição, conforme demonstrado na literatura.

Uma das metodologias publicadas de purificação de rTOP utiliza tampão Tris/HCl contendo 150mM NaCl e 20mM imidazol para equilibrar a coluna antes de realizar a eluição com maior concentração de imidazol no tampão de equilíbrio contendo 150mM NaCl e 300mM imidazol (Niemirowicz et al., 2007). Um protocolo alternativo de purificação foi testado utilizando a enzima diluída em tampão sem NaCl e aplicada a uma coluna de Q-sepharose equilibrada em tampão Tris/HCl 50mM. A coluna foi lavada com o mesmo tampão contendo 100mM NaCl e a enzima foi eluída com o tampão contendo 200mM NaCl e depois concentrada (Niemirowicz et al., 2007). Outro protocolo utilizou resina de glutationa-sepharose equilibrada com tampão PBS 0,15M e lavada com tampão de lavagem contendo 50mM Tris e 150mM NaCl, depois lavada novamente com tampão de lavagem adicionado de 2,5mM CaCl₂. Depois, foi adicionada trombina e as proteínas eluídas com tampão 50mM Tris contendo 150mM NaCl. A trombina foi retirada com o uso do Amicon (Duzzi, 2014). Um outro trabalho utilizou protocolo de eluição da proteína com 10 volumes de tampão contendo 10mM Tris/HCl e, depois, concentrou a proteína utilizando Amicon ajustando a concentração final da proteína para 5mg/ml (Philibert et al., 2014).

Dessa maneira, adaptando os modelos de purificação publicados para rTOPTc, padronizamos a purificação de rTOPTc aplicando 20 volumes de lavagem com uma baixa concentração de sal (5mM) seguida de um aumento brusco para as concentrações de eluição de 80mM e 250mM. Essas mudanças geraram frações consideravelmente mais concentradas e puras de rTOPTc, como mostra a Figura 16.

A fim de verificar a presença de cauda de histidina e certificar-se de que a proteína purificada era a rTOPTc, foi realizado um Western-blot, que mostrou que a proteína reconhecida possuía a cauda de histidina adicionada na proteína recombinante, conforme mostrado na Figura 13, confirmando a expressão e purificação da TOPTc.

A partir desses dados foi possível, então, determinar a quantidade ótima de enzima para a realização dos testes enzimáticos que serão utilizados posteriormente. Conforme mostrado na Figura 18, a presença de 1µg de proteína gerou a maior atividade, que equivale a aproximadamente o dobro da atividade de 0,5µg, e assim por diante. Ou seja, o gráfico mostra de maneira clara a correlação direta da atividade enzimática em relação à concentração de enzima presente no teste. Essa quantidade é consideravelmente maior do que o volume necessário para observar a atividade de rTOP de escorpião, que necessitou de 7,5ng para agir sobre 10µM do mesmo substrato utilizado neste trabalho, porém em uma concentração 2 vezes maior (Duzzi, 2014). Em outro experimento, a TOP humana foi testada em ensaios enzimáticos em um volume de 5ng, porém o substrato testado era o peptídeo β-amiloide, que foi adicionado em uma concentração de 300µM (Philibert et al., 2014). Vale lembrar, porém, que em ambos os casos, como em outros, aditivos alternativos foram adicionados, como NaCl, DTT e DMSO para auxiliar na atividade da enzima, além de que o pH estava ajustado na faixa de 7,4, ideal para as espécies que estavam sendo estudadas (Crack et al., 1999).

O gráfico do pH (Figura 19), mostra um leve desvio na curva entre os valores de 7,5 e 8, comportamento que foi observado em todos os testes de pH realizados. Um padrão semelhante a este é descrito em outras enzimas como a prolil oligopeptidase (POP), cujo gráfico do pH evidencia a existência de duas formas da enzima, uma predominante no pH próximo a 6 e outra no pH 8. Da mesma maneira, o desvio observado na faixa entre 7,5 e 8 para a TOPTc pode indicar a presença de duas formas distintas da enzima em valores de pH levemente mais ácidos do que o ótimo para a TOPTc. Isso poderia ser explicado pelo fato de que um aumento do pH poderia gerar uma desprotonação de alguns aminoácidos como histidinas, que podem ser relevantes para a atividade da enzima, como se observa na Figura 30.

Com base nos resultados do teste de avaliação do pH ótimo e nos dados recolhidos da literatura, foram selecionados diferentes tampões cuja faixa de tamponamento abrangem valores de pH neutros

a levemente ácidos para serem testados que já haviam sido utilizados em ensaios cinéticos de TOP humana recombinante, são eles: Hepes 50mM (Saric et al., 2001), Tris-HCl 25mM (Liu, 2013) e Fosfato Monobásico de Sódio 50mM, utilizado em ensaios enzimáticos de TOP de rato (Portaro et al., 2001). Além desses, também foi testado o tampão MES 50mM, por compor a faixa de pH ideal. Contudo, o tampão fosfato de sódio foi o que rendeu maior atividade enzimática. O tampão fosfato já foi reportado para a TOP humana (Dando et al., 1993), apesar de que a maioria dos trabalhos adota o Tris-HCl como tampão utilizado nos testes de cinética enzimática (Ferro et al., 1999; Gravi, 2010; Niemirowicz et al., 2007; Oliveira et al., 2002^a; Philibert et al., 2014; Portaro et al., 1999). Normalmente sua máxima atividade acontece em pHs neutros a levemente básicos, tendo sido relatados casos em que o pH ótimo variou entre 6,5 e 8,8.

Em *Entamoeba histolytica*, foi encontrada em ambiente intra e extracelular uma tiol-protease com atividade similar à catepsina B que apresenta uma faixa ampla de pH ótimo, que varia entre 6 e 7, depende de agentes redutores, suscetível a inibidores de tiol proteases e exibe isoformas que abrangem uma massa de 16 kDa a 66 kDa. Diversos estudos hipotetizaram que a invasão tecidual por cepas virulentas de *E. histolytica* requeriam expressão e liberação de uma protease. Em duas diferentes investigações, pesquisadores encontraram um mecanismo de citotoxicidade que envolvia um fator secretado de trofozoítos que eram inibidos por inibidores de protease. Mais tarde foi demonstrado que essa citotoxina era purificada juntamente com atividade de cisteíno-protease e que o efeito citotóxico da cepa HM-1 versus a cepa HK-9 estava associado a uma maior atividade de protease. Quando a principal cisteíno-protease de *E. histolytica* foi purificada, foi confirmada que poderia produzir um efeito citopático e foi mostrado que um inibidor específico irreversível de cisteíno-protease poderia prevenir a destruição de tecido de cultura em monocamada por trofozoítos vivos (Mckerrow et al., 1993).

Estudos anteriores realizados com TOP e neurolisina de ratos sugerem que ambas as metaloproteases são ativadas pela presença de sais como o NaCl. Tais estudos utilizam o NaCl nos ensaios enzimáticos em concentrações de 20mM a 200mM (Oliveira et al., 2002b; Portaro et al., 1999, 2001; Visniauskas et al., 2019). Contudo, esse não foi o resultado observado para a rTOPTc, que não teve a sua atividade alterada de forma significativa pela presença de NaCl na faixa de concentração usada pelos estudos anteriores. Outros estudos sugerem a adoção do tampão Tris-NaCl (Ferro et al., 1999; Icimoto et al., 2017) para a realização dos ensaios, o que forneceria a concentração de sal semelhante à utilizada nos estudos supracitados. Contudo, vimos que o tampão Tris não rendeu uma boa atividade para a rTOPTc. Esse resultado vai ao encontro com outros trabalhos que não utilizavam NaCl para a atividade da enzima TOP humana e de rato, mas sim outros aditivos, como KCl, ZnCl₂,

TCEP, glicerol, $MgCl_2$, DTT (Dando et al., 1993; Liu, 2013; Saric et al., 2001). Vale ressaltar que o tampão utilizado é o fosfato monobásico de sódio e fornece íons sódio na solução. Esse pode ser um motivo que contribua para que a atividade da rTOPTc aumente no tampão fosfato monobásico de sódio, mesmo que os demais tampões testados, que não foram mostrados aqui, não tenham sido influenciados pela adição de NaCl durante o teste enzimático.

O teste da influência de zinco na atividade da TOPTc demonstrou que a presença de pequenas concentrações de $ZnCl_2$ na faixa de micromolar e milimolar aumentou a atividade de maneira significativa, como já havia sido demonstrado e era esperado (CHEN et al., 1998; ORLOWSKI; MICHAUD; CHU, 1983b). A máxima atividade da enzima foi observada na presença de $5 \mu M$ de $ZnCl_2$, que aumentou em 300% a atividade com relação ao controle. Porém, esse aumento de atividade não é diretamente proporcional ao aumento da concentração de cloreto de zinco, uma vez que a adição de 1 ou 5mM do sal gerou aumento na atividade similar ao encontrado na presença de $1 \mu M$ de $ZnCl_2$. Estudos já utilizaram altas concentrações de $ZnCl_2$ (100mM) para parar a reação catalítica da enzima durante ensaios de atividade (Shrimpton et al., 1997b). Isso porque, da mesma maneira que a atividade da enzima pode ser inibida pelo alto teor de agentes redutores no meio através da disrupção de pontes dissulfeto intramoleculares, a alta capacidade do íon zinco pode atacar átomos de enxofre (alta tiofilicidade) também pode levar a uma inibição da atividade da enzima, isto é, o Zn interage com átomos de enxofre causando um efeito inibidor na proteína (Shrimpton et al., 1997b). Em geral, porém, o cloreto de zinco é utilizado com o intuito de aumentar a atividade da TOP na faixa de $100 \mu M$ (CHEN et al., 1998), mas já havia sido demonstrado que concentrações mais baixas, como $25 \mu M$ e $50 \mu M$ tem maior efeito na atividade do que concentrações maiores como $100 \mu M$ (ORLOWSKI; MICHAUD; CHU, 1983b). É importante ressaltar que concentrações maiores que $1 \mu M$ e $5 \mu M$ devem ser testadas no futuro, para melhor investigar o comportamento da enzima na presença de concentrações um pouco maiores do que as testadas.

Estudos anteriores utilizaram a temperatura de $37^\circ C$ como temperatura ideal para testes de atividade enzimática da TOP. Os dados presentes na literatura sugerem que a atividade da TOP cai significativamente a $45^\circ C$ (Oliveira et al., 2002^a), não tendo sido descrito na literatura o observado para TOPTc mostrado na Figura 23, em que a enzima parece permanecer estável em até $50^\circ C$ e preserva sua atividade próxima a 50% em temperaturas mais altas até $80^\circ C$. A termoestabilidade observada na TOPTc é inédito entre TOPs de eucariotos já estudadas. A fim de investigar melhor a origem dessa característica, foi realizado um alinhamento da sequência da TOPTc com metaloproteases de diversas espécies, inclusive de organismos termofílicos como as archeas *Halomicrobium sp* e *Methanoregula formicica* e bactérias termofílicas *Bacillus licheniformis* e

Geobacillus sp., conforme figura 34. Nela pode-se observar que o *T. cruzi* compartilha um ancestral em comum com a *Methanoregula formicica sp. Nov.*, uma archea produtora de metano isolada em cultura anaeróbica originária de um reator mesofílico anaeróbico. Seu crescimento foi observado em 40°C e, com base na análise comparativa da sequência do rRNA 16S, é filogeneticamente próxima da espécie também mesofílica *Methanoregula boonei*, archea um pouco mais conhecida e estudada (Yashiro et al., 2011). Até o momento, não se sabe ao certo o motivo de a TOPTc possuir um *range* tão amplo de temperatura. A relativa proximidade com uma espécie de archea pode ser uma possível explicação que precisa ser melhor investigada.

Uma outra característica marcante da TOPTc que não é comumente observada em outras metaloproteases foi a sua instabilidade quando armazenada em baixas temperaturas ainda que na presença de um aditivo anticongelante como o glicerol. Conforme mostrado na Figura 24, a TOPTc mostrou-se mais estável e ativa quando armazenada a 4°C, diferentemente de outras proteases que possuem maior estabilidade quando armazenadas a -20°C com 50% glicerol. A atividade da TOPTc diminui em cerca de 25-30% após 3 semanas de armazenamento a 4°C. A diminuição foi maior, contudo, quando a enzima foi armazenada em glicerol em temperaturas negativas. O congelamento da proteína sem adição glicerol, apesar de parecer melhor nos momentos iniciais após a purificação, diminui em quase 100% a atividade da proteína após 1 semana de armazenamento em freezer. Esse resultado é interessante, uma vez que o congelamento pode criar cristais de gelo na solução em que a proteína está inserida e na própria estrutura da proteína, o que pode desorganizar o sítio ativo da enzima, afetando sua capacidade de hidrolisar o substrato.

Poucos estudos existem acerca da estabilidade da TOP em altas ou baixas temperaturas. Segundo (Oliveira et al., 2002^a), a TOP é estável por mais de 20 minutos a 37°C, mas sua atividade começa a decair a 45°C por 5 minutos. Contudo, foi observado um aumento significativo na porcentagem de hidrólise pela TOP nas ligações Arg-Arg à medida que a temperatura diminuía com os peptídeos contendo Val ou Asp. Alguns substratos tiveram maior porcentagem de degradação pela TOP em temperaturas baixas 10 ou 18°C em comparação com 30 ou 37°C (Oliveira et al., 2002^a).

Contudo, sabe-se que outros parâmetros influenciam a estabilidade de uma proteína, como as reações redox, que são tão importantes para a TOPTc em especial. A presença da cauda de histidina na estrutura da proteína recombinante, que não está presente na estrutura da proteína selvagem, também pode causar uma mudança estrutural que desestabilize ou estabilize ainda mais a depender da temperatura em que a proteína se encontra, o que poderia explicar o aumento da estabilidade em baixas temperaturas e também em altas temperaturas, uma vez que mais de um fator podem estar influenciando a estabilidade. Contudo, esse efeito não é observado quando o BSA é adicionado logo

após a purificação no intuito de preservar a atividade da amostra durante o armazenamento, uma vez que não houve diferença significativa na atividade enzimática das amostras armazenadas com ou sem BSA.

Ainda com relação à estabilidade da enzima, sabe-se que o BSA tem a função de estabilizar enzimas através de mecanismos ainda não completamente conhecidos, mas que podem envolver o aumento de interações hidrofóbicas e a ligação com subunidades de enzimas ativas (Han et al., 2014). A presença do BSA pode ser adotada, portanto, para aumentar a atividade da enzima, principalmente no momento do teste de atividade enzimática. Ainda que o armazenamento promova um aumento da atividade, o maior efeito acontece durante o teste, quando a enzima está ativa, conforme mostrado na Figura 25.

Embora o EDTA seja um inibidor clássico de metaloproteases, por ser um agente quelante de metais, curiosamente ele não é capaz de inibir a atividade de TOPTc quando incubada por 15 minutos, mas ao contrário, apresenta uma leve tendência de aumentar a sua atividade. Como mostra a Figura 26, o EDTA aumentou a sua atividade tanto na concentração de 1mM quanto de 10mM. Essa característica já havia sido observada em estudos anteriores, que demonstraram a completa inibição da TOP por EDTA apenas após extensivas etapas de diálise. Ainda, a enzima quelada e, portanto, inativa, pode ser reativada pela adição de diversos íons divalentes, como zinco, cobalto e manganês (Orlowski et al., 1983b) especialmente para algumas espécies, e causou controvérsias quanto a caracterizar a TOP como uma metalopeptidase. Alguns estudos demonstraram que 15 minutos de incubação com EDTA não foram suficientes para inibir a atividade da enzima. Contudo, outros estudos mostraram que 24h de incubação com EDTA levaram à inibição de 100% da atividade da TOP. Sabe-se, também, que a atividade da enzima tratada com EDTA é restabelecida com a adição de 50-100 μ M de ZnCl₂ e sua ativação parcial ou completa é atingida com baixas concentrações de cátions bivalentes. Em contraste com baixas concentrações de metal, os íons Zn, Mn, Pb, Ni, Hg, Ag, Cu na faixa de mM inibem a atividade da enzima (Tisljar, 1993). O tratamento da TOPTc com DTT mostra que não há pontes dissulfeto essenciais na estrutura da enzima que impactam a sua atividade. Os agentes redutores β -mercaptoetanol e DTT favoreceram a atividade máxima da enzima nas faixas de 5mM e 0,1mM respectivamente (Tisljar, 1993).

Os agentes redutores β -mercaptoetanol e DTT favoreceram a atividade máxima da enzima nas faixas de 5mM e 0,1mM respectivamente (TISLJAR, 1993). A figura 27 mostra uma pequena diferença exercida sobre a atividade da rTOPTc tanto com 0,5mM quanto com 5mM de DTT, o que pode ser uma evidência de que a estrutura da rTOPTc não possui pontes dissulfeto essenciais que impactam a atividade da enzima, o que contraria a ideia inicial de que a atividade da rTOPTc é

dependente da concentração de tiol no meio. Um outro estudo demonstrou que o DTT utilizado para ativação da TOP não afetou a razão da hidrólise entre os dois sítios hidrolíticos (OLIVEIRA et al., 2002).

A fenantrolina, como era esperado (Ferro et al., 2020), foi capaz de inibir a atividade da rTOPTc em aproximadamente 100%, com um IC₅₀ calculado em 0,372mM. Em todos os experimentos de inibição de TOP de diversas espécies, foi observada inibição completa ou quase completa por fenantrolina (Ferro et al., 2020; Kessler et al., 2011; Morales & Woessner, 1977b; Orłowski et al., 1983b). Após rápida incubação com fenantrolina, a atividade é restaurada por diluição sem adição de metais, o que acontece devido a uma fraca ligação da fenantrolina ao metal no sítio ativo da proteína. Por ser um inibidor reversível, com a diluição, a fenantrolina é removida do sítio de ligação sem que seja necessária a suplementação com metal (Tisljar, 1993).

O inibidor específico sintético Cpp-Ala-Ala-Phe-pAb possui capacidade de inibir ainda mais fortemente a TOPTc, possuindo um IC₅₀ de 54,29 nM. Na literatura, há dados muito escassos de IC₅₀ de TOP, sendo a maioria dos dados disponibilizados em *K_i*. Embora ambos os parâmetros possam ser usados como quantitativos do potencial inibidor de um composto, eles diferem pela dependência da concentração enzimática. Enquanto o *K_i* é uma medida intrínseca de afinidade independente da concentração enzimática, o IC₅₀ é um parâmetro que descreve a força de um inibidor que é dependente da concentração da enzima. Por definição, IC₅₀ é a concentração de inibidor necessária para se atingir 50% de inibição, enquanto o *K_i* é a concentração de inibidor livre requerida para se alcançar 50% de saturação enzimática. É sabido que não é possível fazer uma comparação direta *K_i* e IC₅₀ pois eles variam a depender das condições do ensaio e dos mecanismos de inibição dos compostos. Há, porém, a equação de Cheng-Prusoff que descreve essa relação matematicamente e que demonstra que o IC₅₀ é sempre maior que o valor de *K_i*. Estudos calcularam o *K_i* do inibidor da TOP de humano igual a 16 nM. Um valor satisfatório de *K_i* para a rTOP humana já foi considerado no valor de 0,2 a 0,8μM (Portaro et al., 1999).

A dinorfina já foi descrita como inibidora de TOP de rato, com um *K_i* no valor de 26nM, enquanto a de coelho foi inibida por dinorfina com um valor de *K_i* igual a 23nM. Sabe-se da especificidade da TOP por substratos que contenham resíduos hidrofóbicos na posição P1 e preferencialmente um resíduo hidrofóbico na posição P3'. Essa especificidade parece ser imposta pela presença de bolsos de ligação hidrofóbicos em ambas as posições. Essa especificidade é diferente do que é observado na encefalinase (endopeptidase 24.11), uma zinco-metaloenopeptidase amplamente distribuída em tecidos animais que exibe uma especificidade termolisina-*like* pois cliva ligações de aminoácidos no sítio de resíduos hidrofóbicos, especificidade que é imposta pela presença de um bolso

de ligação hidrofóbica no subsítio S1 da enzima, bem semelhante ao encontrado na termolisina. A diferença na especificidade da termolisina e encefalinase também é acentuada pelo fato de que os inibidores da endopeptidase 24.11 não tem efeito na TOP e que inibidores da TOP são apenas inibidores fracos para a encefalinase (Orlowski et al., 1983b).

Inibidores de zinco-metaloenzimas são de interesse por suas propriedades farmacológicas potenciais relacionadas a função dessas enzimas. Inibidores de ACE tem aplicações no tratamento de hipertensão e falha congestiva no coração e inibidores da endopeptidase 24.11 parecem ter propriedades analgésicas. A evidência de que a TOPTc é secretada de forma expressiva pelo parasito indica o seu potencial uso e de seus inibidores em estudos funcionais dessa enzima no contexto da doença de Chagas.

O Km da TOP já havia sido testado para diferentes substratos derivados do substrato Abz-GGFLRRXQ-EDDnp, e variou entre 1,4 e 4,8 μ M (OLIVEIRA et al., 2002), valores muito abaixo do obtido para o substrato Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys, que atualmente é o utilizado como referência. Segundo Oliveira *et.al*, a TOP hidrolisa ligações Arg-Arg quando a posição X do substrato contém aminoácidos básicos ou aromáticos, menos Pro e Ala. Por outro lado, substratos que contenham aminoácidos de caráter ácido ou hidrofóbicos na posição X, que não Asn, são hidrolisados na ligação Arg-Arg preferencialmente, ou na ligação Leu-Arg (Oliveira et al., 2001). Os substratos clivados entre Arg-Arg possuem maior constante e, portanto, menor Km.

Na literatura, os valores de Km da enzima humana obtidos para o substrato Mcc-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(Dnp) variam de 5,4 μ M (Portaro et al., 1999) a 8,4 μ M (Dando et al., 1993). Já para a enzima de rato, o valor de Km obtido foi de 23 μ M (Dando et al., 1993), valor que muito se assemelha ao obtido para a rTOPTc, de 24,89 μ M.

Como já citado anteriormente, o substrato Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(Dnp) é derivado do colágeno. Seria interessante sugerir, portanto, uma possível participação da TOP na degradação do colágeno. Assim como a Pz-peptidase de bactérias, a prolil oligopeptidase (POP) de *T. cruzi*, já foi descrita como uma colagenase. Dessa maneira, seria plausível hipotetizar que a POPTc poderia atuar em conjunto com a TOPTc e outras colagenases clássica a fim de facilitar a mobilidade do parasito através da matriz extracelular para alcançar a superfície das células nos tecidos, como já foi sugerido para a POP (D Bastos et al., 2005).

Uma característica não usual da TOP, que também é encontrada na neurolisina, é a grande variedade de sítios de clivagem, a depender do tamanho ou da natureza dos aminoácidos nas diferentes posições dos substratos. Com a determinação da estrutura 3D da neurolisina, foi possível corroborar a

ampla especificidade dessa enzima, que compartilha 65% de identidade de sequência com a TOP, e levanta a possibilidade de uma reorganização dos loops flexíveis do sítio de ligação da enzima para acomodar os diferentes substratos. Esse mecanismo muito particular de interação com o substrato com a peptidase requer um estudo detalhado da composição do meio e da influência da temperatura na atividade dessas enzimas para que se possa entender melhor as variações de especificidade e amplo espectro de hidrólise de peptídeos biologicamente ativos (OLIVEIRA et al., 2002).

A estrutura tridimensional da TOPTc não foi experimentalmente resolvida até o momento, bem como a de milhares de outras proteínas. Para construir os modelos, os métodos computacionais podem utilizar moldes de estrutura 3D de proteínas homologas, comparando sequência primária, secundária ou terciária ou não utilizar molde.

O servidor AlphaFold disponibiliza o modelo da TOPTc na sua base de dados, e o modelo apresenta alto grau de confiabilidade em quase toda a proteína, com exceção da região N-terminal, que obteve *per-residue confidence score* (pLDDT) < 90. Cada modelo foi refinado e ao final do processo foram comparados conforme Figura 32. Para definir qual o melhor modelo gerado, pré-selecionamos três parâmetros de qualidade para serem comparados: *clashscore*, *MolProbity score* e *Ramachandran favored*.

A estrutura da TOPHs foi resolvida experimentalmente com o ligante Zn^{2+} presente na estrutura cristalográfica. Desse modo, foi possível comparar a conformação dos aminoácidos formadores da tríade catalítica, bem como a sua interação com o íon zinco, tendo sido possível observar que a estrutura obtida pelo AlphaFold é semelhante à estrutura resolvida experimentalmente, o que corrobora a qualidade do modelo da TOPTc apresentado, uma vez que ele muito se assemelha à parte conservada (domínio catalítico) da proteína estudada experimentalmente. Como observado nas Figuras 32 e 33, todos os modelos gerados foram semelhantes entre si, obtendo pontuações satisfatórias nos parâmetros de qualidade, com exceção do I-TASSER refinado. O modelo do AlphaFold apresentou parâmetros melhores quando comparado aos outros, mas não houve grandes diferenças entre os modelos sugeridos.

A especificidade dos anticorpos foi confirmada por western-blot. Estudos anteriores mostraram a localização subcelular de TOP em células da linhagem AtT-20, derivada de camundongos, de forma pontual e discreta na membrana das células, consistente com padrões de imunomarcaçãotambém observados em rato. (Crack et al., 1999).

Em um estudo, a aparência das organelas contendo TOP não correspondia ao esperado para lisossomos secundários, mitocôndrias, retículo endoplasmático ou aparelho de Golgi, mas pareciam

com endossomos, concluindo-se que parte da TOP de fibroblastos embrionários de galinha está localizada em endossomos .

Sabe-se que a TOPTc foi encontrada, nos experimentos de imunofluorescência, na bolsa flagelar, local em que ocorre intensa liberação de moléculas para o meio externo, o que confirma o fato de ser uma enzima secretada pelo parasito.

A TOP humana é descrita como existente em duas formas em tecidos e linhagens celulares, uma forma predominantemente solúvel, que corresponde a 80% da atividade total e formas menos abundantes ligadas a membrana celular e ao núcleo. Tais formas são muito similares, se não forem idênticas no que diz respeito a especificidade de substrato, propriedades imunológicas e sensibilidade a inibidores específicos, Inicialmente, foi proposto que as duas formas se distinguiam pela presença de um segmento de membrana nas formas ligadas à membrana, como já havia sido observado em outras peptidases dependentes de zinco. Outra possibilidade seria alterações nas modificações pós translacionais, que podem segregar as enzimas em diferentes compartimentos celulares. Contudo, um dos resultados da clonagem e sequenciamento do cDNA da TOP humana foi que a enzima codificada faltava um segmento de membrana, sugerindo que a possibilidade de associação de membrana era a mais provável (Glucksman & Roberts, 1995).

Sabe-se que a expressão de MHC classe I e a síntese do imunoproteassoma em células de mamífero infectadas é modulada por *T. cruzi* através de um mecanismo pós-transcricional desconhecido (CAMARGO *et al.*, 2014), sugerindo uma possível atuação da TOP na limitação da apresentação de antígenos, o que seria interessante, por exemplo, do ponto de vista do patógeno, para o estabelecimento da fase crônica de forma silenciosa.

Em vista das evidências que a TOP atua em moléculas que se originam fora da célula, parece paradoxal que alguns estudos mostrem que a enzima está localizada na fração citosólica de todos os tecidos estudados. Com exceção de cérebro de rato, no qual 10-20% da atividade estava localizada nas membranas de vesículas de sinaptossômicas. Poucos trabalhos na literatura exploraram a localização da enzima utilizando técnicas de imunomarcção ou outras técnicas relevantes.

7. CONCLUSÃO

Esse trabalho constitui o primeiro estudo de uma thimet oligopeptidase de protozoários parasitos. Os resultados experimentais obtidos nesse trabalho fornecem uma caracterização ampla acerca da thimet oligopeptidase de *T. cruzi*, representando um ponto de partida para o aprofundamento de futuros estudos da enzima, de forma mais direcionada e específica, uma vez que se sabe ao certo quais as condições ótimas de atividade da enzima. Além disso, novas características foram descobertas, que não haviam sido observadas e que são únicas da TOPTc, como a sua maior estabilidade de armazenamento a 4°C juntamente com a sua alta estabilidade em altas temperaturas, característica compartilhada com organismos termofílicos que precisa ser melhor investigada e explorada. Além disso, estudos sobre a sua organização tridimensional podem ser melhor desenvolvidos a partir de sua predição estrutural fornecida pelo AlphaFold. Experimentos de imunofluorescência permitiram identificar a TOPTc como uma proteína que está presente de forma mais concentrada na bolsa flagelar, o que ainda não havia sido descrito, corroborando sua liberação para o meio extracelular.

Mais estudos precisam ser realizados a fim de explorar melhor o papel da TOPTc no desenvolvimento da doença de Chagas, e a caracterização da enzima fornecida nesse trabalho pode contribuir de maneira expressiva para futuros estudos.

8. PERSPECTIVAS

- Investigar a presença de sítios de palmitoilação na TOPTc e testar sua participação em processos celulares de sinalização, tráfego ou ligação à membrana.
- Testar o efeito de concentrações de zinco maiores que 1 μM e 5 μM nos ensaios enzimáticos, para melhor investigar o comportamento da enzima na presença do zinco;
- Testar estabilidade de armazenamento na temperatura de -80°C .
- Determinar o K_i para o inibidor da rTOPTc.
- Investigar possível relação da TOPTc com processos fisiológicos ou patogênicos através de nocaute por Crispr.
- Testar efeito do inibidor Cpp-Ala-Ala-Phe no parasito cultivado *in vitro*.

9. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, V. E., Niemirowicz, G. T., & Cazzulo, J. J. (2012). The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1824, Issue 1, pp. 195–206). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.05.011>
- Barret, Alan J; Chen, J. (2012). *Handbook of Proteolytic Enzymes*.
- Barrett, A. J. (2000). Barret 2000 Proteases Current Protocols. *Protein Science*, 1–12. <https://scihub.hkvisa.net/10.1002/0471140864.ps2101s21>
- Barrett, A. J., & Brown, M. A. (1990). Chicken liver Pz-peptidase, a thiol-dependent metallo-endopeptidase. In *Biochem. J* (Vol. 271). <https://portlandpress.com/biochemj/article-pdf/271/3/701/601926/bj2710701.pdf>
- Bastos, I. M. D., Motta, F. N., Charneau, S., Santana, J. M., Dubost, L., Augustyns, K., & Grellier, P. (2010). Prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma brucei* hydrolyzes native collagen, peptide hormones and is active in the plasma of infected mice. *Microbes and Infection*, 12(6), 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.02.007>
- Bayer-Santos, E., Leal Cunha-E-Silva, N., Yoshida, N., & Franco Da Silveira, J. (2013). *Expression and cellular trafficking of GP82 and GP90 glycoproteins during Trypanosoma cruzi metacyclogenesis*. <http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/127>
- Benkert, P., Tosatto, S. C. E., & Schomburg, D. (2008). QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 71(1), 261–277. <https://doi.org/10.1002/prot.21715>
- Bern, C. (2011). Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, 365(13), 1258–1259. <https://doi.org/10.1056/nejmc1108653>
- Bern, C., & Montgomery, S. P. (2009). An estimate of the burden of chagas disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 49(5), 52–54. <https://doi.org/10.1086/605091>
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8>

- Bringaud, F., Rivière, L., & Coustou, V. (2006). Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.03.017>
- Cadavid-Restrepo, G., Gastardelo, T. S., Faudry, E., de Almeida, H., Bastos, I. M., Negreiros, R. S., Lima, M. M., Assumpção, T. C., Almeida, K. C., Ragno, M., Ebel, C., Ribeiro, B. M., Felix, C. R., & Santana, J. M. (2011). The major leucyl aminopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (LAPTc) assembles into a homohexamer and belongs to the M17 family of metallopeptidases. *BMC Biochemistry*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2091-12-46>
- Camargo, R., Faria, L. O., Kloss, A., Favali, C. B. F., Kuckelkorn, U., Kloetzel, P. M., de Sá, C. M., & Lima, B. D. (2014). *Trypanosoma cruzi* infection down-modulates the immunoproteasome biosynthesis and the MHC class I cell surface expression in HeLa cells. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095977>
- Campo, V. L. et al. (2016). *Trypanosoma cruzi* invasion into host cells: a complex molecular targets interplay. *Mini-Reviews in Medical Chemistry*, 16, 1084–1097. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160607230238>.
- CDC, C. for D. C. and P. (2022). *Chagas Disease*.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. In *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (Vol. 1, Issue 2, pp. 159–218). <https://doi.org/10.1590/s0074-02761909000200008>
- Chang, K. P., & McGwire, B. S. (2002). Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 1, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1475-9292-1-1>
- Chen, J.-M., Stevens, R. A. E., Wray, P. W., Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (n.d.). *Thimet oligopeptidase: site-directed mutagenesis disproves previous assumptions about the nature of the catalytic site*.
- Clayton, J. (2010). Chagas disease 101. *Nature*, 465(7301 SUPPL.), 2009–2010. <https://doi.org/10.1038/nature09220>
- Coelho, H. L. L., Cicilini, M. A., Carvalho, K. M., Carvalho, I. F., & Camargo, A. C. M. (1981). Inhibition of rabbit tissue kininase by anti-(endo-oligopeptidase A) antibodies. *Biochem J*, 197(1), 85–93.

- CONITEC, C. N. de I. de T. no S. (2018). *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas*. 1–141.
- Crack, P. J., Wu, T. J., Cummins, P. M., Ferro, E. S., Tullai, J. W., Glucksman, M. J., & Roberts, J. L. (1999). The association of metalloendopeptidase EC 3.4.24.15 at the extracellular surface of the AtT-20 cell plasma membrane. In *Brain Research* (Vol. 835). www.elsevier.com/locate/brain-research
- D Bastos, I. M., Grellier, P., Martins, N. F., Cadavid-restrepo, G., de Souza-ault, M. R., Augustyns, K., L Teixeira, A. R., Schrévelschr, J., Maignret, B., da Silveira, J. F., & Santana, J. M. (2005). Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. In *Biochem. J* (Vol. 388). <http://www.biochemj.com/>
- Dando, P. M., Brown, M. A., & Barrett, A. J. (1993). Human thimet oligopeptidase. In *Biochem. J* (Vol. 294).
- Dias, J. C. P., Ramos, A. N., Gontijo, E. D., Luquetti, A., Shikanai-Yasuda, M. A., Coura, J. R., Torres, R. M., Melo, J. R. da C., Almeida, E. A. de, Oliveira, W. de, Silveira, A. C., Rezende, J. M. de, Pinto, F. S., Ferreira, A. W., Rassi, A., Fragata, A. A., Sousa, A. S. de, Correia, D., Jansen, A. M., ... Alves, R. V. (2016). Aspectos Gerais da Epidemiologia da Doença de Chagas com Especial Atenção ao Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde : Revista Do Sistema Unico de Saúde Do Brasil*, 25, 7–86. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000500002>
- DNDi, D. for N. D. institute-. (2022). *Chagas Disease*.
- Du, Z., Su, H., Wang, W., Ye, L., Wei, H., Peng, Z., Anishchenko, I., Baker, D., & Yang, J. (2021). The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction. In *Nature Protocols* (Vol. 16, Issue 12, pp. 5634–5651). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00628-9>
- Duzzi, B. (2014). *Busca de novos substratos e/ou inibidores das enzimas thimet oligopeptidase (E.C.3.4.24.15) e neurolisina (E.C.3.4.24.16) nas frações de baixa massa molecular do veneno do escorpião Tityus serrulatus*.
- Ferro, E. S., Gewehr, M. C. F., & Navon, A. (2020). Thimet oligopeptidase biochemical and biological significances: Past, present, and future directions. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 9, pp. 1–30). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10091229>
- Ferro, E. S., Tullai, J. W., Glucksman, M. J., & Roberts, J. L. (1999). Secretion of Metalloendopeptidase 24.15 (EC 3.4.24.15). In *DNA AND CELL BIOLOGY* (Vol. 18, Issue 10). Mary Ann Liebert, Inc. Pp.

- Glucksman, M. J., & Roberts, J. L. (1995). [17] *Strategies for Characterizing, Cloning, and Expressing Soluble Endopeptidases*.
- Gravi, T. E. (2010). *Identificação de atividade metalo-oligopeptidásica thimet-like em Paracoccidioides brasiliensis: um novo fator de patogenicidade fúngica?*
- Guna, A., & Hegde, R. S. (2018). Transmembrane Domain Recognition during Membrane Protein Biogenesis and Quality Control. In *Current Biology* (Vol. 28, Issue 8, pp. R498–R511). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.004>
- Han, J., Wang, Q., Zhang, Z., Gong, T., & Sun, X. (2014). Cationic bovine serum albumin based self-assembled nanoparticles as siRNA delivery vector for treating lung metastatic cancer. *Small*, 10(3), 524–535. <https://doi.org/10.1002/sml.201301992>
- Icimoto, M. Y., Ferreira, J. C., Yokomizo, C. H., Bim, L. v., Marem, A., Gilio, J. M., Oliveira, V., & Nantes, I. L. (2017). Redox modulation of thimet oligopeptidase activity by hydrogen peroxide. *FEBS Open Bio*, 7(7), 1037–1050. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12245>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kessler, J. H., Khan, S., Seifert, U., le Gall, S., Chow, K. M., Paschen, A., Bres-Vloemans, S. A., de Ru, A., van Montfoort, N., Franken, K. L. M. C., Benckhuijsen, W. E., Brooks, J. M., van Hall, T., Ray, K., Mulder, A., Doxiadis, I. I. N., van Swieten, P. F., Overkleeft, H. S., Prat, A., ... Melief, C. J. M. (2011). Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes. *Nature Immunology*, 12(1), 45–53. <https://doi.org/10.1038/ni.1974>
- Kinoshita, T. (2016). Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors: Biochemistry and cell biology: Introduction to a thematic review series. *Journal of Lipid Research*, 57(1), 4–5. <https://doi.org/10.1194/JLR.E065417>
- Klemba, M., & Goldberg, D. E. (2002). Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 275–305. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.090501.145453>
- Kulkarni, M. M., Olson, C. L., Engman, D. M., & Mcgwire, B. S. (2009). Trypanosoma cruzi GP63 Proteins Undergo Stage-Specific Differential Posttranslational Modification and Are Important

for Host Cell Infection. *INFECTION AND IMMUNITY*, 77(5), 2193–2200.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01542-08>

Liu, Y. (2013). *Extracellular Thimet Oligopeptidase is Carried by Cell Membrane Microvesicles of Human Prostate Cancer Cells*. <http://repository.wellesley.edu/thesiscollection/152>

Mandacaru, S. C., Queiroz, R. M. L., Alborghetti, M. R., de Oliveira, L. S., de Lima, C. M. R., Bastos, I. M. D., Santana, J. M., Roepstorff, P., Ricart, C. A. O., & Charneau, S. (2019). Exoproteome profiling of *Trypanosoma cruzi* during amastigogenesis early stages. *PLoS ONE*, 14(11), 1–18.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225386>

Mateo, H., Marín, C., Pérez-Cordón, G., & Sánchez-Moreno, M. (2008). Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. In *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* (Vol. 103, Issue 3).

McConnell, E. W., Berg, P., Westlake, T. J., Wilson, K. M., Popescu, G. v., Hicks, L. M., & Popescu, S. C. (2019). Proteome-wide analysis of cysteine reactivity during effector-triggered immunity. *Plant Physiology*, 179(4), 1248–1264. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01194>

Mckerrow, J. H., Sun, E., Rosenthal, P. J., & Bouvier, J. (1993). THE PROTEASES AND 1 PAR). SITIC PROTOZOA. *Annual Review of Microbiology*, 47, 821–853.

Ministério da Saúde. (2020). Boletim Epidemiológico Doença de Chagas. In *Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde* (Issue Especial).

Monteiro, A. C., Schmitz, V., Morrot, A., de Arruda, L. B., Nagajyothi, F., Granato, A., Pesquero, J. B., Müller-Esterl, W., Tanowitz, H. B., & Scharfstein, J. (2007). Bradykinin B2 receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by *Trypanosoma cruzi*, are critical for the development of protective type-1 responses. *PLoS Pathogens*, 3(11), 1730–1744.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030185>

Morales, T. I., & Woessner, J. F. (1977a). PZ peptidase from chick embryos. Purification, properties, and action on collagen peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 252(14), 4855–4860.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)40132-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)40132-3)

Morales, T. I., & Woessner, J. F. (1977b). PZ peptidase from chick embryos. Purification, properties, and action on collagen peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 252(14), 4855–4860.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)40132-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)40132-3)

Moretti, N. S., Mortara, R. A., & Schenkman, S. (2020). *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology*, 36(4), 404–405. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.002>

- Nadolski, M. J., & Linder, M. E. (2007). Protein lipidation. *FEBS Journal*, 274, 5202–5210. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06056.x>
- Niemirowicz, G., Parussini, F., Agüero, F., & Cazzulo, J. J. (2007). Two metallo-carboxypeptidases from the protozoan *Trypanosoma cruzi* belong to the M32 family, found so far only in prokaryotes. *Biochemical Journal*, 401(2), 399–410. <https://doi.org/10.1042/BJ20060973>
- Oliveira, V., Campos, M., Melo, R. L., Ferro, E. S., Camargo, A. C. M., Juliano, M. A., & Juliano, L. (2001). Substrate specificity characterization of recombinant metallo oligo-peptidases thimet oligopeptidase and neurolysin. *Biochemistry*, 40(14), 4417–4425. <https://doi.org/10.1021/bi002715k>
- Oliveira, V., Gatti, R., Rioli, V., Ferro, E. S., Spisni, A., Camargo, A. C. M., Juliano, M. A., & Juliano, L. (2002a). Temperature and salts effects on the peptidase activities of the recombinant metallooligopeptidases neurolysin and thimet oligopeptidase. *European Journal of Biochemistry*, 269(17), 4326–4334. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03129.x>
- Oliveira, V., Gatti, R., Rioli, V., Ferro, E. S., Spisni, A., Camargo, A. C. M., Juliano, M. A., & Juliano, L. (2002b). Temperature and salts effects on the peptidase activities of the recombinant metallooligopeptidases neurolysin and thimet oligopeptidase. *European Journal of Biochemistry*, 269(17), 4326–4334. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03129.x>
- OMS, O. M. da S. (2022). *Chagas Disease*.
- Orlowski, M., Michaud, C., & Chu, T. G. (1983a). A soluble metalloendopeptidase from rat brain Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. In *Eur. J. Biochem* (Vol. 135).
- Orlowski, M., Michaud, C., & Chu, T. G. (1983b). A soluble metalloendopeptidase from rat brain Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. In *Eur. J. Biochem* (Vol. 135).
- Orlowski, M., Michaud, C., & Molineaux, C. J. (1988). Substrate-Related Potent Inhibitors of Brain Metalloendopeptidaset. In *Biochemistry* (Vol. 27).
- PDB, P. D. B. (2022). *PDB*.
- Philibert, K. D., Marr, R. A., Norstrom, E. M., & Glucksman, M. J. (2014). Identification and characterization of A β peptide interactors in Alzheimer's disease by structural approaches. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(OCT). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00265>

- Portaro, F. C. v, Gomes, M. D., Cabrera, A., Fernandes, B. L., Silva, C. L., Ferro, E. S., Juliano, L., & de Camargo, A. C. M. (1999). *Thimet Oligopeptidase and the Stability of MHC Class I Epitopes in Macrophage Cytosol*. <http://www.idealibrary.com>
- Portaro, F. C. v, Hayashi, M. A. F., Silva, C. L., & de Camargo, A. C. M. (2001). Free ATP inhibits thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) activity, induces autophosphorylation in vitro, and controls oligopeptide degradation in macrophage. In *Eur. J. Biochem* (Vol. 268).
- Queiroz, R. M. L., Charneau, S., Bastos, I. M. D., Santana, J. M., Sousa, M. v., Roepstorff, P., & Ricart, C. A. O. (2014). Cell surface proteome analysis of human-hosted trypanosoma cruzi life stages. *Journal of Proteome Research*, 13(8), 3530–3541. <https://doi.org/10.1021/pr401120y>
- Ray, K., Hines, C. S., Coll-Rodriguez, J., & Rodgers, D. W. (2004). Crystal Structure of Human Thimet Oligopeptidase Provides Insight into Substrate Recognition, Regulation, and Localization. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 20480–20489. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400795200>
- Saric, T., Beninga, J., Graef, C. I., Akopian, T. N., Rock, K. L., & Goldberg, A. L. (2001). Major Histocompatibility Complex Class I-presented Antigenic Peptides Are Degraded in Cytosolic Extracts Primarily by Thimet Oligopeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36474–36481. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105517200>
- Schilling, O. (2014). Editorial Proteases and Disease. In *Proteomics Clin. Appl* (Vol. 8). <https://doi.org/10.1002/prca.201470035>
- Secretaria de Vigilância em Saúde, M. da S. (2022). Boletim Epidemiológico Territorialização e vulnerabilidade para doença de Chagas crônica. *Boletim Epidemiológico, Número esp*(Abril 2022).
- Secretaria de Vigilância em Saúde, & Ministério da Saúde. (2022). *Boletim Epidemiológico: Territorialização e vulnerabilidade para doença de Chagas crônica*.
- Shrimpton, C. N., Glucksman, M. J., Lew, R. A., Tullai, J. W., Margulies, E. H., Roberts, J. L., & Smith, A. I. (1997a). Thiol activation of endopeptidase EC 3.4.24.15: A novel mechanism for the regulation of catalytic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17395–17399. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17395>
- Shrimpton, C. N., Glucksman, M. J., Lew, R. A., Tullai, J. W., Margulies, E. H., Roberts, J. L., & Smith, A. I. (1997b). Thiol activation of endopeptidase EC 3.4.24.15: A novel mechanism for the

regulation of catalytic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17395–17399. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17395>

Smotrýs, J. E., & Linder, M. E. (2004). Palmitoylation of Intracellular Signaling Proteins: Regulation and function. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 73, pp. 559–587). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073954>

Tielens, A. G. M., & van Hellemond, J. J. (2009). Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. *Trends in Parasitology*, 25(10), 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.07.007>

Tisljar, U. (1993). Thimet Oligopeptidase—a Review of a Thiol Dependent Metallo-Endopeptidase also Known as Pz-Peptidase Endopeptidase 24.15 and Endo-Oligopeptidase. In *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* (Vol. 374).

UniProt, U. P. R. (2022). *UniProt*.

Viotti, R., Alarcón De Noya, B., Araujo-Jorge, T., Grijalva, M. J., Guhl, F., López, M. C., Ramsey, J. M., Ribeiro, I., Schijman, A. G., Sosa-Estani, S., Torrico, F., & Gascon, J. (2014). Towards a paradigm shift in the treatment of chronic chagas disease. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 58, Issue 2, pp. 635–639). <https://doi.org/10.1128/AAC.01662-13>

Visniauskas, B., Simões, P. S. R., Dalio, F. M., Naffah-Mazzacoratti, M. D. G., Oliveira, V., Tufik, S., & Chagas, J. R. (2019). Sleep deprivation changes thimet oligopeptidase (THOP1) expression and activity in rat brain. *Heliyon*, 5(11), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02896>

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>

Wiser, M. F. (2021). and Protozoan of Humans: A Primer. In *Nutrition and Infectious Diseases* (Issue February, pp. 165–187). https://doi.org/10.1007/978-3-030-56913-6_6

Yamin, R., Malgeri, E. G., Sloane, J. A., McGraw, W. T., & Abraham, C. R. (1999a). *Metalloendopeptidase EC 3.4.24.15 Is Necessary for Alzheimer's Amyloid-Peptide Degradation**. <http://www.jbc.org>

Yamin, R., Malgeri, E. G., Sloane, J. A., McGraw, W. T., & Abraham, C. R. (1999b). *Metalloendopeptidase EC 3.4.24.15 Is Necessary for Alzheimer's Amyloid-Peptide Degradation**. <http://www.jbc.org>

- Yang, J., & Zhang, Y. (2015). Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. *Current Protocols in Bioinformatics*, 52(1), 5.8.1-5.8.15. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0508s52>
- Yashiro, Y., Sakai, S., Ehara, M., Miyazaki, M., Yamaguchi, T., & Imachi, H. (2011). *Methanoregula formicica* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from methanogenic sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(1), 53–59. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.014811-0>
- Zeida, A., Guardia, C. M., Lichtig, P., Perissinotti, L. L., Defelipe, L. A., Turjanski, A., Radi, R., Trujillo, M., & Estrin, D. A. (2014). *Thiol redox biochemistry: insights from computer simulations*. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0127-x>
- Zheng, W., Zhang, C., Wuyun, Q., Pearce, R., Li, Y., & Zhang, Y. (2019). LOMETS2: improved meta-threading server for fold-recognition and structure-based function annotation for distant-homology proteins. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W429–W436. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz384>