

Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro

Caracterização bioquímica de uma Leucil-aminopeptidase de *Trypanosoma cruzi* (LAPTc)

Thiago Santana Gastardelo

Brasília – 2010

Thiago Santana Gastardelo

Caracterização bioquímica de uma Leucil-aminopeptidase de *Trypanosoma cruzi* (LAPTc)

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Félix

Co-orientador: Prof. Dr. Jaime Martins de Santana

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Brasília – 2010

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro, Universidade de Brasília, sob orientação e co-orientação dos professores Carlos Roberto Félix e Jaime Martins de Santana, respectivamente. Este trabalho teve o apoio financeiro da CAPES e do CNPq.

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais, pela vida, educação, carinho, amor e apoio incondicionais.

E à minha querida esposa pela paciência, companheirismo e por todo o apoio.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me oferecer saúde e condições de enfrentar e superar todos os obstáculos que surgiram durante meu caminho.

Aos meus pais, pela base, educação, carinho, amor e apoio para seguir em frente em busca dos meus objetivos. Mesmo muito distantes fisicamente, sempre estiveram presentes! Às minhas irmãs, pela força.

À minha querida esposa, pelo companheirismo, amor, carinho, atenção e por estar sempre ao meu lado oferecendo apoio, conselhos e auxiliando a enfrentar os problemas.

Aos colegas de todos os laboratórios que frequentei durante os últimos anos para realizar e executar meus experimentos: Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Laboratório de Enzimologia, Laboratório de Microscopia Eletrônica, Laboratório de Virologia, Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Laboratório de Farmacologia Molecular e Laboratório de Patologia. Obrigado pelos auxílios e por ceder os equipamentos.

Em especial, agradeço a cordialidade e parceira de todos os colegas do Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro, onde passei a maior parte do tempo realizando os experimentos e desenvolvendo a pesquisa durante o doutorado.

Meus sinceros agradecimentos aos professores Edivaldo Ximenes, Carlos André Ornelas Ricart e Antônio Teixeira pelos conselhos e colaborações.

Agradeço de modo especial a grande gentileza e a total integridade do professor Carlos Roberto Félix, pelo acolhimento, paciência, confiança, incentivo, disponibilidade e boa vontade.

Também de forma especial, agradeço aos professores Bergmann Morais Ribeiro e Jaime Martins de Santana pela orientação científica, profissionalismo, dedicação e suporte integral para o desenvolvimento da pesquisa.

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

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho.

Resumo

Os patógenos dependem de atividades de peptidases para desempenhar muitos processos fisiológicos, tão bem quanto interagir com seus hospedeiros, destacando peptidases de parasitos como fatores de virulência e, então, potenciais alvos de drogas. O sequenciamento do genoma do cinetoplastídeo *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas, revelou 28 genes que codificam aminopeptidases putativas, dentre as quais estão três metionina-aminopeptidases, duas aspártico-aminopeptidases, duas aminopeptidases sensíveis a puromicina e três leucil-aminopeptidases da família M17. Neste estudo, uma atividade leucil-aminopeptidolítica principal foi identificada em *T. cruzi* usando Leu-AMC como substrato. Ela foi isolada de formas epimastigotas do parasito por um procedimento cromatográfico de dois passos e associou-se com uma única proteína hexamérica de 320 kDa como determinado por experimentos de velocidade de sedimentação e de dispersão de luz. Ligações dissulfeto intercadeias não participam da organização oligomérica da peptidase ativa. Espectrometria de massa por *Peptide mass fingerprint* revelou a identidade molecular da enzima como a aminopeptidase EAN97960 predita de *T. cruzi*, o produto do gene Tc00.1047053508799.240. Análises enzimáticas e moleculares indicaram que esta leucil-aminopeptidase de *T. cruzi* (LAPTc) pertence à família M17 de peptidases ou família da leucil-aminopeptidase. LAPTc tem uma forte dependência de pH neutro, é mesofílica e conserva sua forma oligomérica até 80 °C. Ao contrário, sua forma recombinante produzida em *E. coli*, assim como outras LAPs, é termofílica e requer pH alcalino. A atividade desta metalo-aminopeptidase é inibida por bestatina e quelantes de metais tais como 1,10-fenantrolina, é restabelecida por Zn²⁺, e potencializada por Mn²⁺ ou Ca²⁺. A enzima é expressa por todas as formas do *T. cruzi* e localiza-se no interior de vesículas no citoplasma do parasito. Uma vez que vias de aminoácidos essenciais, incluindo leucina, estão desprovidas em *T. cruzi*, a LAPTc poderia ter uma função no suprimento nutricional. Além disso, a atividade da peptidase também poderia ter uma função no processamento de peptídeos e proteínas. Nós postulamos que a LAPTc poderia ser um alvo potencial para o desenvolvimento de novas drogas para tratar a infecção de *T. cruzi*.

Abstract

Pathogens depend on peptidase activities to accomplish many physiological processes, as well as to interact with their hosts, highlighting parasitic peptidases as virulence factors and, thus, potential drug targets. The kinetoplastid *Trypanosoma cruzi* genome sequencing, the aetiological agent of Chagas disease, has revealed 28 genes encoding putative aminopeptidases, among which there are three methionine, two aspartic, two puramycin-sensitive and three leucyl aminopeptidases of the M17 family. In this study, a major leucyl aminopeptidolytic activity was identified in the *T. cruzi* by using leu-AMC as substrate. It was isolated from epimastigote forms of the parasite by a two-step chromatographic procedure and associated with a single 320-kDa homo-hexameric protein as determined by sedimentation velocity and light scattering experiments. Interchain disulfide bonds do not take part in the oligomeric assembly of the active peptidase. Peptide mass fingerprinting revealed the molecular identity of the enzyme as the predicted *T. cruzi* aminopeptidase EAN97960, the product of the Tc00.1047053508799.240 gene. Molecular and enzymatic analysis indicated that this leucyl aminopeptidase of *T. cruzi* (LAPTc) belongs to the peptidase family M17 or leucyl aminopeptidase family. LAPTc has a strong dependence on neutral pH, is mesophilic and retains its oligomeric form up to 80 °C. Conversely, its recombinant form produced in *E. coli*, like other LAPs, is thermophilic and requires alkaline pH. The activity of this metalloaminopeptidase is inhibited by bestatin and metal chelants such as 1,10-phenanthroline, is restored by Zn²⁺, and potentiated by Mn²⁺ or Ca²⁺. The enzyme is expressed by all *T. cruzi* forms and localizes within vesicles in the cytoplasm of the parasite. Since biosynthetic pathways for essential amino acids, including leucine, are lacking in *T. cruzi*, LAPTc could have a function in nutritional supply. Furthermore, the peptidase activity could also play a role in peptide and protein processing. We postulate that the LAPTc might be a potential target for the development of new drugs to treat *T. cruzi* infection.

Lista de abreviaturas

°C	grau Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
Å	angstrom
AMC	7-amino-4-metil-cumarina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
bp	pares de bases
Da	Dalton
DAPI	4'6-diamidino-2-phenilyndole
DFP	diisopropilfluorofosfato
DH5α	linhagem celular de <i>E. coli</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
E-64	L-trans-epoxisuccinileucilamido (4-guanidino)-butano
EC	<i>Enzyme comission</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	etilenoglicol-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N' - ácido tetracético
ELISA	ensaio de ligação imunoenzimática (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
EPNP	1,2-epoxi-3-(<i>p</i> -nitrofenoxi)
FPLC	cromatografia líquida e rápida de proteínas
g	grama
h	hora
Hepes	ácido (2-hidroxietil)-piperazina etanosulfônico
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HTE	tampão Hepes-Tris-Etanolamina
IgG	imunoglobulina G
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

kb	kilobase
k_{cat}	constante catalítica
k_{cat}/K_m	eficiência catalítica
kDa	kilodalton
K_m	constante de Michaelis-Menten
L-6	célula muscular murina
LAP	Leucil-aminopeptidase
LB	meio de cultura Luria-Bertani
LIT	Liver Infusion Tryptose
mg	miligrama
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
NBT	nitro-azul-tetrazólico
ng	nanograma
nM	nanomolar
nm	nanômetro
N-terminal	extremidade amino-terminal da cadeia polipeptídica
OD	densidade óptica
ORF	fase aberta de leitura
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	tampão fosfato 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,2
p CMB	<i>para</i> -cloromercuriobenzoato
PCR	reação de polimerização em cadeia
PDB	banco de dados de proteína
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoreto
rpm	rotações por minuto
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

TLCK	n- α -Tosil-L-Lisina clorometil cetona
TPCK	n- α -Tosil-L-Fenilalanina clorometil cetona
UV	ultravioleta
V	volt
V_{\max}	velocidade máxima
W	watt
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo

Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
Cys	Cisteína
Glu	Ácido glutâmico
His	Histidina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Ser	Serina

Sumário

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de abreviaturas	v
Sumário	viii
Introdução	1
Doença de Chagas.....	2
- Vias de transmissão.....	2
- Desenvolvimento da doença.....	3
- Diagnóstico da patologia.....	4
- Tratamento da infecção.....	5
- Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
Peptidases.....	10
- Serino-peptidases (EC 3.4.21).....	13
- Cisteíno-peptidases (EC 3.4.22).....	14
- Aspártico-peptidases (EC 3.4.23).....	15
- Metalo-peptidases (EC 3.4.24).....	16
- Treonino-peptidases (EC 3.4.25).....	17
- Glutâmico-peptidases.....	18
Amino-peptidases (EC 3.4.11).....	18
- Leucil-amino-peptidase (EC 3.4.11.1).....	20
- Amino-peptidases termofílicas.....	21
Peptidases de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
- Cruzipaína (Cz).....	23
- Oligopeptidase B (OPB).....	25
- Prolil-oligopeptidase (POP-Tc80).....	25
- Catepsina B.....	26
Proteases como alvo de drogas.....	28
Justificativa.....	29
Objetivo	31
Objetivo.....	32
Atividades.....	32
Nota técnica	33
Materiais e Métodos	34
Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
Amplificação dos genes da leucil amino-peptidase de <i>Trypanosoma cruzi</i> por PCR.....	35

Clonagem dos genes amplificados nos vetores de expressão.....	36
Análise filogenética	38
Expressão das proteínas recombinantes	39
Purificação das enzimas recombinantes LAPTc1 e LAPTc2.....	40
- Preparação do extrato total e sonicação	40
- Cromatografia de afinidade em coluna de níquel.....	40
- Cromatografia de exclusão molecular em coluna de filtração em gel	40
Eletroforese de amostras da LAPTc2 em gel de poliacrilamida	41
- Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE)	41
- Eletroforese não-desnaturante (PAGE).....	41
Eletroforese para determinação de atividade enzimática em géis (zimograma)	42
Determinação de atividade proteolítica	42
- Influência do pH	42
- Influência da temperatura	43
- Termoestabilidade enzimática	43
- Efeito de inibidores	43
Determinação das velocidades de hidrólise de Leu-AMC em diferentes concentrações, e cálculos da constante de Michaelis-Menten (K_m), velocidade máxima (V_{max}), constante catalítica (k_{cat}) e eficiência catalítica (k_{cat}/K_m)	44
Produção de anticorpos em camundongos.....	44
Immunoblot	45
Imunocitocalização.....	45
Resultados	46
Os produtos de PCR de <i>laptc1</i> e <i>laptc2</i> possuem tamanhos preditos.....	47
Os fragmentos amplificados foram corretamente ligados ao vetor de clonagem	47
Clonagem dos genes da LAP de <i>T. cruzi</i> em vetor de expressão	49
Análise filogenética	51
Expressão e purificação da leucil aminopeptidase recombinante de <i>T. cruzi</i>	54
A estrutura oligomérica da LAPTc recombinante é sensível a SDS	55
A leucil-aminopeptidase recombinante de <i>T. cruzi</i> possui atividade ótima em pH alcalino	56
A rLAPTc é sensível a inibidores de metalo-peptidases e a agentes quelantes	57
A estrutura oligomérica da rLAPTc é formada por um hexâmero	58
Parâmetros cinéticos da rLAPTc hexamérica.....	59
LAPTc recombinante é imunogênica em camundongo	60
Imunocitocalização da LAPTc	61
Manuscrito	63
The major leucyl aminopeptidase of <i>Trypanosoma cruzi</i> (LAPTc) assembles into a homohexamer and belongs to the M17 family of metallopeptidases.....	64
INTRODUCTION.....	65
EXPERIMENTAL PROCEDURES	66

Parasites and preparation of enzyme extract	66
Assay of peptidase activity	67
LAPTc purification and electrophoretic analysis	67
Identification of <i>T. cruzi</i> aminopeptidase by peptide mass fingerprinting.....	68
Phylogenetic relationship of LAPTc with other LAPs.....	68
Cloning and expression of the recombinant enzyme (rLAPTc).....	69
Molecular organization assay - analytical ultracentrifugation and light scattering .	69
Assay of optimal pH and temperature for activity and thermostability of LAPTc ...	70
Inhibition pattern and cation dependence of LAPTc.....	70
Analysis of expression and immunocytolocalization of LAPTc	71
RESULTS.....	72
<i>T. cruzi</i> enzyme extract mediates hydrolysis of the aminopeptidase substrate Leu-AMC	72
Leucyl aminopeptidase is assembled into a homo-oligomer.....	72
Mass spectrometry identification of the purified aminopeptidase.....	74
LAPTc assembles into a hexamer	77
Recombinant and native forms of LAPTc display distinct activity features	80
LAPTc retains its oligomeric structure after losing activity	82
LAPTc is a metalloaminopeptidase.....	82
LAPTc is expressed as an oligomer and localizes inside vesicles.....	83
DISCUSSION.....	84
Discussão	90
Conclusões.....	100
Referências bibliográficas.....	102

Introdução

Doença de Chagas

A Doença de Chagas, ou Tripanossomíase Americana, é endêmica na América Latina. É causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* que é transmitido aos hospedeiros vertebrados por vetores triatomíneos conhecidos popularmente como barbeiros ou chupanças. Nas últimas décadas, medidas de controle da doença e combate aos vetores conseguiram reduzir o número de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* em muitas áreas do Brasil, Argentina, Uruguai, Chile e outros países endêmicos, conforme dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005). No entanto, o parasito, que é nativo das Américas, permanece endêmico em várias outras regiões silvestres, alcançando áreas desde os EUA até a Patagônia (Kribs-Zaleta, 2010). Passado um século de sua descoberta pelo brasileiro Carlos Chagas (Chagas, 1909), a doença ainda é epidemiologicamente relevante, afetando uma população estimada que varia de 10 a 14 milhões de pessoas em 18 países no Continente Americano, predominantemente na América Latina, (Coura, 2007 e Dias, 2007, WHO, 2009). Há ainda dezenas de milhões de pessoas vivendo em áreas de risco (WHO, 2005 e Castro *et alii*, 2006). Estima-se que milhares de pessoas infectadas podem estar vivendo também na América do Norte, Europa e outros países como resultado da intensificação da atividade migratória (Schmunis, 2007), demonstrando que a doença de Chagas representa um problema de saúde pública mundial e de grande importância sócio-econômica.

- Vias de transmissão

O *T. cruzi* pode ser transmitido ao hospedeiro humano por diferentes vias, mas a forma de transmissão mais comum é via vetorial, como acontece em 80-90% dos casos (Castro *et alii*, 2006). No entanto, a doença pode ser transmitida também por transfusão sanguínea, transmissão congênita vertical pela placenta e, mais recentemente relatado, via transmissão oral pela ingestão de alimentos contaminados como o suco de açaí e o caldo de cana (Cardoso *et alii*, 2006 e Dias, 2006). Outras formas de contaminação menos comuns são representadas por acidentes de laboratório, transplante de órgãos infectados e outras formas (Lana e Tafuri, 2005). Transmissões por transplante e por transfusão são preocupações de saúde pública em países não-endêmicos

como Austrália, Espanha, Canadá e EUA (Schmunis, 2007). O modo de infecção mais comum envolve o processo de alimentação do vetor triatomíneo, que se contamina ao sugar o sangue de animais hospedeiros infectados, tais como roedores, marsupiais, aves e até o homem. Os parasitos então passam a viver no intestino do inseto onde sofrem transformações e são liberados durante o repasto sanguíneo quando o inseto defeca no hospedeiro, podendo resultar em nova transmissão (Kribs-Zaleta, 2010).

- Desenvolvimento da doença

A doença de Chagas pode se desenvolver em três fases: aguda, indeterminada (latente) e crônica. A fase aguda da doença normalmente é assintomática, mas pode apresentar algumas manifestações como febre, mal-estar e dor de cabeça. Esta fase é caracterizada por ser de curta duração (7 a 30 dias) e ter uma grande quantidade de parasitos na corrente sanguínea, o que pode levar à morte do paciente. Quando a transmissão é de forma vetorial, no local da picada ocorre uma reação inflamatória e forma-se uma lesão volumosa na pele chamada de chagoma. Se a picada acontece na região dos olhos, a lesão é conhecida como sinal de Romana e é caracterizada por um edema na pálpebra com congestão conjuntival e inflamação dos linfonodos. Sintomas como hepatomegalia, esplenomegalia, insuficiência cardíaca e meningo-encefalite podem ocorrer ocasionalmente nesta fase (Castro *et alii*, 2006). Na grande maioria dos indivíduos infectados, os sintomas que aparecem durante a fase aguda da doença desaparecem naturalmente em um período de 3 a 8 semanas (Bern *et alii*, 2007; Kirchoff, 2009 e Rassi *et alii*, 2010).

Os indivíduos que resistem à fase aguda evoluem para a fase indeterminada (Castro *et alii*, 2006), que pode ser assintomática ou sintomática, podendo manter a infecção de forma latente e sem sintomas por vários anos (Lana e Tafuri, 2005). Nesta fase da infecção pelo parasito, os indivíduos assintomáticos não apresentam evidências clínicas de doença no coração e no tubo digestivo (Junqueira Jr., 2002), tem eletrocardiograma normal, mas mostram exames sorológicos e parasitológicos positivos (Andrade, 1985). Ela acontece logo após a fase aguda e tem uma longa duração (10 a 30 anos) sem que o indivíduo infectado sinta os sintomas.

A fase crônica da infecção pode manifestar-se como cardíaca, digestiva ou ambas simultaneamente. Caracteriza-se por apresentar baixa parasitemia e ausência de febre. A forma cardíaca da fase crônica sintomática da doença manifesta uma grande quantidade de sintomas que acometem os pacientes, tais como cardiomegalia, espessamentos nodulares do epicárdio, dilatação das válvulas mitral e tricúspide, hipertrofia das paredes de átrios e ventrículos, miocardite, arritmias, insuficiência cardíaca e tromboembolismo (Lana e Tafuri, 2005). Além disso, manifestações clínicas da doença podem se associar a lesões no sistema nervoso periférico. Na forma digestiva, as pessoas infectadas apresentam dilatações permanentes de víscera e canais provocando sintomas como megaesôfago, megacólon, entre outros.

Dos indivíduos acometidos pela doença que passam pela fase aguda, 60-80% não desenvolvem os sintomas (fase indeterminada), enquanto os 20-40% restantes desenvolvem os sintomas das formas cardíaca e/ou digestiva. Além disso, a doença avança diretamente da fase aguda para a fase crônica sintomática em cerca de 10% das pessoas infectadas (Bern *et alii*, 2007; Rassi *et alii*, 2010). Recentemente foi demonstrado que os minicírculos do DNA do cinetoplasto do parasito integram-se ao genoma da célula hospedeira, podendo refletir consequências nos mecanismos auto-imunes que acompanham a fase crônica doença de Chagas (Nitz *et alii*, 2004). As integrações das sequências de kDNA do parasito ao genoma do hospedeiro humano ocorre em elementos retrotransponíveis LINE-1 de vários cromossomos e estes eventos ocorrem de forma vertical. A transferência do material genético do *T. cruzi* para o genoma humano e sua subsequente herança indica uma mudança significativa no conceito da biologia evolutiva (Hecht *et alii*, 2010).

- Diagnóstico da patologia

O diagnóstico da doença de Chagas atualmente é realizado por diversos métodos sorológicos ou parasitológicos (Kribs-Zaleta, 2010). Dentre os exames parasitológicos estão a hemocultura, o esfregaço e o xenodiagnóstico. Já os testes sorológicos são representados pela reação de hemaglutinação, ELISA e Imunofluorescência indireta para detectar anticorpos no soro. Um método molecular mais recente, de alta sensibilidade, que detecta o DNA do parasito

no sangue de pacientes por PCR vem sendo bastante aplicado para diagnosticar a doença. O nível de parasitemia é determinante para a escolha do método mais apropriado a ser empregado. Com isso, os exames são dependentes da fase em que o indivíduo infectado se encontra. Na fase aguda, os métodos parasitológicos como xenodiagnóstico e hemocultura, e os sorológicos, além do método molecular por PCR, são usados para detectar o parasito. Durante a fase crônica, os testes parasitológicos são úteis na detecção do *T. cruzi*, embora esses métodos sejam significativamente menos sensíveis que o teste molecular por PCR e os exames sorológicos para o diagnóstico durante a fase crônica. O nível de parasitemia baixo limita a sensibilidade do método por PCR; um resultado negativo não confirma um diagnóstico negativo (Sosa-Estani *et alii*, 2009).

- Tratamento da infecção

Atualmente, o tratamento da infecção pelo agente etiológico da doença de Chagas é considerado pouco eficaz, pois as drogas disponíveis são insatisfatórias devido aos efeitos tóxicos e a eficiência limitada (Urbina, 2002). O objetivo da sociedade científica mundial é estabelecer um tratamento satisfatório e não-invasivo aos indivíduos infectados pela doença, com o emprego de uma droga que não produza efeitos colaterais aos pacientes e combata exclusivamente o parasito, nas diferentes fases da doença.

No entanto, existem dois compostos quimioterápicos principais disponíveis para o tratamento da infecção pelo *T. cruzi*, o Benzonidazol [N-(benzil-2-nitro-imidazolacetamida)] da Rochagan[®]-Rodanil[®]-Roche e o Nifurtimox [4-(5-nitro-furilidenoamino-) tetrahydro-4-4-1, 4-tiazina-1-1-dióxido] da Lampit[®]-Bayer. Esses medicamentos, baseados em nitrofuranos, são indicados especialmente para os casos agudos visando reduzir ou erradicar a infecção, já que nesta fase os parasitos encontram-se em grande número e circulantes na corrente sanguínea dos infectados. A taxa de cura observada em pacientes após tratamento com essas drogas é de 50-70% durante a fase aguda e de no máximo 20% durante a fase crônica (Guedes *et alii*, 2006).

Estudos realizados para analisar a tolerância e eficácia do nifurtimox e do benzonidazol em pacientes nas fases aguda e crônica da doença de

Chagas mostraram que ambos os medicamentos apresentaram efeitos colaterais significantes. O nifurtimox mostrou ter efeitos mais intensos e diversificados mesmo em concentrações mais baixas que a recomendada, enquanto que o benzonidazol mostrou ser mais eficaz e apenas em casos agudos da doença, sendo pouco satisfatório na fase crônica (Coura *et alii*, 1997 e Guedes *et alii*, 2010). No entanto, alguns estudos sugerem que o tratamento com benzonidazol poderia retardar a progressão das manifestações clínicas e funções cardíacas durante a fase crônica (Viotti *et alii*, 1994 e 2006; Fabbro de Suasnabar *et alii*, 2000). Ambas as drogas apresentaram efeitos colaterais significantes incluindo náuseas, vômitos, anorexia, perda de peso, polineuropatia, alergias cutâneas e dermatites (Suasnábar *et alii*, 2000; Rassi *et alii*, 1999; Urbina, 1999 e Cançado, 1980; citados em Guedes *et alii*, 2006), além de serem considerados drogas tóxicas e carcinogênicas (Teixeira *et alii*, 1985 e 1990, citados em Coura *et alii*, 1997), já que a toxicidade das drogas atinge tanto o parasito quanto as células do hospedeiro mamífero (Docampo e Moreno, 1984 e Gorla *et alii*, 1989). Algumas linhagens de *T. cruzi* não respondem a esses tratamentos, mesmo na fase aguda da doença (Urbina, 1999). Apesar da necessidade do tratamento ser prolongado (60 dias) para atingir sua eficácia, infelizmente os efeitos não esperados podem levar a sua interrupção por parte dos infectados (Coura e Castro, 2002 e Rassi *et alii*, 2009).

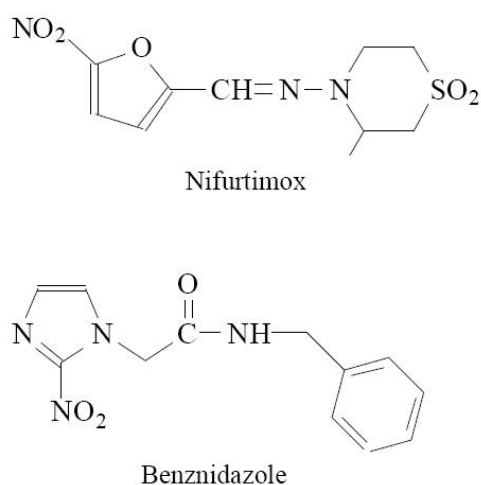


Figura 1. Estrutura molecular das drogas Nifurtimox e Benzonidazol, usadas para o tratamento da doença de Chagas.

Diante das limitações das drogas citadas acima, muitos estudos estão sendo conduzidos na tentativa de identificar e desenvolver novos agentes terapêuticos alternativos e potenciais para o tratamento da doença de Chagas (Urbina, 2009 e Guedes *et alii*, 2010). Com isso, o alvo das pesquisas está na bioquímica das vias metabólicas do parasito mais vulneráveis a ação de fármacos que minimize efeitos colaterais ao hospedeiro. Desta forma, as terapêuticas mais atuais envolvem o metabolismo das purinas (El Kouni, 2003), compostos de rutênio (Silva *et alii*, 2010), doadores de óxido nítrico (Guedes *et alii*, 2010) e o uso de derivados azólicos, como inibidores da biossíntese de esteróis (Urbina, 2009).

Apesar da transmissão vetorial da doença estar controlada em algumas regiões endêmicas da América Latina, a ausência de tratamento satisfatório e a falta de vacina transformam a situação em um grande desafio a ser enfrentado (Lannes-Vieira, 2009). Dentro deste contexto, existe uma grande necessidade de desenvolver novas drogas que sejam seguras e eficazes para o uso em humanos. Portanto, a identificação de novos alvos e o desenho de drogas promissoras são os maiores desafios para o tratamento da doença de Chagas (Silva *et alii*, 2010).

O conhecimento produzido ainda não se reverteu de forma efetiva em avanços terapêuticos, como novos fármacos, métodos de diagnósticos e/ou vacinas, por exemplo, apontando a necessidade de institucionalizar mecanismos que levem os produtores a desenvolver pesquisas para o tratamento de doenças próprias da realidade sanitária dos países pobres.

As doenças negligenciadas são um problema global de saúde pública, contudo, os centros de pesquisa e desenvolvimento (P&D) das indústrias farmacêuticas são quase sempre focados nas doenças globais, para as quais medicamentos podem ser produzidos e comercializados com geração de maiores lucros. Com baixo poder aquisitivo e sem influência política, os pacientes e sistemas de saúde de países subdesenvolvidos não conseguiriam gerar o retorno financeiro exigido pela maior parte das empresas que desenvolvem medicamentos (Moran *et alii*, 2009). Além disso, medicamentos atualmente disponíveis são de difícil acesso a alguns países menos

desenvolvidos e se observa uma crescente resistência da enfermidade com o seu uso na terapêutica (WHO, 2009).

Entre 1975 e 2005, apenas 21 medicamentos foram registrados para doenças tropicais, nenhuma para doença de Chagas, constituindo estas, mais de 11% da carga global de doenças. Essa situação deve-se ao perfil do doente. A doença de Chagas é uma enfermidade “silenciosa” porque atinge pacientes de populações das áreas rurais, que não têm voz e têm muito pouca consciência de seu direito ao tratamento. Há aí uma negligência social e política por parte da indústria farmacêutica, dos governos e da mídia. A doença é silenciosa porque atinge uma população silenciosa. A epidemiologia é outro sinal do descaso, uma vez que todos os números da doença são baseados em estimativas. Segundo fontes oficiais, a ocorrência varia de 8 milhões a 14 milhões de pessoas no mundo, essencialmente nos 21 países endêmicos latino-americanos, onde são estimadas 14 mil mortes por ano. Sabemos que muitas dessas mortes são notificadas como cardiopatias, não como resultado de Chagas. A forma mais comum é a morte súbita, ou seja, as pessoas nem sabem que têm a doença. E ainda há o risco de 100 milhões de pessoas contraírem a doença. Epidemiologicamente falando, há também um fato importante a ser considerado: atualmente, devido à crescente mobilidade das pessoas, encontramos casos nos Estados Unidos, Canadá, Austrália, Japão e Europa. Está havendo uma globalização da doença. O paradigma de que Chagas é um mal latino-americano está caindo. (Castilhos, 2009). Durante o mesmo período (1975 a 2005), para outras doenças foram registrados 1.535 medicamentos (Leonardi *et alii*, 2006; DNDia, 2009). Vários centros de pesquisas e órgãos de saúde, como Instituto Pasteur (França); Instituto de Pesquisa Médica do Quênia; Ministério da saúde da Malásia; Médicos sem fronteiras (Internacional); Fundação Oswaldo Cruz (Brasil), Centro de Otimização de Candidatos a Medicamentos, Epichem (Austrália), Universidade de Murdoch (Austrália), Universidade Federal de Pernambuco (Brasil) e Universidade Federal de Ouro Preto (Brasil), se empenham, tanto para a melhora do tratamento atual, quanto para a criação de novos fármacos, com planos de ação para garantir que novos medicamentos sejam desenvolvidos e que os que já existem para o tratamento de doenças negligenciadas, em

especial a doença de Chagas, possam se tornar acessíveis à população (DNDib, 2009).

Embora as perspectivas em relação à P&D de medicamentos para as doenças negligenciadas tenham melhorado a partir de 2003, as necessidades dos pacientes nos países em desenvolvimento ainda estão longe de serem atendidas.

- Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado inicia-se quando o inseto vetor contaminado, ao se alimentar do sangue do hospedeiro durante o repasto, elimina as formas tripomastigotas metacíclicas em suas fezes e urina. A picada causa irritação local no homem que, ao coçar, espalha os dejetos depositados pelo inseto sobre o ferimento e/ou mucosas. Desta forma, os tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes penetram no hospedeiro, atingindo sua corrente sanguínea. As formas tripomastigotas circulantes invadem as células de tecidos do hospedeiro por meio de vários eventos moleculares da interação entre o parasito e a célula hospedeira, levando a uma mobilização intracelular de Ca^{2+} em ambas as células (Docampo *et alii*, 1996; Burleigh e Andrews, 1998; Yoshida, 2003; Yoshida, 2006). Dentro das células do hospedeiro, os tripomastigotas se diferenciam em formas amastigotas. De forma assexuada, os amastigotas intracelulares sofrem sucessivas divisões binárias e se transformam em tripomastigotas flagelados, que rompem as células e caem na corrente sanguínea do hospedeiro. As formas flageladas dos tripomastigotas são capazes de invadir diferentes células e propagar a infecção no corpo (Brenner *et alii*, 2000). Livres na circulação do hospedeiro, os tripomastigotas podem começar um novo ciclo ao invadir células vizinhas (Burleigh e Woolsey, 2002) ou quando são sugados por triatomíneos que se alimentam do sangue contaminado. No aparelho digestivo dos insetos, os tripomastigotas diferenciam-se em formas epimastigotas replicativas e, em seguida, transformam-se em formas tripomastigotas metacíclicas infectantes, completando o ciclo.

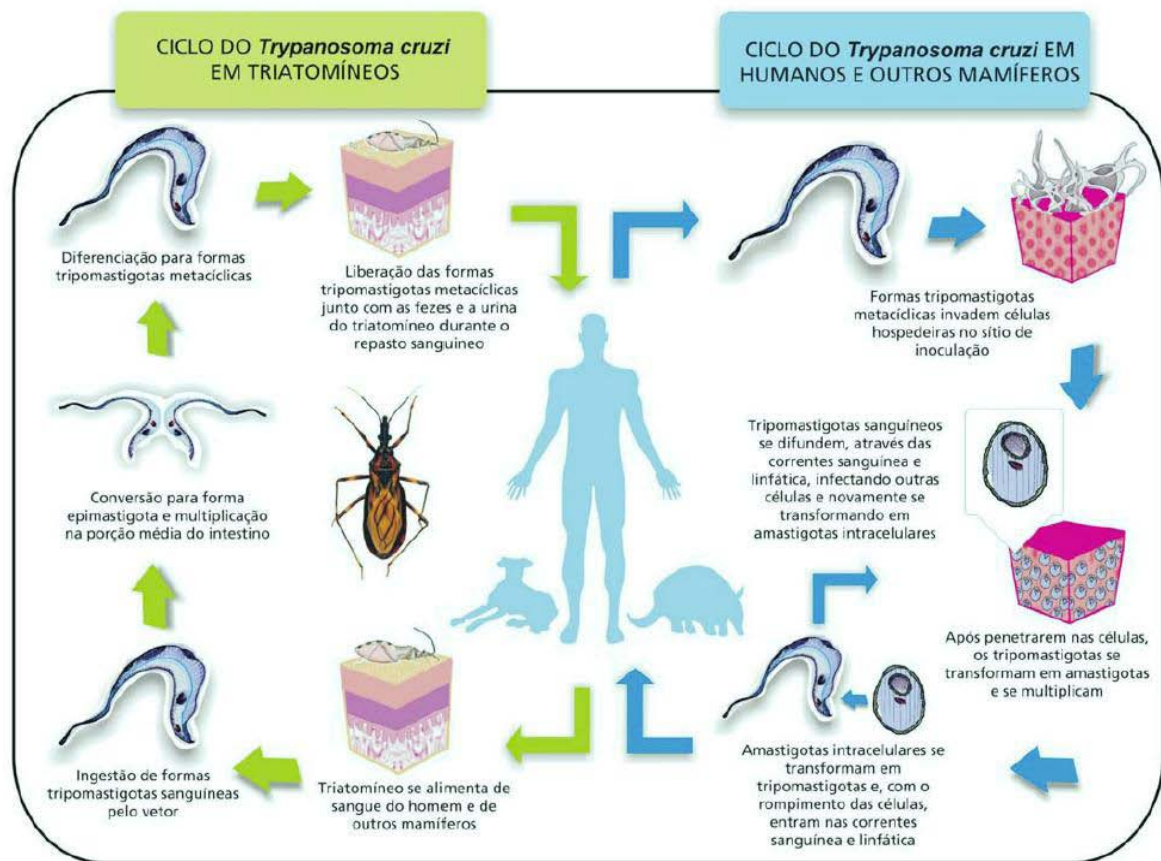


Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: ARGOLO *et alii*, 2008. Disponível em <[http://www.fiocruz.br/chagas/media/Versao em Portugues.pdf](http://www.fiocruz.br/chagas/media/Versao%20em%20Portugues.pdf)>. Acesso em: 26 julho 2010.

Peptidases

As proteases, também chamadas de peptidases, como recomendado pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas e cadeias polipeptídicas (Turk, 2006).

As enzimas proteolíticas estão presentes em todos os sistemas biológicos, desde vírus até os eucariotos superiores. Elas são essenciais para a homeostase celular e desempenham um papel fundamental na regulação de diversos processos biológicos como digestão, coagulação sanguínea, processamento hormonal, processamento de precursores relacionados à síntese de colágeno, renovação proteica, morte celular programada, e outros processos biológicos (Dickinson, 2002 e Chang *et alii*, 2007).

As peptidases são usadas em uma grande variedade de aplicações, principalmente na produção de detergentes e na indústria alimentícia. Visando desenvolver tecnologias que não agridem o meio ambiente, o uso das peptidases está sendo aplicado no tratamento de couro e em muitos processos de biorremediação. As peptidases também são usadas extensivamente na indústria farmacêutica para o desenvolvimento de medicamentos. As peptidases que são usadas na indústria alimentícia e na fabricação de detergentes são preparadas em grandes quantidades e usadas como preparações brutas, enquanto aquelas que são usadas na medicina são produzidas em pequenas quantidades e exigindo extensa purificação antes de serem utilizadas (Ráo *et alii*, 1998).

De acordo com a localização da ação catalítica, as enzimas proteolíticas podem ser classificadas como exopeptidases ou endopeptidases (Hooper, 2002 e Rawlings *et alii*, 2006). Contudo, existem peptidases que possuem tanto atividade exopeptídica quanto endopeptídica. As exopeptidases catalisam a clivagem de seus substratos a partir de sua porção carboxi- ou amino-terminal e, portanto, podem ser subdivididas em aminopeptidases e carboxipeptidases (Barrett, 1980). As endopeptidases, também chamadas de proteinases, catalisam a clivagem de ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos internos de uma cadeia polipeptídica (Barrett e McDonald, 1986). Existem também as omega-peptidases, que não necessitam de um resíduo livre em N- ou C-terminal do substrato. Elas hidrolisam peptídeos ou dipeptídeos que são ligados por pontes isopeptídicas em ambas as extremidades (Rawlings *et alii*, 2008). As peptidases também podem ser classificadas quanto às suas especificidades, seus mecanismos catalíticos e suas relações evolutivas (Barrett e Rawlings, 1991).

Dois sistemas para a classificação das enzimas proteolíticas estão sendo usados: o sistema EC (Enzyme Commission) da IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) e o sistema MEROPS de famílias e clãs de peptidases (Barrett, 2001). No sistema EC, as enzimas estão divididas em seis classes: (1) Oxidoredutases, (2) Transferases, (3) Hidrolases, (4) Liases, (5) Isomerases e (6) ligases. As peptidases são classificadas como hidrolases e formam a subclasse 3.4 (Barrett, 2001). De acordo com o mecanismo catalítico, que está relacionado ao principal resíduo funcional do

grupo químico envolvido no processo de hidrólise, as endopeptidases podem ser descritas como aspártico-peptidases, cisteíno-peptidases ou treonina-peptidases quando em geral agem intracelularmente e em pH ácido, ou como tipos serino-peptidases ou metalo-peptidases quando normalmente atuam em meio extracelular e de pH neutro (Cawston e Wilson, 2006). Atualmente, existem sete tipos de peptidases dentro desta forma de classificação. Os tipos das treonina-peptidases (Abadjieva *et alii*, 2000) e das glutâmico-peptidases (Fujinaga *et alii*, 2004) foram adicionados recentemente ao grupo, juntamente com o grupo de peptidases de processo catalítico desconhecido. O sistema EC está sendo considerado o principal tipo de classificação empregado e relaciona a especificidade do substrato com o mecanismo catalítico (Barrett e Rawlings, 1991).

O sistema MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) de classificação de peptidases foi desenvolvido em 1993 (Rawlings e Barrett, 1993) e publicado em 1996 como bancos de dados na rede mundial de computadores (Barrett, 2001). Nele, as peptidases são identificadas, classificadas e distribuídas de forma hierárquica em clãs e famílias, baseado na relação evolutiva e na estrutura das enzimas (Rawlings *et alii*, 2009). Cada peptidase possui um código identificador que começa com uma letra indicadora do tipo catalítico da peptidase (A: aspártico, C: cisteíno, M: metalo, S: serino, T: treonino, U: desconhecido ou P: mais de um dos tipos T, C e S). O identificador do clã é complementado por uma segunda letra adicional, escrita em sequência (Ex: MF). O identificador da família é complementado por um número (Ex: M1). No banco de dados do MEROPS, o identificador de cada peptidase começa com o identificador da família e é completado com um número decimal (Ex: M08.001) (Barrett, 2001).

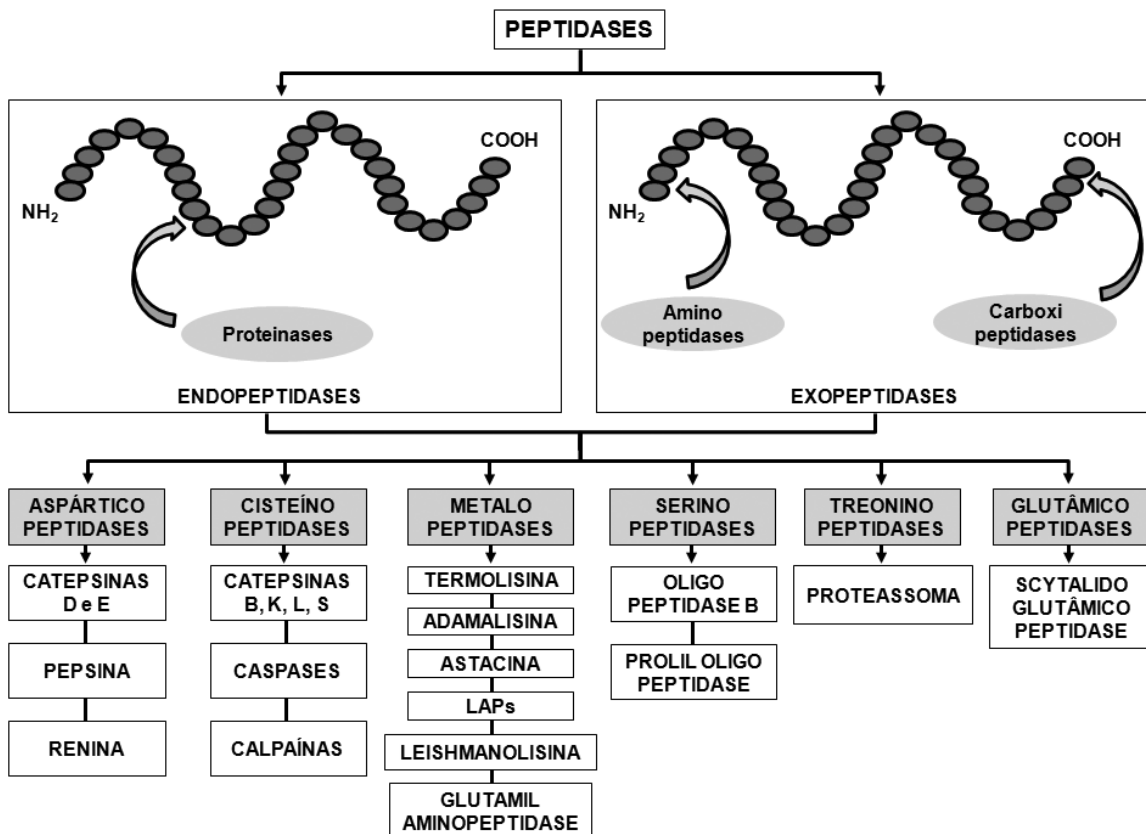


Figura 3. Esquema de classificação das peptidases. As caixas cinzas representam as classes e as caixas claras são exemplos das referidas classes.

- Serino-peptidases (EC 3.4.21)

A família das serino-peptidases, a mais estudada, é caracterizada por conter um resíduo de serina no sítio ativo de suas enzimas (Pham, 2006). O mecanismo catalítico das serino-peptidases inicia-se com o ataque nucleofílico de ligações peptídicas pelo resíduo de serina, formando um grupo éster como intermediário covalente. Resíduos de cisteína, treonina ou moléculas de água associadas a um aspartato também atacam como um nucleófilo no lugar da serina, assim como um resíduo de histidina pode aparecer como complemento deste processo. A tríade catalítica característica das serino-peptidases é formada pelas cadeias laterais dos resíduos de serina, histidina e aspartato.

As maiores famílias desta classe são a S1, a S8 e a S9, representadas pela quimotripsina, subtilisina e prolil oligopeptidase, respectivamente. Elas apresentam atividade máxima em ambientes com pH entre neutro e levemente

alcalino e são inibidas por Diisopropilfluorofosfato (DFP). Muitas apresentam sensibilidade a Fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), aprotinina, n- α -Tosil-L-Lisina clorometil cetona (TLCK) e n- α -Tosil-L-Fenilalanina clorometil cetona (TPCK) (Bond e Butler, 1987). A família S1 é formada por enzimas proteolíticas envolvidas nos processos digestivos de mamíferos, como a tripsina, a quimotripsina e a elastase. Outras enzimas que participam da cascata de coagulação sanguínea e do sistema complemento estão incluídas nesta família (Rawlings e Barrett, 1995). A família S8 é composta por enzimas bacterianas, como a subtilisina, e por peptidases relacionadas encontradas em fungos, plantas e animais (Rawlings e Barrett, 1995). Elas têm papel no processamento de peptídeos sinalizadores como os hormônios adrenocorticotrópicos humanos (Barrett e Rawlings, 1991).

As serino-peptidases também participam de vários outros processos fisiológicos e patológicos. Por exemplo, o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) está envolvido em processos importantes como dissolução de coágulos sanguíneos, remodelamento da matriz extracelular, angiogênese, cicatrização de feridas, invasão de tumor e metástase (Walker e Lynas, 2001). O uPA participa da conversão do plasminogênio em plasmina, que é uma enzima que degrada fibrina e proteínas da matriz extracelular e da cartilagem (Jin *et alii*, 2003).

- Cisteíno-peptidases (EC 3.4.22)

As cisteíno-peptidases formam um grupo de enzimas que contém um resíduo de cisteína localizado no sítio ativo, que é composto normalmente pela tríade catalítica Cys-His-Asn. Em geral, elas estão localizadas no citossol e em compartimentos lisossomais de diversos tecidos de animais, plantas e microorganismos. Em células de mamíferos, as famílias das caspases e da calpaína localizam-se no citoplasma enquanto as famílias das catepsinas e da legumaina encontram-se alojadas em compartimentos lisossomais (Chang *et alii*, 2007). Em células de mamíferos, Apesar de exibir atividade endopeptidásica (Barrett *et alii*, 1998), algumas são classificadas como carboxipeptidases (Turk *et alii*, 2001).

Algumas famílias principais do grupo são de importância médica tais como: família C1 da papaína que está relacionada à osteoporose, respostas imunes e progressão e metástase do câncer; família C3 da picornaína que está envolvida na hepatite e na poliomielite; família C13 da legumaína que está associada com a apresentação de antígenos; família C14 das caspases que possuem papel crucial como mediadoras de apoptose; família C10 da streptopaína e C25 da gingipaína são importantes nas doenças infecciosas (McKerrow *et alii*, 1993 e 1999; Krepela, 2001; Barrett e Rawlings, 2001; Rawlings *et alii*, 2006). A papaína, pertencente à família C1, é a enzima mais estudada do grupo das cisteíno-peptidases. As calpaínas (família C2), enzimas dependentes de cálcio, apresentam estruturas altamente conservadas e são encontradas em animais vertebrados e invertebrados. Além disso, mostram alta homologia em sua região C-terminal com a família das calmodulinas em consequência da presença de um sítio de ligação ao cálcio, responsável pelo efeito do cálcio na atividade (Barrett e Rawlings, 1991).

As cisteíno-peptidases possuem o sítio ativo composto por uma tríade catalítica, onde um intermediário covalente é formado após a ação de ativação do resíduo de cisteína por um resíduo de histidina em um nucleófilo (Dunn, 2001). Essa classe de enzimas proteolíticas é fortemente inibida por p-cloromercuriobenzoato (pCMB) e L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano (E-64), além de outros agentes tais como iodoacetamida, leupeptina, cistatina e quimostatina (Bond e Butler, 1987).

- Aspártico-peptidases (EC 3.4.23)

Esta classe é formada geralmente por enzimas extracelulares encontradas em grande parte em organismos eucariotos. Porém, elas também são encontradas em bactérias e vírus. As aspártico-peptidases apresentam melhor atividade em pH ácido o que nos leva a acreditar que os grupos carboxilas estão diretamente envolvidos no mecanismo catalítico. Neste grupo aparecem enzimas digestivas como a pepsina, quimosina, renina e a retropepsina. Suas massas moleculares variam entre 30 a 40 kDa, podendo chegar até a 80 kDa, como é o caso da Catepsina E, e são inibidas

especificamente por pepstatina A ou por compostos de diazoacetil (Barrett e Rawlings, 1991).

A catepsina D, integrante bem conhecida desta classe, participa da digestão de proteínas e peptídeos localizados nos compartimentos ácidos dos lisossomos (Fusek e Vetvicka, 2005). A catepsina D também está envolvida no processamento de hormônios, neuropeptídeos e antígenos, funcionando como um alvo que permite modular doenças auto-imunes (Lkhider *et alii*, 2004; Fusek e Vetvicka, 2005 e Chapman, 2006). As aspártico-peptidases formam um grupo de enzimas que possuem o aparato catalítico composto por dois resíduos de ácido aspártico. Na pepsina, esses resíduos encontram-se nas posições Asp-32 e Asp-215 (Dunn, 2001). As enzimas desta classe atuam sobre ligações peptídicas flanqueadas por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. O mecanismo catalítico das aspártico-peptidases durante a catálise da clivagem de ligações peptídicas é realizado sem o uso de ataques nucleofílicos por um grupo funcional das enzimas. Assim, uma molécula de água aparece fortemente ligada entre o par de resíduos de ácido aspártico (Hofmann *et alii*, 1984).

- Metallo-peptidases (EC 3.4.24)

As metallo-peptidases formam a classe enzimática considerada a mais primitiva, que se caracteriza pela necessidade de um cátion divalente presente no sítio ativo das enzimas. Normalmente este íon é o zinco, mas outros íons metálicos como cobalto, magnésio, cálcio e níquel podem aparecer substituindo o zinco sem perder a atividade. O íon metálico divalente é usado para proporcionar uma forte atração eletrofílica que ajuda no ataque hidrolítico de uma molécula de água (Dunn, 2001). As famílias das metallo-peptidases estão agrupadas em diferentes clãs baseado na natureza do aminoácido que completa o sítio de ligação ao metal. O clã MA é composto pela sequência HEXXH-E e o clã MB corresponde ao motivo HEXXH-H (Rao *et alii*, 1998).

Esta classe de enzimas dependentes de íons metálicos divalentes no mecanismo catalítico é encontrada amplamente em bactérias e eucariotos. Boa parte delas localiza-se no meio extracelular, mas são encontradas também no

citossol, em vesículas e também associadas a membranas. Elas apresentam uma grande diversidade de sequências e estruturas, e são sensíveis a agentes quelantes a íons divalentes tais como 1,10-fenantrolina, EDTA e EGTA (Bond e Butler, 1987). A classe das metalo-peptidases incluem uma grande variedade de enzimas como as colagenases de organismos superiores (Hibbs *et alii*, 1985 e Okada *et alii*, 1986), toxinas hemorrágicas presentes em veneno de cobras Shannon *et alii*, 1989), termolisinas bacterianas (Weaver *et alii*, 1977) e metalo-peptidases de *Trypanosoma cruzi* (Niemirowicz *et alii*, 2008).

A termolisina, uma peptidase neutra, é o membro melhor caracterizado do clã MA. Nela, resíduos de histidina do motivo HEXXH funcionam como ligantes do zinco. Além disso, um resíduo de glutamato tem função catalítica sobre ligações peptídicas (Potempa e Pike, 2005). A termolisina é uma peptidase de 34 kDa muito estável, com meia-vida de 1 h a 80 °C. A colagenase, outra importante metalo-peptidase, tem ação muito específica atuando sobre colágeno e gelatina. Ela foi inicialmente encontrada na bactéria anaeróbica *Clostridium histolyticum* como um componente de produtos tóxicos. Mais tarde ela foi encontrada sendo produzida pela bactéria aeróbica *Achromobacter iophagus* e outros organismos incluindo fungos. A elastase, produzida por *Pseudomonas aeruginosa*, é outro importante membro da família de metalo-peptidases neutras. As metalo-peptidases alcalinas produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia* spp. são ativas em pH entre 7 e 9 e têm massas moleculares entre 48 e 60 kDa. As metalo-peptidases de matriz estão envolvidas na degradação da matriz extracelular durante a morfogênese de tecidos, diferenciação e cicatrização de feridas e pode ser útil no tratamento de doenças tais como câncer e artrite (Rao *et alii*, 1998). As aminopeptidases formam um amplo grupo dentro da classe das metalo-peptidases, apresentando funções importantes.

- Treonino-peptidases (EC 3.4.25)

O grupo das treonino-peptidases foi descrito em 1995 e é formado por poucas famílias. O mecanismo catalítico dos membros desta classe parece funcionar com um resíduo de treonina N-terminal participando como um

nucleófilo no ataque ao grupo carbonil da ligação peptídica. Esta classe de peptidases representa um elemento essencial na via ubiquitina-proteassoma, que é a principal cascata intracelular de degradação controlada de proteínas (Mitsiades *et alii*, 2006). As treonino-peptidases estão envolvidas em muitos processos celulares fundamentais, tais como progressão do ciclo celular, divisão celular, desenvolvimento, diferenciação e apoptose. Além disso, influencia modula respostas imunes e inflamatórias (Wang e Maldonado, 2006).

Uma vez que o grupo é recente, pouco caracterizado e possui poucos integrantes, aguarda-se um maior aprofundamento no conhecimento das enzimas e inibidores (Lowe *et alii*, 1995).

- Glutâmico-peptidases

Esta classe enzimática, recentemente descrita, é formada por apenas uma família. Seu mecanismo hidrolítico é único, com uma díade catalítica composta por um resíduo de glutamato e outro de glutamina, onde o glutamato ativa uma molécula de água nucleofílica enquanto a glutamina estabiliza um intermediário tetraédrico formado na via hidrolítica. Além disso, um resíduo de ácido aspártico também parece estar envolvido na atividade catalítica. (Fujinaga *et alii*, 2004). A atividade enzimática deste grupo de peptidases é potencialmente inibida pelo composto 1,2-epoxi-3-(*p*-nitrofenoxi) propano (EPNP) (Oda, 2004).

Amino-peptidases (EC 3.4.11)

As amino-peptidases são enzimas do tipo exopeptidases que removem resíduos de aminoácidos das extremidades N-terminais de proteínas e cadeias polipeptídicas. Essas exopeptidases são encontradas em animais, plantas e microorganismos, e podem apresentar diversas funções celulares tais como modulação da expressão gênica, hidrólise de peptídeos regulatórios, processamento de antígenos, maturação, renovação e modelamento de proteínas, degradação de proteínas mal-sintetizadas, entre outras (Bertin *et alii*, 2005). Algumas amino-peptidases localizadas no retículo endoplasmático e no

citossol estão envolvidas no processamento e na geração de peptídeos antigênicos associados às moléculas de MHC classe I (Hattori e Tsujimoto, 2004). Quanto à localização, a maior parte delas é encontrada no citoplasma celular, podendo também aparecer em organelas intracelulares compartimentalizadas, em componentes de membranas e secretadas no meio extracelular. Juntamente com as endopeptidases, as aminopeptidases promovem a hidrólise de peptídeos e proteínas em aminoácidos livres.

Atualmente, as aminopeptidases são consideradas como importantes alvos para o desenvolvimento de novas drogas, como evidenciado pela importância de suas atividades no ciclo de vida de *Plasmodium* spp. (Howarth e Lloyd, 2000; Gavigan *et alii*, 2001; Lin *et alii*, 2001), *Leishmania* spp. (Morty e Morehead, 2002) e *T. brucei* (Knowles, 1993). Além disso, a vacinação de ovelhas com leucil aminopeptidases de *Fasciola* conferiu proteção contra fasciolose (Acosta *et alii*, 2008; Piacenza *et alii*, 1999). Em *P. falciparum*, elas atuam nos estágios terminais de degradação da hemoglobina, gerando aminoácidos essenciais para o crescimento e desenvolvimento do parasito (Skinner-Adams *et alii*, 2010). Em bactérias, as aminopeptidases desempenham um importante papel fisiológico de nutrição e renovação proteica, reciclando os resíduos de aminoácidos gerados pela ação de endopeptidases ou de proteassomas (Matsui *et alii*, 2006). Em vírus como o HIV, a leucil-aminopeptidase desempenha uma importante função na entrada do vírus na célula, exatamente no momento em que a infecção é estabelecida (Pulido-Cejudo *et alii*, 1997 e Beninga *et alii*, 1998). Em helmintos, as leucil-aminopeptidases são menos comumente caracterizadas, mas evidências suportam sua participação em processos cruciais no ciclo de vida dos vermes (McCarthy *et alii*, 2004, citado em Acosta *et alii*, 2008).

As aminopeptidases estão sendo usadas como ferramentas moleculares no auxílio na determinação de sequências de proteínas, sejam como aditivos para ensaios de dois passos de endopeptidases, ou como agentes atuantes no processamento de proteínas recombinantes e produtos de fusão (Arima *et alii*, 2004).

- Leucil-aminopeptidase (EC 3.4.11.1)

As leucil-aminopeptidases (LAPs) formam um grupo diversificado de exopeptidases que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas tendo resíduos de leucina na porção amino-terminal de proteínas ou de substratos peptídicos (Rawlings e Barrett, 2004). Elas pertencem às famílias M1 e M17 de peptidases que são distintas em estrutura, mecanismo enzimático e funções biológicas. Quanto ao domínio catalítico, as LAPs de M1 e M17 se distinguem pela presença e ausência do motivo HEXXH de metalo-peptidase, respectivamente. Além disso, enquanto as LAPs M17 são homo-hexaméricas e se ligam a dois cátions divalentes, as LAPs M1 não são hexaméricas e se ligam a um único íon divalente. As enzimas da família M1 pertencem ao clã MA(E) enquanto que as LAPs da família M17 pertencem ao clã MF de metalo-peptidases (Matsui *et alii*, 2006). Em geral, as LAPs apresentam atividade máxima em pH neutro ou alcalino, são inibidas por bestatina e amastatina (Rawlings *et alii*, 2006), exibem temperatura variável para melhor atividade e necessitam de cátions divalentes (Matsui *et alii*, 2006). As LAPs M17 são formadas por monômeros (53-55 kDa) montados em enzimas homo-hexaméricas com altas temperaturas de funcionamento e pH ótimo alcalino (Colloms, 2004; Sträter e Lipscomb, 2004; e Walling, 2004). A estrutura tridimensional da LAP bovina (1,6 Å) e da PepA de *E. coli* (2,5 Å) foram determinadas por cristalografia de raio-X e estes estudos forneceram conhecimentos importantes sobre os mecanismos catalíticos e a estrutura da usados pelas LAPs (Colloms, 2004 e Sträter e Lipscomb, 2004).

As LAPs são formadas por homo-hexâmeros e possuem grande importância médica e biológica devido às suas funções essenciais na degradação de proteínas e no metabolismo de peptídeos biologicamente ativos (Terenius *et alii*, 2000; Goldberg *et alii*, 2002; Lowther e Matthews, 2002, citados em Lin *et alii*, 2004). A leucil-aminopeptidase do cristalino bovino foi a primeira LAP a ser descrita (Burley *et alii*, 1990). Sua estrutura terciária revelou a presença de dois domínios e o sítio ativo localizado na porção C-terminal.

Em mamíferos, a enzima é intracelular e tem um papel importante na degradação de produtos produzidos por proteinases no citossol. Além disso, a enzima participa da clivagem de peptídeos produzidos pelo proteassoma para a apresentação de antígenos via MHC I induzida por interferon gama (Beninga

et alii, 1998; Kloetzel e Ossendorp, 2004). Recentemente, sugeriu-se que a LAP animal está envolvida no status redox (Cappiello *et alii*, 2006). Em bactérias, a enzima também é intracelular e, assim como nos animais, ela não só atua em processos proteolíticos na porção N-terminal de proteínas e peptídeos, mas também apresenta funções secundárias atuando como repressores transcricionais (Behari *et alii*, 2001; Woolwine *et alii*, 2001), fatores de recombinação sítio-específico (Colloms, 2004) e receptores de toxinas para o transporte vesicular até a membrana (Matsui *et alii*, 2006). Em plantas, as LAPs estão localizadas nos cloroplastos e são sintetizadas com peptídeo sinal N-terminal. Elas são menos estudadas nos vegetais e suas funções estão sendo progressivamente melhores elucidadas nos últimos anos. A LAP M17 vegetal melhor caracterizada é a de *Solanum lycopersicum* (Walling, 2004).

Em *Plasmodium* spp., as LAPs da família M17 estão envolvidas no catabolismo da hemoglobina do hospedeiro e no desenvolvimento do parasito (Gardiner *et alii*, 2006; Stack *et alii*, 2007 e Dalal e Klemba, 2007). Os resíduos de aminoácidos derivados do processo de degradação da hemoglobina pelas LAPs são essenciais para a nutrição e síntese de proteínas necessárias para o crescimento e desenvolvimento dos parasitos da malária (Lee *et alii*, 2010). Elas também participam do ciclo de vida do parasito e, além disso, estudos de inibição indicaram que elas são inibidas e o crescimento dos parasitos é interrompido, sugerindo que as LAPs são alvos importantes para o desenvolvimento de drogas (Nankya-Kitaka, 1998; Gardiner *et alii*, 2006; Stack *et alii*, 2007; Cunningham *et alii*, 2008 e Skinner-Adams *et alii*, 2010, citados em Lee *et alii*, 2010).

- Aminopeptidases termofílicas

Este grupo de enzimas está incluído na família M29 das metalopeptidases. Muitas aminopeptidases termofílicas são leucil aminopeptidases, ou seja, enzimas que catalisam a hidrólise e liberação um aminoácido N-terminal, preferencialmente leucina. A primeira aminopeptidase termoestável caracterizada foi de *Bacillus stearotherophilus* (Roncari e Zuber, 1969). A aminopeptidase de *Thermus aquaticus*, uma bactéria extremamente termofílica,

é bastante termo-estável, apresenta temperatura ótima acima de 70 °C e também pertence a este grupo (Motoshima *et alii*, 1990). Um exemplo importante deste grupo enzimático foi caracterizado em nosso laboratório, uma aminopeptidase termofílica de *Borrelia burgdorferi*, membro desta família. A enzima formada por homo-hexâmeros de 300 kDa montados por monômeros de 50 kDa, exibiu atividade dependente de sua forma oligomérica, com atividade máxima a 60 °C. Mostrou-se também ser dependente de zinco para funcionar e foi inibida por bestatina. Esta enzima termoestável pode estar envolvida no processo de suprimento de aminoácidos e/ou no processamento de proteínas e peptídeos (Bertin *et alii*, 2005).

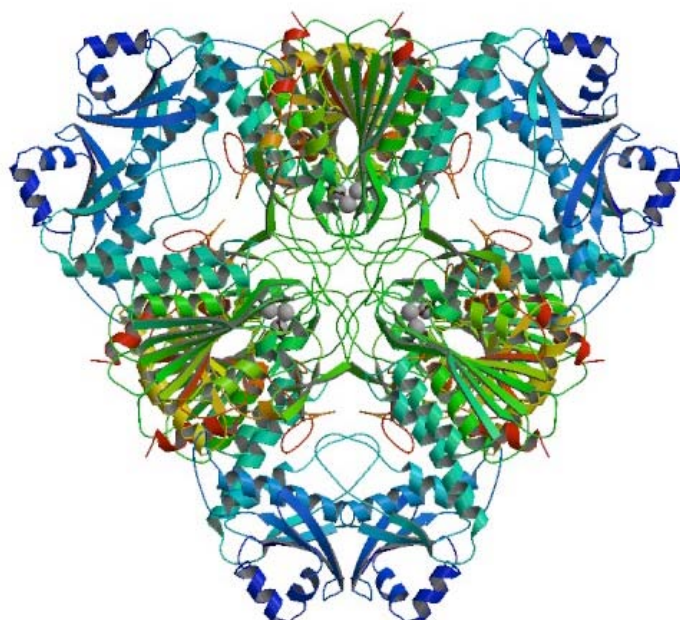


Figura 4. Estrutura tridimensional da Leucil aminopeptidase do cristalino bovino. O sítio ativo encontra-se posicionado na região central da estrutura homohexamérica. As esferas cinzas representam a ligação do inibidor amastatina. Resolução 2.4 Å (merops.sanger.ac.uk; PDB protein data bank).

Peptidases de *Trypanosoma cruzi*

Ao longo das últimas duas décadas, um melhor entendimento da biologia do *T. cruzi* tem permitido a identificação de muitos alvos para a quimioterapia da doença de Chagas. Agentes anti-chagásicos baseados em

vias bioquímicas metabólicas ou enzimas específicas do parasito, produtos naturais e seus derivados, assim como aqueles obtidos pelo desenho e síntese de compostos, foram recentemente revisados (Duschak e Couto, 2007). As peptidases possuem múltiplos papéis na patogênese da doença de Chagas fazendo delas alvos potenciais e atrativos para o desenvolvimento de novas drogas contra a doença de Chagas (Duschak e Couto, 2009).

- Cruzipaina (Cz)

A cruzipaina, também conhecida como GP57/51 ou por cruzaina, é a mais abundante e melhor caracterizada cisteíno-peptidase do *T. cruzi* e pertence à superfamília da papaína (Cazzulo *et alii*, 1997 e 2001). A enzima é codificada por um grande número de genes localizados em sequência em vários cromossomos (Eakin *et alii*, 1992 e Campetella *et alii*, 1992). A Cz possui uma extensão C-terminal longa e altamente glicosilada (Aslund *et alii*, 1991 e Parodi *et alii*, 1995). Esta glicoproteína é diferencialmente expressa em uma mistura de isoformas por diversas linhagens do *T. cruzi*, em todas as suas formas de desenvolvimento, mostrando uma atividade significativamente mais alta nas formas epimastigotas quando comparada às outras formas do parasito (Campetella *et alii*, 1990; Franke de Cazzulo *et alii*, 1994 e Gea *et alii*, 2006). Assim como a maior parte das cisteíno-peptidases, a Cz é sintetizada como zimogênio que se torna ativo somente após a clivagem de um pró-domínio N-terminal, gerando desta forma a enzima madura (Eakin *et alii*, 1992). Esta enzima possui três sítios potenciais de N-glicosilação, dois no domínio catalítico N-terminal e um no domínio antigênico C-terminal (Barboza *et alii*, 2005).

A Cz localiza-se essencialmente nos reservossomos das formas do parasito, mas também é encontrada na superfície celular de tripomastigotas, sugerindo diferentes funções biológicas (Scharfstein *et alii*, 1986; Campetella *et alii*, 1990; Souto-Padron *et alii*, 1990).

A Cz é necessária e essencial para a sobrevivência dos parasitos, para sua diferenciação celular, crescimento e desenvolvimento dentro da célula hospedeira (Cazzulo *et alii*, 2001; dos Reis *et alii*, 2006 e McKerrow *et alii*,

2006). Ela pode estar envolvida em mecanismos de defesa do parasito contra a resposta imune do hospedeiro por apresentar atividade endopeptídica e ser capaz de hidrolisar a porção Fc de IgGs (Bontempi e Cazzulo, 1990). Além disso, a Cz participa do processo de invasão e internalização do parasito nas células de mamíferos, como provado por estudos com inibidores específicos da enzima (Souto-Padron *et alii*, 1990), os quais interferem não só na invasão celular como também inibindo a replicação intracelular do *T. cruzi* (Meirelles *et alii*, 1992).

A atividade da enzima é ótima em pH ácido e é inibida por E-64, TLCK, leupeptina e antipainina (Cazzulo *et alii*, 1989 e 1997; Bonaldo *et alii*, 1991). Inibidores da cruzipainina induzem a diminuição de sua expressão no parasito, resultando em uma redução sutil da metaciclogênese, mas sem interferir na capacidade de infecção de células mamíferas por tripomastigotas (Yong *et alii*, 2000). A chagasina, uma proteína de 11 kDa expressa nas diferentes formas do *T. cruzi*, foi identificada e caracterizada como um inibidor endógeno de cisteíno-peptidases semelhantes à papaína (Monteiro *et alii*, 2001; Sanderson *et alii*, 2003).

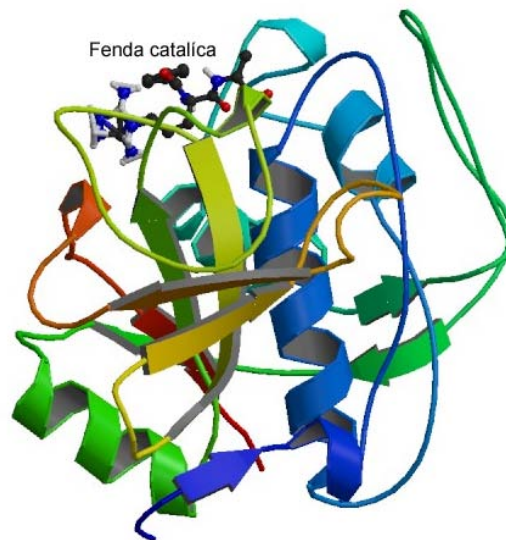


Figura 5. Estrutura terciária da cruzipainina. Resolução de 2,20 Å (merops.sanger.ac.uk; PDB protein data bank).

- Oligopeptidase B (OPB)

A Oligopeptidase B, membro pertencente à família S9 das serino-peptidases, foi inicialmente identificada e descrita como uma enzima citosólica de 80 kDa apresentando atividade máxima sobre o substrato fluorogênico N-Cbz-Gly-Gly-Arg-AMC em pH 8,0 (Santana *et alii*, 1992). Esta enzima possui especificidade para clivagem hidrolítica de resíduos básicos e apresenta o domínio catalítico composto por um motivo $\alpha\beta$ hidrolase e um domínio formado por sete folhas β (Polgár, 1997 e Gerczei *et alii*, 2000). A OPB de *T. cruzi* tem um papel central na invasão da célula hospedeira, mobilizando o fornecimento de Ca^{2+} intracelular em células de mamíferos e recrutando os lisossomos para o local de invasão do parasito (Burleigh *et alii*, 1997). Isso foi comprovado por estudos de deleção do gene que codifica a OPB, resultando em uma diminuição marcante da invasão das células hospedeira e do estabelecimento da infecção (Caler *et alii*, 1998).

- Prolil-oligopeptidase (POP-Tc80)

A POP-Tc80 é uma enzima da família S9 das serino-peptidases, apresenta atividade enzimática máxima em pH neutro e tem uma massa molecular de 80 kDa. Ela possui especificidade para o colágeno humano dos tipos I e IV e para o colágeno do tipo I em rato e foi identificada em extratos celulares de formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas (Santana *et alii*, 1997 e Grellier *et alii*, 2001). Além disso, hidrolisa fibronectina e está envolvida na entrada das formas tripomastigotas nas células hospedeiras não-fagocíticas de mamíferos. Portanto, esta enzima é considerada um importante fator de virulência e um alvo potencial para o desenvolvimento de drogas contra o *T. cruzi* (Santana *et alii*, 1997; Grellier *et alii*, 2001; Bastos *et alii*, 2005). Estudos de modelagem estrutural sugeriram que a POP-Tc80 é formada por um domínio α/β -hidrolase contendo a tríade catalítica Ser548-Asp631-His667 e sete hélices β -*propeller* no domínio não catalítico. Análise de Docking sugere que o acesso da tripla hélice do colágeno ao sítio catalítico ocorre na vizinhança da interface entre os dois domínios (Bastos *et alii*, 2005).



Figura 6. Estrutura cristalográfica da prolil-oligopeptidase de *T. cruzi*. (Bastos *et alii*, 2005).

- Catepsina B

A catepsina B lisossomal foi a primeira cisteíno-peptidase a ter sua estrutura cristalizada determinada (Musil *et alii*, 1991). Seu homólogo em *T. cruzi* tem massa molecular de 30 kDa, é sintetizada como zimogênios inativos em todas as formas do parasito (Garcia *et alii*, 1998), mostra atividade ótima em ambientes ácidos e geralmente é sensível a inibidores clássicos de cisteíno-peptidases.

A catepsina B degrada matriz extracelular em condições patológicas (Buck *et alii*, 1992), incluindo o câncer (Chang *et alii*, 2007) e artrites reumatóides (Hashimoto *et alii*, 2001). Durante a progressão de tumores malignos, a catepsina B exibe aumentos em sua expressão gênica, atividade enzimática e mudanças na sua localização intracelular (Berquin e Sloane, 1996; Fernandez *et alii*, 2001 e Podgorski e Sloane, 2003). A expressão da catepsina B, mesmo que em baixas concentrações na maioria dos tecidos normais, aumenta consideravelmente em tumores malignos (Keprelá, 2001; Jedeszko e Sloane, 2004; Joyce e Hanahan, 2004; Joyce *et alii*, 2004; Mohamed e Sloane, 2006; Gocheva *et alii*, 2006). Níveis elevados da enzima

estão associados a uma sobrevida menor de pacientes com câncer de intestino, ovário e outros tipos de câncer, mostrando que a catepsina B contribui para o desenvolvimento do câncer e sua nocividade. Além disso, pacientes com câncer exibem níveis elevados de catepsina B e de outras cisteíno-peptidases na urina e no plasma, comparado ao de indivíduos saudáveis (Chang *et alii*, 2007).

Ratos deficientes em catepsina B não demonstraram nenhuma evidência para um papel da enzima na apresentação de antígenos mediada por MHC-II, indicando que a catepsina B não está envolvida neste processo (Deussing *et alii*, 1998). Mueller-Steiner e colaboradores (2006) mostraram que a catepsina B apresenta funções anti-amiloidogênicas e neuroprotetivas, pois degradam a proteína precursora β -amilóide, reduzindo os níveis dos peptídeos β . Portanto, a enzima possui papel de defesa natural contra a doença de Alzheimer.

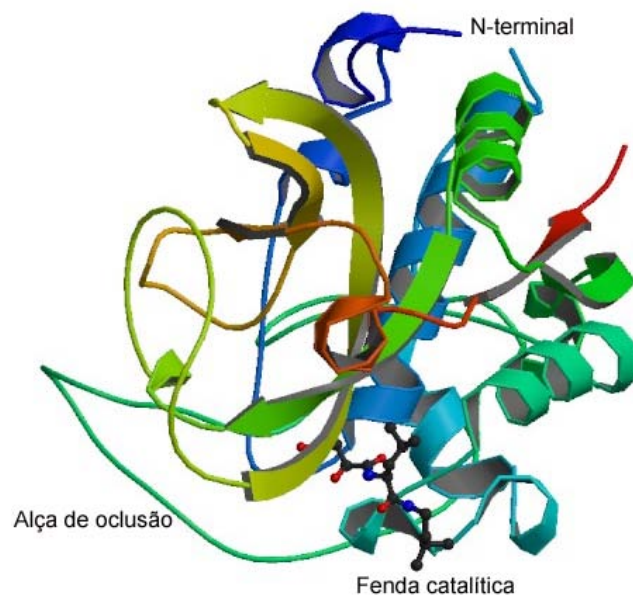


Figura 7. Estrutura tridimensional da catepsina B de *Bos taurus* com a ligação do inibidor E-64 em seu sítio catalítico. Resolução de 2.29 Å (merops.sanger.ac.uk; PDB protein data bank).

Proteases como alvo de drogas

Os medicamentos atuais existentes para o tratamento da doença de Chagas tais como compostos nitrofuranos (nifurtimox) e nitroimidazólicos (benzonidazol) são parcialmente efetivos durante a fase aguda da infecção, mas são pouco efetivos no estágio crônico da doença. Além disso, em adição aos sérios efeitos colaterais, a resistência contra ambos os compostos leva a um aumento no número de falhas no tratamento (Urbina, 2002). Estes problemas, junto com a atual falta de vacinas, provocam a necessidade para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a doença de Chagas (Urbina, 2001 e Barrett *et alii*, 2003). Com isso, a elucidação dos mecanismos bioquímicos e moleculares da fisiologia e virulência do patógeno é essencial.

Uma metalo-peptidase dependente de zinco, a GP63, é expressa em espécies de tripanossomas e *Leishmania*. Considerada a principal glicoproteína de superfície de *Leishmania* spp. é uma proteína ancorada a GPI (glicosilfosfatidilinositol) de 63 kDa conhecida também como leishmanolisina (Button *et alii*, 1993). A GP63 está envolvida na infectividade, na interação de *Leishmania* spp. com os receptores dos macrófagos do hospedeiro mamífero (Button *et alii*, 1991) e na sobrevivência intralisossomal (McGuire & Chang, 1996). A estrutura cristalizada de GP63 de *Leishmania major* demonstrou que ela é composta por três domínios distintos: N-terminal, central e C-terminal. O domínio N-terminal da leishmanolisina possui uma hélice com o motivo HEXXH, conservado entre as metalo-peptidases, além de seu dobramento ser similar a essas (Schlagenhauf *et alii*, 1998). A GP63 é sintetizada como um precursor inativo que é ativado via “cysteine switch”. Esse mecanismo sugere que a latência é mantida por obstrução do sítio ativo pela região pró da proteína, adjacente à região pré (pré-peptídeo) localizada na extremidade N-terminal e, portanto, a clivagem dessa região regulatória resultaria na enzima ativa. Um sítio de adição à âncora GPI está presente na extremidade C-terminal da GP63. Esses três domínios são clivados no lúmen do retículo endoplasmático durante o processamento da proteína (Ellis *et alii*, 2002). O processamento da região N-terminal da GP63 de *Leishmania major* foi demonstrado *in vitro* com a adição de HgCl₂, resultando na ativação da enzima. Esse mecanismo parece ser homólogo ao de outras metalo-peptidases (MacDonald *et alii*, 1995).

A atividade metalo-peptidásica e genes gp63 homólogos foram identificados em *T. brucei*. Em *T. cruzi*, dois grupos foram caracterizados e nomeados como Tcgp63-I e Tcgp63-II. Ambos possuem as regiões pré e pró, o domínio catalítico HEXXH, muitas cisteínas e prolinas conservadas, características comuns às metalo-peptidases GP63. Os membros Tcgp63-I são proteínas de superfície ligadas à membrana por âncora GPI e apresentam atividade metalo-peptidásica, além de serem expressos em todos os estágios do ciclo de vida de *T. cruzi*. Anticorpos Tcgp63-I específicos foram purificados e inibiram a infecção *in vitro* de células mamíferas (Cuevas *et alii*, 2003).

Foram identificadas 425 sequências de nucleotídeos referentes à GP63 da cepa CL Brener de *T. cruzi*, dentre eles 251 prováveis pseudogenes, mostrando que se trata de uma família de genes multicópia. Já em *T. cruzi*, foram identificados apenas 3 genes que codificam leucil-aminopeptidases.

O *T. cruzi*, assim como outros patógenos, apresenta muitas atividades proteolíticas (Cazzulo, 2002). As peptidases estão envolvidas em muitos aspectos da fisiologia de microorganismos e na interação patógeno-hospedeiro e, por isso, estão sendo atualmente consideradas como novos alvos de drogas e candidatas a vacinas para infecções causadas por parasitos (Bertin *et alii*, 2005). Além disso, elas participam ativamente do mecanismo de infecção das células do hospedeiro mamífero pelo *T. cruzi*.

Justificativa

A doença de Chagas é endêmica em muitos países sendo responsável por 12 a 14 milhões de pessoas infectadas. Pelo menos 90 milhões encontram-se em risco potencial de adquiri-la na América Latina. Os mecanismos patogênicos pelos quais o *T. cruzi* provoca uma variedade de quadros clínicos ainda são consideravelmente controversos. A hipótese da ativação de um processo auto-imune tem aspecto fundamental no entendimento da patogenicidade da doença de Chagas (Kierszenbaum, 1996). A origem desta teoria está baseada no achado de que os soros de pacientes chagásicos ou de animais de laboratório infectados pelo *T. cruzi* apresentam anticorpos que reconhecem antígenos do parasito e do tecido dos hospedeiros.

Apesar dos esforços para o desenvolvimento de drogas terapêuticas (Urbina, 2001), a doença de Chagas ainda não apresenta tratamento satisfatório. Agentes quimioterápicos atualmente em uso no tratamento das infecções pelo *T. cruzi* possuem baixos efeitos sobre os parasitas durante a fase crônica e, quando empregados para tratamento de infecções em humanos, apresentam graves efeitos colaterais como alta citotoxicidade.

Objetivo

Objetivo

Este trabalho está inserido na linha de pesquisa de nosso grupo que trata de contribuir para a identificação de alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas, visando a possibilidade de inovação do tratamento da infecção causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico causador da doença de Chagas.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho consiste em determinar a expressão, purificação e caracterização bioquímica da leucil-aminopeptidase de *T. cruzi*, uma enzima que participa de diversos aspectos fisiológicos de diferentes sistemas biológicos.

Com isso, esperamos que a enzima objeto deste estudo possa se tornar um promissor alvo para o desenvolvimento de fármacos quimioterápicos mais específicos no combate ao *T. cruzi* e, conseqüentemente, para o tratamento da doença de Chagas.

Atividades

1. Clonar dois genes de leucil-aminopeptidase de *T. cruzi* (LAPTc) e expressar a proteína recombinante em sistema heterólogo *E. coli*;
2. Purificar a enzima recombinante melhor expressa em *E. coli*;
3. Caracterizar bioquimicamente a LAPTc recombinante purificada e determinar seus parâmetros cinéticos;
4. Produzir anticorpos específicos contra a enzima purificada e determinar sua antigenicidade;
5. Identificar a localização intracelular da LAPTc nas três formas do parasito por imunofluorescência;
6. Comparar as propriedades cinéticas e bioquímicas da LAP recombinante com aquelas de sua forma nativa.

Nota técnica

Parte dos resultados mostrados neste trabalho compõem um capítulo da tese de doutorado de Glória Cadavid-Restrepo defendida no Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular – UnB, sob a orientação do Prof. Jaime Santana (Cinética de atividade e expressão da catepsina B e caracterização bioquímica de uma leucil aminopeptidase de *Trypanosoma cruzi*. Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2005). Os resultados são: identificação, purificação e caracterização bioquímica da LAPTc. À época que o trabalho foi realizado, fui bolsista de iniciação científica com o Prof. Jaime Santana e trabalhei com a então discente Glória Cadavid-Restrepo na caracterização da LAPTc. Durante dois anos de minha iniciação científica, acompanhei colaborativamente em todos os experimentos relativos à LAPTc nativa. Neste contexto, o Prof. Jaime Santana me convidou para fazer o doutorado neste tema, em colaboração com o Prof. Carlos R. Félix, com o objetivo de aprofundar nosso conhecimento sobre essa enzima e, então, produzir um manuscrito que pudesse ser enviado para um bom periódico no exterior. Dessa forma, me engajei no projeto com os objetivos de clonar e expressar genes codantes para LAPs de *T. cruzi*, sendo que um deles é o da LAPTc. Assim, consegui clonar dois genes, mas apenas aquele da LAPTc foi expresso em *E. coli*. A seguir, fiz estudos comparativos de parâmetros cinéticos, de temperatura e pH, expressão e citolocalização da enzima nas diferentes formas do parasito. Também, meu trabalho no doutorado permitiu responder a pergunta sobre o grau de oligomerização da LAPTc, sem o qual seria difícil publicar bem o trabalho. Em conclusão, os dados obtidos permitiram escrever um manuscrito robusto que está submetido para publicação em periódico internacional. Isso explica o formato adotado neste trabalho que apresento ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da UnB. Eu, meus orientadores e a Dra. Glória Cadavid-Restrepo concluímos que essa é a melhor forma de apresentar a tese, pois garante uma sequência lógica de produção e discussão de dados referentes à LAPTc.

Materiais e Métodos

Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

Neste estudo, foram utilizadas formas epimastigotas dos estoques CL Brener de *Trypanosoma cruzi* crescidas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Sigma®) e 100 µg/mL de gentamicina, a 28 °C sob agitação constante (Camargo, 1964). As formas tripomastigotas e amastigotas utilizadas foram obtidas de culturas L-6 cedidas pelo Prof. Dr. Cezar Martins de Sá, pesquisador do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Brasília. As formas foram purificadas como descrito por Bastos *et alii*, 2005.

Amplificação dos genes da leucil aminopeptidase de *Trypanosoma cruzi* por PCR

A partir de buscas no banco de dados do GenBank, os genes *laptc1* (EAN87580) e *laptc2* (EAN97960) de *T. cruzi*, de 1755 bp e 1563 bp respectivamente, foram amplificados pela técnica de PCR (reação de polimerização em cadeia) a partir do DNA genômico extraído de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Para isso, foram construídos e utilizados oligonucleotídeos sintéticos específicos, com sítios de restrição das enzimas *NdeI* e *XhoI*, para amplificar a fase aberta de leitura (ORF) dos genes. Os oligonucleotídeos utilizados foram: LAPTc1-*NdeI*-senso 5`-TAGTGACATATGCTCAAGAAGGTCCTCTT-3`, LAPTc1-*XhoI*-antisense 5`-TAGTGACTCGAGTTACTGCTTCCTCCTCCTT-3`, LAPTc2-*NdeI*-senso 5`-CTAGTGACATATGAACAGACCTCCTGCTACA-3` e LAPTc2-*XhoI*-antisense 5`-TAGTGACTCGAGTTATCGTAAATTACGAAGATATTCC-3`, destacando em sublinhado as sequências do sítio de restrição das enzimas *NdeI* no oligonucleotídeo senso e *XhoI* no anti-senso.

Cada PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo em suas fórmulas, em concentrações finais, 100 ng de DNA genômico, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 200 nM de cada oligonucleotídeo, 1,25 µL de Platinum® Taq DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen®) e tampão de reação diluído em água milli-Q q.s.p 50 µL. O programa no qual as reações foram submetidas foi adaptado para as condições dos oligonucleotídeos: desnaturação inicial a 94

°C por 3 min seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 56 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 2 min. Por fim, as reações foram estendidas por mais 10 min a 72 °C.

A mesma sequência correspondente à fase aberta de leitura (ORF) do gene *laptc2* de 1563 pb foi amplificada nas mesmas condições descritas acima utilizando iniciadores sintéticos específicos para clonagem no vetor pFastBacTM1. Para este sistema, o gene será denominado de *laptc2-bac*. Os iniciadores sintetizados para este sistema foram: LAPTc2-BAC-*Bam*HI-senso 5`- GGATCCATGAACAGACCTCCTGCTACAG - 3` e LAPTc2-BAC-*Xho*I-antisenso 3`- CTCGAGTTAATGATGATGATGATGATATCGTAAATTACGAAGATATTCC A -5`, com a adição do sítio de restrição para as enzimas (sequências sublinhadas).

Clonagem dos genes amplificados nos vetores de expressão

Os produtos amplificados correspondentes aos genes *laptc1* e *laptc2* foram clonados diretamente no vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) gerando os clones pCR[®]2.1-TOPO[®]+*laptc1* e pCR[®]2.1-TOPO[®]+*laptc2*, os quais foram transformados em células competentes de *E. coli* da linhagem DH5α. As amostras foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (50 µg/mL), IPTG (100 mM) e X-Gal (25 mg/mL) e incubadas durante a noite a 37 °C. As colônias brancas de cada placa foram coletadas e adicionadas em tubos contendo 1 mL de meio LB líquido e 50 µg/mL de ampicilina. As colônias foram crescidas a 37 °C sob agitação constante, durante a noite e uma alíquota de 100 µL da cultura foi estocada a 4 °C. Os 900 µL restantes foram centrifugados por 5 min a 7000 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 70 µL de água milli-Q. Após adição de 80 µL de fenol-clorofórmio (1:1), rápida homogeneização e nova centrifugação a 15000 rpm por 10 min, o DNA total dos possíveis clones foram extraídos. O perfil das amostras foi analisado em gel de agarose 0,8%, onde 10 µL da fase superior de cada amostra foram aplicados no gel. Aquelas que apresentaram plasmídeo com tamanho maior foram cultivadas a partir das alíquotas de 100 µL

previamente reservadas. Desta forma, as amostras selecionadas foram cultivadas em 10 mL de meio LB contendo ampicilina, o DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina (*PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit, Invitrogen®*) e submetido à análise por PCR, nas mesmas condições utilizadas para a amplificação dos genes a partir do DNA genômico. Ao mesmo tempo, o material extraído foi digerido com as enzimas *NdeI* e *XhoI* (Invitrogen®), conforme instruções do fabricante, para a liberação dos insertos. As amostras digeridas foram aplicadas em gel de agarose 0,8% e as bandas liberadas dos vetores correspondentes aos insertos foram excisadas do gel e eluídas (*illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit, GE Healthcare*).

Os genes *laptc1* e *laptc2* purificados foram ligados ao vetor de expressão pET-19b (Novagen) previamente linearizado nos sítios de clonagem das enzimas *NdeI* e *XhoI*. As ligações dos fragmentos de DNA ao vetor foram realizadas com a T4 DNA ligase (Invitrogen®), de acordo com as orientações do fabricante. Os produtos de ligação foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* da linhagem BL21(DE3), a qual é própria para a produção de proteínas recombinantes quando induzidas. As células submetidas ao processo de transformação foram plaqueadas em meio LB sólido com 100 µg/mL de ampicilina e crescidas a 37 °C durante a noite. As placas foram submetidas à varredura por meio da coleta e crescimento das colônias em LB líquido com ampicilina. O DNA total foi extraído por fenol-clorofórmio, como descrito anteriormente, e as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8%. Os clones que apresentaram padrão plasmidial com tamanhos maiores que aqueles do controle (vetor pET-19b vazio) foram selecionados como positivos, contendo os clones transformantes pET-19b+*laptc1* e pET-19b+*laptc2*, e selecionados novamente em meio LB líquido com ampicilina. O DNA plasmidial dos mesmos foi extraído, como descrito anteriormente, e analisado por digestão com as enzimas *NdeI* e *XhoI*.

Os clones também foram testados por amplificação com a técnica de PCR a partir do uso de iniciadores do promotor T7 e os respectivos oligonucleotídeos específicos de cada gene, sintetizados inicialmente para amplificar os genes do DNA genômico de *T. cruzi*. As análises de restrição enzimática e de PCR foram realizadas para verificar se os clones selecionados possuíam os insertos com tamanho esperado para os genes *laptc1* e *laptc2*.

Amostras de 500 ng do DNA plasmidial dos clones pET-19b+*laptc1* e pET-19b+*laptc2* foram sequenciadas com o emprego dos iniciadores do promotor T7 (5`- TAATACGACTCACTATAGGG -3`) e do terminador T7 (5`- TATGCTAGTTATTGCTCAG -3`) para analisar a qualidade das sequências.

Simultaneamente, seguindo a estratégia de expressão pelo sistema baculovírus, o gene *laptc2-bac* amplificado foi clonado no vetor pGEM[®]-T (Promega) e posteriormente clonado no vetor de transferência pFastBacTM1. O clone pFastBac+*laptc2-bac* foi transformado em células *E. coli* DH10-BAC onde o gene foi inserido no genoma da bactéria por recombinação formando o bacmídeo recombinante que foi extraído e estocado a -20 °C.

Análise filogenética

A partir de buscas por membros da família M17 no banco de dados de proteínas não redundantes (NR) do NCBI, as sequências deduzidas de aminoácidos das leucil aminopeptidases de *T. cruzi* clonadas (LAPTc1, número de acesso EAN87580.1, e LAPTc2, número de acesso EAN97960.1) foram alinhadas com as sequências de aminopeptidases de *Trypanosoma brucei* (números de acesso EAN79621.1 e AAX70152.1), *T. cruzi* (número de acesso EAN99056.1), *Leishmania major* (números de acesso CAJ02694.1, CAJ06706.1 e AAL16097.1), *Leishmania braziliensis* (número de acesso CAM36610.1), *Leishmania amazonensis* (número de acesso AAL16095.1), *Leishmania donovani* (número de acesso AAL16096.1), *Homo sapiens* (número de acesso AAD17527.1), *Pan troglodytes* (número de acesso XP_001162589.1), *Mus musculus* (número de acesso NP_077754.2), *Rattus norvegicus* (número de acesso NP_001011910.1), *Pseudomonas aeruginosa* (número de acesso NP_252520.1), *Haemophilus influenzae* (número de acesso ZP_01789367.1), *Escherichia coli* (número de acesso YP_672349.1), *Vibrio cholerae* (número de acesso YP_001217999.1), *Mycobacterium leprae* (número de acesso CAC31245.1), *Mycobacterium tuberculosis* (número de acesso NP_216729.1), *Arabidopsis thaliana* (número de acesso NP_194821.1), *Vitis vinifera* (número de acesso CAN66364.1), *Oryza sativa* (número de acesso NP_001066684.1), *Solanum lycopersicum* (número de acesso CAA69614.1),

Plasmodium vivax (número de acesso XP_001615930.1), *Plasmodium falciparum* (número de acesso XP_001348613.1), *Plasmodium yoelii* (número de acesso EAA21300.1) e *Plasmodium chabaudi* (número de acesso XP_744254.1) utilizando o programa ClustalX versão 2.0 (Larkin *et alii*, 2007). A matriz resultante foi realizada na suíte de aplicativos PHYLIP pelo método bootstrap Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987) por meio do algoritmo NEIGHBOR. As informações da árvore filogenética foram visualizadas com o programa MEGA 3 - Molecular Evolutionary Genetic Analysis (Kumar *et alii*, 2004).

Expressão das proteínas recombinantes

Os clones positivos contendo os plasmídeos recombinantes, pET-19b+*laptc1* e pET-19b+*laptc2*, foram cultivados para expressão das proteínas recombinantes LAPTC1 e LAPTC2 fusionadas à cauda de histidina. Células BL21(DE3) foram transformadas por choque térmico com os clones e plaqueadas em meio LB sólido com ampicilina. Uma colônia positiva de cada placa foi crescida em meio LB líquido com ampicilina sob agitação constante de 200 rpm a 37 °C. As induções foram feitas com 1 mM de IPTG quando o crescimento das culturas atingiam uma densidade óptica de 600 nm (OD₆₀₀) entre 0,5 e 0,8 e foram realizadas em temperaturas entre 20 e 37 °C, durante um período de tempo entre 5 e 15 h.

O extrato total de bactérias de cada clone foi obtido após centrifugação da cultura, 10 min a 5000 rpm, e descarte dos sobrenadantes. Então, o sedimento de células correspondente foi ressuspenso em tampão de lise (Tris 20 mM pH 7,9; NaCl 500 mM; 0,2% lisozima). A seguir, as células foram incubadas por 20 min a 37 °C e sonicadas para a lise de suas membranas e obtenção das proteínas solúveis e insolúveis. Os extratos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 min a 4 °C, e então as frações solúveis e insolúveis foram separadas e analisadas em SDS-PAGE 8%.

Purificação das enzimas recombinantes LAPTc1 e LAPTc2

- Preparação do extrato total e sonicação

Células *E. coli* a partir de volume de 100 mL de cultura previamente induzida por IPTG foram obtidas por centrifugação e ressuspensas em 15 mL de tampão de lise (Tris 20 mM pH 7,9; NaCl 500 mM; 0,2% lisozima) e incubado a 37 °C por 30 min. Em seguida, as células foram submetidas a 3 ciclos de sonicação, no gelo, com um processador ultra-sônico Vibra-Cell VC130 (Sonics). Os ciclos apresentavam duração total de 2 min, segmentados em pulsos de 5 s, com potência de 10 W. Um intervalo de 2 min era respeitado entre cada ciclo aplicado nas amostras, visando evitar o aquecimento da mesma e uma possível degradação das proteínas contidas do extrato total. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 min a 4 °C e a porção solúvel contendo a proteína recombinante foi designada de extrato total.

- Cromatografia de afinidade em coluna de níquel

O extrato total foi aplicado à coluna de níquel (0,5 mL de resina) com afinidade pela histidina (His Bind Purification Kit[®], Novagen), previamente lavada com 3 volumes de água milli-Q, tratada com 5 volumes de NiSO₄ (Charge Buffer) e equilibrada com 3 volumes de tampão de ligação (Binding Buffer – Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM). Após a passagem da amostra, a coluna foi lavada com 10 volumes de tampão de afinidade e, em seguida, pela aplicação de 10 volumes de tampão de lavagem (Wash Buffer – Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, imidazol 100 mM). A enzima retida na coluna foi eluída com 4 volumes de tampão de eluição (Elute Buffer – Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, imidazol 400 mM) em frações de 0,5 mL e estocadas a 4 °C. Alíquotas de todos os passos da purificação foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE.

- Cromatografia de exclusão molecular em coluna de filtração em gel

As proteínas eluídas da coluna de níquel com atividade sobre o substrato fluorogênico Leu-AMC foram submetidas à cromatografia de filtração

em gel. Uma alíquota de 200 µL do segundo volume eluído da coluna de níquel foi aplicada na coluna de filtração em gel Superdex-200 (GE Healthcare), previamente equilibrada com fase móvel (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) filtrada e degaseificada, sob fluxo de 0,3 mL/min. Frações de 250 µL foram coletadas durante os 90 min de eluição. Cada alíquota foi coletada, estocada em gelo e submetida a teste de atividade sobre Leu-AMC. As alíquotas que apresentaram atividade enzimática foram concentradas, submetidas à análise por SDS-PAGE 8%, usadas prontamente ou estocadas a -80 °C.

Eletroforese de amostras da LAPTc2 em gel de poliacrilamida

- Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE)

Para analisar a separação das proteínas do extrato total, monitorar o padrão de migração da protease recombinante purificada bem como estimar sua massa molecular, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% contendo SDS-PAGE (Laemmli, 1970). O tampão de amostra utilizado foi composto por 0,1% ou 0,01% de SDS e 50 µM de β-mercaptoetanol; as amostras foram aplicadas no gel com ou sem fervura prévia.

Após eletroforese, os géis foram corados com azul de Coomassie para a visualização das bandas e estimativa da massa molecular da proteína utilizando-se de marcadores comerciais como referência (BenchMark Protein Ladder, Invitrogen; Dual Color, Bio-Rad; Kaleidoscope, Bio-Rad; SDS-6H (Sigma).

- Eletroforese não-desnaturante (PAGE)

Para investigar se a enzima sofria alguma alteração no seu padrão de migração em relação à eletroforese desnaturante, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes. A eletroforese foi realizada sob as mesmas condições descritas acima, mas sem a adição de SDS no gel e nos tampões de corrida e amostra.

Eletroforese para determinação de atividade enzimática em géis (zimograma)

As eletroforeses de géis destinados à zimograma foram realizadas a 4 °C, sob voltagem constante de 100 V e sem fervura prévia das amostras. Após a corrida, os géis foram lavados quatro vezes por 15 min com tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,0 sob agitação lenta à temperatura ambiente. O gel foi incubado com Leu-AMC (concentração final de 20 µM) por até 30 min em temperatura ambiente (Santana *et alii*, 1992). O produto da atividade enzimática foi visualizado no gel sob incidência de luz UV. Após fotodocumentação do resultado, os géis foram lavados com água destilada e corados com azul de Coomassie.

Determinação de atividade proteolítica

Nesses experimentos, a velocidade de hidrólise do substrato Leu-AMC pela rLAPTc foi determinada pela leitura do aumento da fluorescência resultante da hidrólise do substrato. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. A leitura da intensidade de fluorescência foi lida utilizando placas de 96 poços, e um espectrofluorímetro (Spectramax M2^e - Molecular Devices), nos comprimentos de onda de 440 nm, com excitação em 380 nm.

- Influência do pH

Para determinar o pH ótimo de atividade enzimática da rLAPTc, a fluorescência foi medida após incubação de 0,5 µg da enzima purificada em 100 µL de tampão HTE (Hepes 100 mM, Tris 50 mM, Etanolamina 50 mM) para a faixa de pH de 6,0 a 10,0. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, o substrato fluorogênico Leu-AMC foi adicionado e as velocidades das reações foram medidas pela leitura do aumento da fluorescência, conforme item anterior.

- Influência da temperatura

A temperatura na qual a enzima apresenta atividade máxima foi determinada medindo-se a fluorescência resultante da hidrólise de AMC durante a incubação de 0,5 µg da enzima pura em 50 µL de tampão HTE pH 8,0 contendo 20 µM de Leu-AMC. As misturas de reações foram incubadas durante 15 min em termociclador, nas temperaturas de 20, 30, 37, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C. Em seguida, as reações foram interrompidas com a adição de 150 µL de etanol absoluto. A seguir, 100 µL das misturas de reação foram colocadas em placa de 96 poços e o cálculo das velocidades de reação foi realizado conforme descrito acima.

- Termoestabilidade enzimática

A termoestabilidade da rLAPTc foi avaliada pela incubação de 0,5 µg da enzima purificada em 100 µL de tampão Tris 25 mM, pH 8,0 a 28, 37, 40, 50, 60, 70, 80 °C por 15 ou 240 min. Em seguida, a reação de hidrólise do substrato fluorogênico Leu-AMC foi realizada a 60 °C. A oligomerização da enzima foi determinada por meio da incubação da enzima purificada por 15 min nas temperaturas já mencionadas e, em seguida, submetidas à SDS-PAGE 8% em condições redutoras.

- Efeito de inibidores

Os efeitos de inibidores de proteases e agentes quelantes sobre a atividade da rLAPTc foram testados utilizando uma mistura de reação contendo tampão de reação (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0), substrato Leu-AMC 20 µM, 0,5 µg da enzima e o inibidor na concentração desejada. A enzima foi previamente incubada por 15 min com cada inibidor dissolvido no tampão de reação e as misturas de reação foram incubadas por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, o aumento da fluorescência resultante da hidrólise do substrato foi calculado conforme descrito nos itens anteriores. Os inibidores utilizados e suas respectivas concentrações foram 1,10-fenantrolina 5 mM, Bestatina 10

μM , EDTA 10 mM, PMSF 1 mM, E-64 10 μM , Pepstatina A 1 μM , Leupeptina 100 μM e TPCK 100 μM .

Determinação das velocidades de hidrólise de Leu-AMC em diferentes concentrações, e cálculos da constante de Michaelis-Menten (K_m), velocidade máxima (V_{\max}), constante catalítica (k_{cat}) e eficiência catalítica (k_{cat}/K_m)

Para investigar o comportamento cinético da enzima, os valores de V_{\max} (velocidade máxima) e K_m (constante de Michaelis-Menten) foram determinados por regressão hiperbólica. Após diluição seriada da enzima no sistema de reação, em concentrações crescentes do substrato (Jia et al., 2010), a fluorescência foi lida conforme descrito acima. As concentrações utilizadas foram as necessárias para saturar os sítios ativos da enzima. Os testes foram realizados em triplicatas, onde 200 ng da enzima pura, após o segundo passo de purificação em coluna de filtração em gel, foram incubados em tampão Tris-HCl pH 8,0 em uma diluição seriada do substrato L-Leu-AMC em concentrações variando entre 2,5 e 500 μM . Os valores de V_{\max} e K_m foram calculados com o auxílio do programa computacional GraFit 7.0 (Leatherbarrow, 2009) e GraphPad Prism 5 (www.graphpad.com/prism). O valor de k_{cat} foi calculado pela equação $k_{\text{cat}}=V_{\max}/[E]_0$, onde $[E]_0$ representa a concentração ativa da enzima.

Produção de anticorpos em camundongos

Anticorpos contra a enzima rLAPTc purificada foram produzidos em camundongos BALB/c. Antes do primeiro desafio, amostras de sangue foram coletadas, os soros separados, diluídos em glicerol 1:2 e estocados a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Cada animal foi imunizado via intra-dérmica com a proteína purificada. Os animais receberam três doses com 5 μg do antígeno por aplicação em intervalos de 15 dias, ajustando o volume final com solução salina.

O primeiro desafio foi realizado na presença de adjuvante completo de Freud, o segundo na presença de adjuvante incompleto de Freud e o terceiro foi realizado sem a adição do adjuvante. Os soros foram coletados após 5 dias do desafio, diluídos em glicerol 1:1 e estocados a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até o uso.

Immunoblot

Extrato total de *E. coli* BL21(DE3) induzido foi separado em SDS-PAGE 8% e as proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Amersham). A membrana foi bloqueada por incubação em PBS-leite 5% por 1 h a temperatura ambiente ou durante toda a noite a 4 °C. A membrana bloqueada foi incubada por 2 h com o anti-soro anti-rLAPTc diluído 1:1000 em PBS-leite 1%. Após três lavagens de 5 min cada em PBS, a membrana foi incubada por 2 h com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina diluído 1:5000 em PBS-leite 1%. A membrana foi novamente lavada com PBS como descrito acima, incubada por 10 min no tampão de reação indicado pela fabricante contendo o substrato NBT/BCIP (Promega).

Imunocitocalização

Para determinar a localização da protease nas diferentes formas do parasito, ensaios de imunofluorescência indireta foram realizados utilizando o anticorpo específico contra a LAPTc. Os parasitos foram coletados, lavados três vezes com PBS 1X, fixados em formaldeído 3,7% por 20 min e depositados sobre lâminas previamente tratadas com poli-lisina. A seguir, os parasitos foram permeabilizados com Triton X-100 1% em PBS por 10 min e lavados 3 vezes com PBS para a retirada do excesso de Triton. Em seguida, os sítios inespecíficos dos parasitos foram bloqueados com PBS-leite 5% por 30 min e incubados com o anticorpo primário anti-soro anti-LAPTc diluído 1:40 em PBS-leite 1% por 2 h em uma câmara úmida. Após 3 lavagens em PBS, as lâminas foram incubadas por 2 h com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à Alexa 488 diluído 1:400 em PBS-leite 1%. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas 5 vezes com PBS, montadas com prolongador de efeito contendo DAPI e observadas em microscópio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Resultados

Os produtos de PCR de *laptc1* e *laptc2* possuem tamanhos preditos

Com o objetivo de clonar os genes *laptc1* e *laptc2*, oligonucleotídeos específicos foram empregados em reações de polimerização em cadeia tendo-se DNA genômico total de *T. cruzi* como molde. Análise eletroforética revelou que os produtos obtidos possuem tamanhos esperados: 1,7 e 1,5 kb para *laptc1* e *laptc2*, respectivamente (Figura 8A, linhas 1 e 2). A linha 3 mostra o produto de PCR obtido com oligonucleotídeos desenhados para posterior clonagem de *laptc2* no sistema baculovírus (*laptc2-bac*). As bandas correspondentes aos produtos amplificados foram excisadas e eluídas do gel para posterior ligação nos vetores de clonagem (Figura 8B).

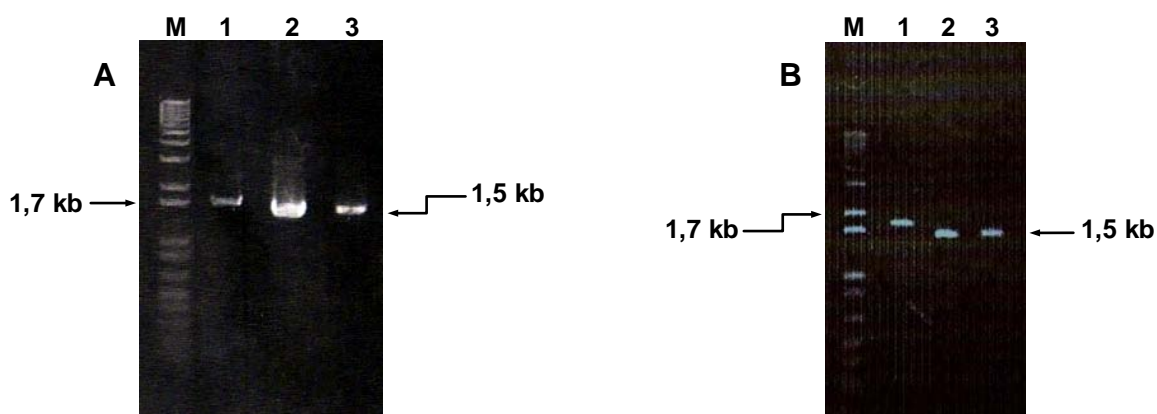


Figura 8. Análise por PCR e eluição a partir de gel de agarose mostrando os genes amplificados e purificados, respectivamente. (A) fragmentos *laptc1* (1), *laptc2* (2) e *laptc2-bac* (3) amplificados nos tamanhos esperados a partir do material genômico de *T. cruzi* com os oligonucleotídeos específicos, sob as condições descritas em Materiais e Métodos. O marcador de tamanho molecular *1 kb plus DNA ladder* foi usado como controle (M). (B) Análise da eluição dos fragmentos amplificados por PCR contidos nas bandas excisadas do gel A.

Os fragmentos amplificados foram corretamente ligados ao vetor de clonagem

Os produtos de PCR purificados do gel de agarose, conforme descrito em materiais e métodos, foram ligados aos vetores de clonagem. Os genes *laptc1* e *laptc2* foram ligados ao vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) e o fragmento *laptc2-bac* foi ligado ao vetor pGEM[®]-T (Promega). Os produtos de ligação foram transformados em células competentes de *E. coli* DH5 α e as

colônias brancas foram submetidas à triagem após extração dos plasmídeos por fenol-clorofórmio. Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas adequadas e os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 9). As colônias transformadas com pCR[®]2.1-TOPO[®]+*laptc1* (linhas 1 e 2), com pCR[®]2.1-TOPO[®]+*laptc2* (linhas 3 e 4) e com pGEM[®]-T+*laptc2-bac* (linhas 5 e 6) resultaram em bandas no tamanho esperado para os clones, indicando a presença de plasmídeos negativos (linhas 1, 3 e 5) e positivos (linhas 2, 4 e 6). As colônias positivas, as quais apresentaram as bandas com massas moleculares mais elevadas no gel da Figura 9A (linhas 2, 4 e 6), tiveram seus plasmídeos recombinantes re-extraídos e purificados por lise alcalina. Em seguida, a ligação dos insertos *laptc1* e *laptc2* no vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] e de *laptc2-bac* ao pGEM[®]-T foram confirmados por PCR com o uso dos oligonucleotídeos específicos de cada gene. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% mostrou o tamanho das bandas no tamanho esperado (Figura 9B).

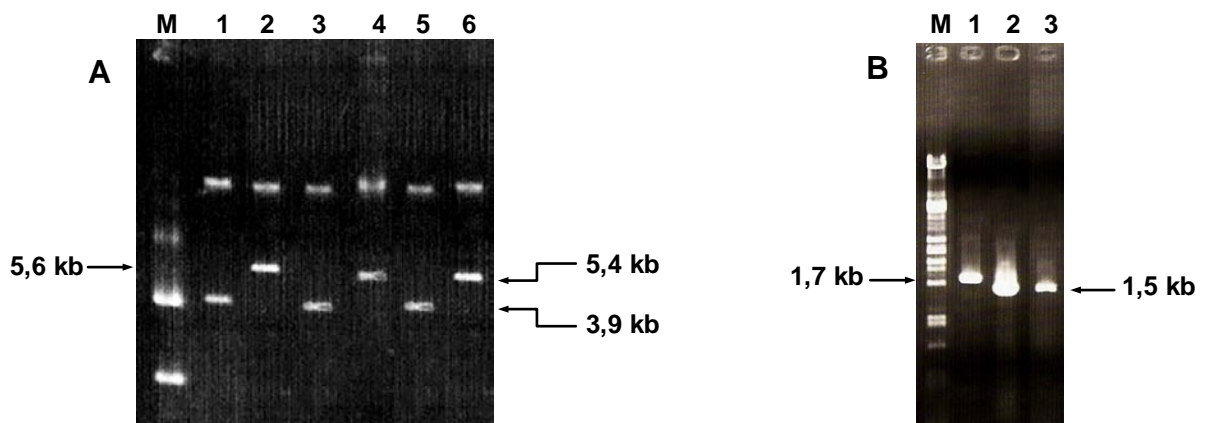


Figura 9. Padrão de migração dos plasmídeos extraídos por fenol-clorofórmio e confirmação dos clones recombinantes por PCR. (A) As colônias transformadas com os clones pCR[®]2.1-TOPO[®]+*laptc1* (linhas 1 e 2), pCR[®]2.1-TOPO[®]+*laptc2* (linhas 3 e 4) e pGEM[®]-T+*laptc2-bac* (linhas 5 e 6) foram crescidas em meio LB e os plasmídeos foram extraídos por fenol-clorofórmio. Os clones positivos (linhas 2, 4 e 6) foram selecionados, crescidos novamente e seus plasmídeos foram re-extraídos por lise alcalina. Em seguida os plasmídeos purificados foram analisados por PCR utilizando os iniciadores específicos dos genes inseridos em cada clone e, então, visualizados em gel de agarose 0,8% **(B)**. **M** representa o marcador de tamanho molecular; os insertos *laptc1* (linha 1), *laptc2* (linha 2) e *laptc2-bac* (linha 3) amplificados por PCR estão indicados.

Análises de restrição foram realizadas para a liberação dos insertos. Os clones pCR[®]2.1-TOPO[®]+*laptc1* e pCR[®]2.1-TOPO[®]+*laptc2* foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, utilizadas na síntese dos oligonucleotídeos, liberando os insertos de forma correta e nos tamanhos esperados (Figura 10A). O clone pGEM[®]-T+*laptc2-bac* foi digerido com as enzimas *BamHI* e *XhoI* resultando na liberação correta do inserto (dados não mostrados). Os fragmentos de 1,7 e 1,5 kb referentes aos insertos liberados do vetor de clonagem por digestão enzimática foram excisados, eluídos e purificados do gel de agarose. A seguir, os fragmentos purificados (Figura 10B) foram ligados no vetor de expressão pET-19b, no caso dos insertos *laptc1* e *laptc2* (Figura 10B, linhas 1 e 2 respectivamente), ou ligados no vetor de transferência pFastBac[™]1, no caso do inserto *laptc2-bac* (dados não mostrados).

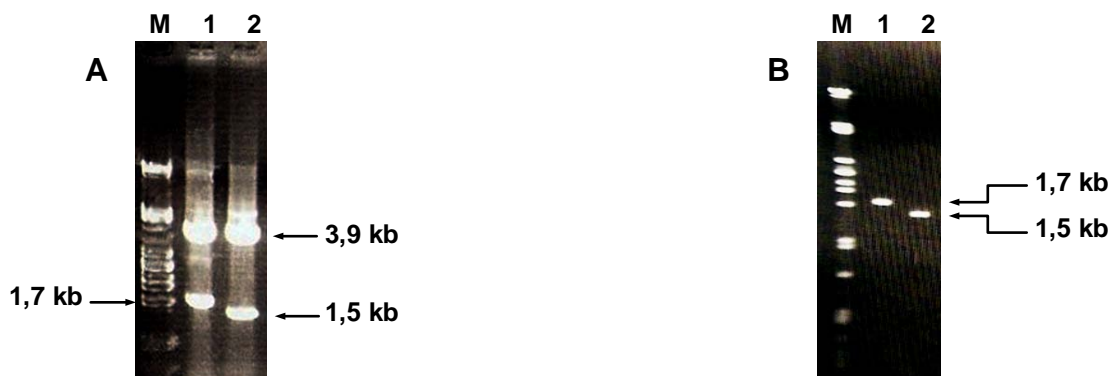


Figura 10. Digestão completa dos clones e eluição dos insertos liberados. (A) Os clones pCR[®]2.1-TOPO[®]+*laptc1* (linha 1) e pCR[®]2.1-TOPO[®]+*laptc2* (linha 2) foram totalmente digeridos com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, liberando os insertos nos tamanhos corretos. **(B)** Os genes *laptc1* (linha 1) e *laptc2* (linha 2) foram eluídos e purificados das bandas excisadas do gel em A, mostrando os fragmentos purificados e prontos para a clonagem no vetor de expressão. **M** representa o marcador de tamanho molecular.

Clonagem dos genes da LAP de *T. cruzi* em vetor de expressão

Os fragmentos *laptc1* e *laptc2* liberados do vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] por digestão dupla e purificados do gel foram corretamente ligados ao vetor de expressão pET-19b (Novagen) previamente digerido com as enzimas *NdeI* e

*Xho*I. As ligações foram confirmadas por uma triagem de plasmídeos extraídos por fenol-clorofórmio de colônias selecionadas (dados não mostrados).

Os clones positivos em vetor de expressão foram confirmados por PCR, onde os fragmentos correspondentes aos genes foram amplificados com iniciadores dos genes e do vetor resultando nos tamanhos esperados (Figura 11, linhas 6 e 7), e por análise de restrição, mostrando os tamanhos moleculares do inserto e do vetor (Figura 11, linhas 4 e 5). O inserto *laptc2-bac* foi ligado ao vetor de transferência pFastBacTM1, o clone recombinante foi transformado em células *E. coli* DH10-BAC onde o gene foi inserido no genoma da bactéria formando o bacmídeo recombinante, que foi extraído e estocado a -20 °C (dados não mostrados).

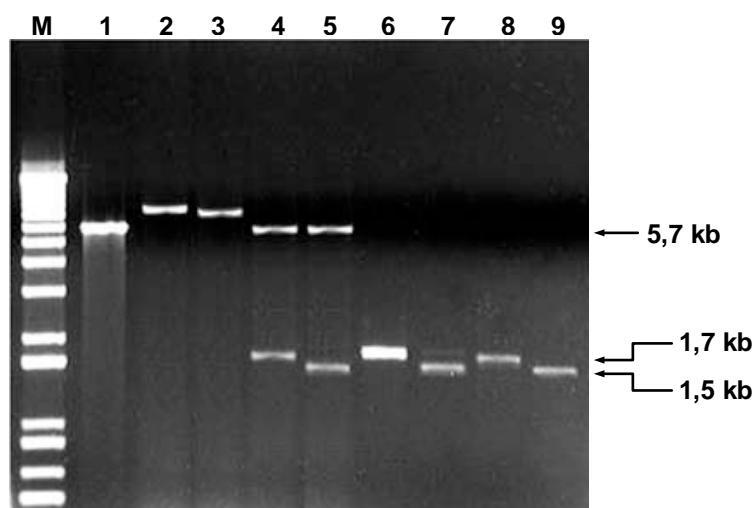


Figura 11. Confirmação dos clones recombinantes pET-19b+*laptc1* e pET-19b+*laptc2* por PCR e análise de restrição enzimática. (1) vetor pET-19b vazio (controle); (2) e (3) clones pET-19b+*laptc1* e pET-19b+*laptc2*, respectivamente, linearizados com *EcoRI*, por possuírem um único sítio para esta enzima em seu mapa; (4) e (5) digestão completa dos clones pET-19b+*laptc1* e pET-19b+*laptc2*, respectivamente, com *NdeI* e *XhoI* liberando completamente os insertos; (6) PCR utilizando como molde clone pET-19b+*laptc1* e os oligonucleotídeos específicos para o gene *laptc1* e iniciadores do plasmídeo; (7) PCR utilizando como molde clone pET-19b+*laptc2* e os oligonucleotídeos específicos para o gene *laptc2* e iniciadores do vetor; (8) e (9) eluição dos fragmentos *laptc1* e *laptc2* (controle), respectivamente; (M) marcador molecular 1 kb plus DNA ladder.

Análise filogenética

As sequências deduzidas das leucil-aminopeptidases clonadas foram comparadas com as enzimas de outros organismos. O alinhamento das sequências múltiplas de aminoácidos das LAPs de *Trypanosoma cruzi* (números de acesso EAN97960.1 e EAN87580.1), *Trypanosoma brucei* (números de acesso EAN79621.1 e AAX70152.1), *Leishmania major* (números de acesso CAJ02694.1 e AAL16097.1), *Leishmania braziliensis* (número de acesso CAM36610.1), *Escherichia coli* (número de acesso YP_672349.1), *Arabidopsis thaliana* (número de acesso NP_194821.1) e *Homo sapiens* (número de acesso AAD17527.1) revelou domínios conservados localizados na região C-terminal das sequências das enzimas alinhadas (Figura 12). A leucil-aminopeptidase de *T. cruzi* (LAPTc2) pertence a família M17 de metalopeptidases, também conhecida como família das leucil-aminopeptidases. Além disso, ela compartilha uma identidade de 34 a 66% com sequências de outros membros da família M17. O alinhamento múltiplo das sequências peptídicas também revelou que a porção C-terminal é a região mais conservada nesta família, alcançando 72% de identidade e 83% de similaridade entre *T. cruzi* e *T. brucei*. A LAPTc2 possui o sítio catalítico (Lys²⁹⁹ e Arg³⁷³), destacado em vermelho, os resíduos de ligação a metal (Lys²⁸⁷, Asp²⁹², Asp³¹⁰, Asp³⁶⁹ e Glu³⁷¹), mostrados em azul, e a assinatura NTDAEGRL, sublinhada no alinhamento, altamente conservados entre as sequências da família M17.

Esses resultados foram reiterados por análises filogenéticas das sequências de aminoácidos, como mostra a árvore filogenética (Figura 13). É interessante notar que as sequências dos cinetoplastídeos estão divididos em dois clados definidos com um suporte de *bootstrap* muito forte. Um grupo de cinetoplastídeos é formado por sequências anotadas como aminopeptidases e o outro grupo tem sequências assinadas como leucil-aminopeptidases. A enzima LAPTc2, identificada na árvore pelo quadrado preenchido, está agrupada como uma aminopeptidase dentro do clado I de Kinetoplastida. Já a LAPTc1, destacada pelo círculo preenchido, encontra-se inserida no grupo das leucil-aminopeptidases, no clado II de Kinetoplastida.

<i>T. cruzi</i>	CVRITVVVFP-----APNPSPELVVATSTQLCQRLVDAPNLLNLTATFAEVAQSYAKELG--CAVDVICGSEL	246
<i>T. brucei</i>	VSRIVQVVFPE-----PPAIPPKDLEAVATSTQLCQRLVDAPNLLTATFTEFAQGYAKALG--FDVDVICGDDL	248
<i>L. major</i>	AMSNVVMSSRAAFTQELVGRKSVCVVALEAICTSVQLCQRLVDTEPCMLDITVVVAETAAAYAAELG--VDMTIVKGGDL	255
<i>T. cruzi</i>	PMGTFIDLSVA-----TDAIARGNHGGCVNEARSLGNLREDEGSEFQLYYEWITKELAPLG--VKVRHVLKGEKI	271
<i>T. brucei</i>	QLNFIIDCGD-----KTSIASGNHGHICINDARNLGNLREDEGTFQFYCEWIHQELAPLG--IKVQNVLHGEQL	271
<i>L. major</i>	PMEIVVASSN-----AQAVRAGEVIGHCVNEARNLGNLREDEGVVEFVAEWAKKYMIPG--IKVRKVLKGGQL	284
<i>L. braziliensis</i>	PMEIVVASSN-----AQAVRTGEVIGHCVNDARNLGNLREDEGVVEFVVEWAKKYIIPG--IKVRKVLKGGQL	174
<i>E. coli</i>	LRKMFVFNPTRELT-----GERAIQHGLAFAAGIKAKKLDLGNMPPNLCNAAYTASCAROLADSYSKNVIITRVI	228
<i>A. thaliana</i>	SLKSVDIIGFGSGPE-----LEKCLKYAEHVSYGVIFGKELVNSPANVLTFAVLAEBEALNLSMYSVDMTANTILNEEQ	309
<i>H. sapiens</i>	VSAKLYGSGD-----QEAQWQKCVLFASGQNLARQLMETPANEMTETREAEIIEKNLKSASSKTEVHTRPKSWI	240
<i>T. cruzi</i>	RERCYGGIYVSGKCAAEAPRLVITLISYKPK--KDETRKKVALVGRGIVVDSGGISIKPTNF--MTGMRKDMGGA	322
<i>T. brucei</i>	CERCYGGIYVSGKAAFEAPRLVITLISYKPK--KGTTPVKVSLVGRGIVVDCGGIATKPADY--MKLMKHD	324
<i>L. major</i>	RERCYGGIYVSGKCAQYPAHLVITLIRYRNPAEAGAKNIAMVGRGIVVDCGGIATKPAAH--MTNMRKDMG	333
<i>T. cruzi</i>	RGAGLNLLYVVGKGRHKEMLVVEFYTG--NRHSDE--ATALVGRGIVTDCGGISIKBAGS--MEGMHDDM	313
<i>T. brucei</i>	EKAGLNLLYVVGKGRKHTMLVVEFYTG--DKRSNK--ATALVGRGIVTDCGGIINIKPFGS--METMHD	347
<i>L. major</i>	EEAGLHLLYVVGGRSRYEEMLVVEFYTG--NPRSSA--TTALVGRGIVTDCGGIINIKPYTS--METMHS	360
<i>L. braziliensis</i>	EEAGLHLLYVVGGRSRYEEMLVVEFYTG--NPRSSA--TTALVGRGIVTDCGGIINIKPYTS--METMHD	250
<i>E. coli</i>	RELGMHSLYAVGQGSQNESLMSVLEIYKPK--NASEDARPTVLVGRGIVTDCGGISIKBSEG--MDEM	305
<i>A. thaliana</i>	RELKMGSYLAVAASANPEHFIHLIYKPK--SSGPVKTKLALVGRGIVTDCGGIINIKTPGCLLEIMKED	388
<i>H. sapiens</i>	EEQAMGSFLSVAKGSDEPEVLELHYKPK--SPNANPEFLVVEVGRGIVTDCGGISIKASAN--MDLMR	317
<i>T. cruzi</i>	TAVR-----LQMPIELSCITLCLAENAIGEDANRNDITLTKSGTVEVNTDAEGRIVLGDGVFHATHEI--SFK	392
<i>T. brucei</i>	TAVR-----LQQPVQLSCTLCLAENAIGEKSYRNDITLVMKSGTVEVNTDAEGRIVLGDGVFHATNEL--S	394
<i>L. major</i>	AVVRSMKMQRTHFSHTANTSVTLCLAENAIGEPHSYRNDIVVMKSGSVEVNTDAEGRIVLGDGVYATGEQ--	411
<i>T. cruzi</i>	ATAKRLQLP-----VNVVGAAGLVAENAIIGEDSYHPESSITLSRKGLTVEVNTDAEGRIVLADTL	385
<i>T. brucei</i>	ATAKRLQLP-----VNVVAAVGLVAENAIIGEDSYHPESSITLSRKGLSVEVNTDAEGRIVLADTL	419
<i>L. major</i>	ATAKRLQLP-----INVVAAGLVAENAIIGEDSYHPESSITLSKGLTVEVNTDAEGRIVLADTL	432
<i>L. braziliensis</i>	ATAKRLQLP-----INVVAAGLVAENAIIGEDSYHPESSITLSKGLTVEVNTDAEGRIVLADTL	322
<i>E. coli</i>	MVAEQLP-----INVIGVLACGNMIFGGRAPFGDVLITMSEGTVEVNTDAEGRIVLGDVLYVERFE--	372
<i>A. thaliana</i>	AIGQIKFPG-----VEVHFIVAACENMIFSGTMRPGDVLITASNGRTVEVNTDAEGRIVLADALVYACNQ	456
<i>H. sapiens</i>	SARKLNLP-----INTIIGLAPLCEGNMIFSGKANKPGDVVRAKNGRTIIVDNTDAEGRIVLADALVYAH	384
<i>T. cruzi</i>	VLVDVATLTGAQGIATGRHHAGIIVNDEEEELSFLKAGRVSGTCTCFVLYCPEYHVTEFRSPVADMRNS	472
<i>T. brucei</i>	VVIDVATLTGAQGIATGRHHAGLVNDEEGAEAAMLRAGRESGCTCFVLYCPEYHEPEFRSNHADMTNLM	474
<i>L. major</i>	VVIDVATLTGAQGVATGRKHAQVYASDAEAEKDMITAGLQSGDLCYFVLYCPEYHEEVKSPCADMRNI	491
<i>T. cruzi</i>	TVIDVATLTGAILIIGLGSRRAGVPSNDLHLSQHTMASGRSSGDELWPMPIGDEH--KNAMKGGIADL	463
<i>T. brucei</i>	TIIDVATLTGAILVGLGSRRAGVPSNDIALVQQLMASGRSSGDEWPMPIGDEH--QRAIKGNIAIDL	497
<i>L. major</i>	RIIDVATLTGAILVGLGSRRAGVPSPSAMLANSLMAGTQCCEELWPMPIGDEH--KDMKGGIADL	510
<i>L. braziliensis</i>	RIIDVATLTGAVVSLGSRRAGVPSPSMTLANSLMSTGTRCGEELWPMPIGDEH--KDMKGGIADL	400
<i>E. coli</i>	AVIDVATLTGACVIALGHHITGLMANNHPLAHEITAAASEQSGDRAWRLPLGDEY--QEQLSNDAD	449
<i>A. thaliana</i>	KVVDVATLTGACIIALGTSMAGIYTPSDKLAKEVLAASERSGFKLWRMPEESY--WEMKSGVAD	533
<i>H. sapiens</i>	VILNVAATLTGAMDVALGSGATGVETNSWLNKLFEEASITGDRVWRMPLFEHITROVVDQADVNN--	463
<i>T. cruzi</i>	AGHIVANHLSPDFKGRHIVDMAFPAPF-----NDKATGFGFPALLMEYLLNLR-----	520
<i>T. brucei</i>	AGYVITHTHLSPKFTGAHIVDLAYPVFN-----SNGATGFGFPALLMEYERKFL-----	521
<i>L. major</i>	GGHIVVEQHLSEFRFGFFVHVDMAYPSTN-----TAGATGFGVLLVFEFLRQH-----	538
<i>T. cruzi</i>	AAAFITSNIEDGMKWAHLDIAGPDMGGDKPKGFPQACAFGFGVQVMTLDYFR-----LTPVD	577
<i>T. brucei</i>	AAAFITSNIEKDKVWAHLDIAGSGMGDDKPKGFPQACAFGFGVQVMTLDYFR-----LTPVD	577
<i>L. major</i>	AAAFITSNIEVEVQWAHLDIAGVADVGDKPKGYEPAGVTFGFGVQLLVDFLR-----HNKP	565
<i>L. braziliensis</i>	AAAFITSNIEVEVQWAHLDIAGVADVGDKPKGYEPAGVTFGFGVQLLVDFLR-----HNKP	455
<i>E. coli</i>	AGCFITSRIT--RKYNWAHLDIAGTAWRSG-----KAKGATGREVALLAQOFLN-----	503
<i>A. thaliana</i>	AAAFITKQVSEDEVWHLDVAGPVWNE-----KKKAAFGFGVATLVEVWQV-----HSSS	583
<i>H. sapiens</i>	AAAFITKEEV--THPKWAHLDIAGVMTNKDEVY--YLRKGMGRPRTRTLEFLR-----FSQD	519

Figura 12. Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos da região C-terminal de diferentes aminopeptidases. As seqüências dos aminoácidos da porção C-terminal conservada das aminopeptidases foram alinhadas pelo programa ClustalX. Os aminoácidos marcados em preto mostram pelo menos 60% de identidade e aqueles marcados em cinza mostram pelo menos 60% de similaridade. Os sítios de ligação a metal (caixas azuis), os sítios catalíticos (caixas vermelhas) e a assinatura NDAEGRL (sublinhada) estão representados. As caixas verdes representam a LAPTc2 e as caixas amarelas mostram a LAPTc1. As seqüências alinhadas foram: *Trypanosoma cruzi* (números de acesso EAN97960.1 e EAN87580.1), *Trypanosoma brucei* (números de acesso EAN79621.1 e AAX70152.1), *Leishmania major* (números de acesso CAJ02694.1 e AAL16097.1), *Leishmania braziliensis* (número de acesso CAM36610.1), *Escherichia coli* (número de acesso YP_672349.1), *Arabidopsis thaliana* (número de acesso NP_194821.1) e *Homo sapiens* (número de acesso AAD17527.1).

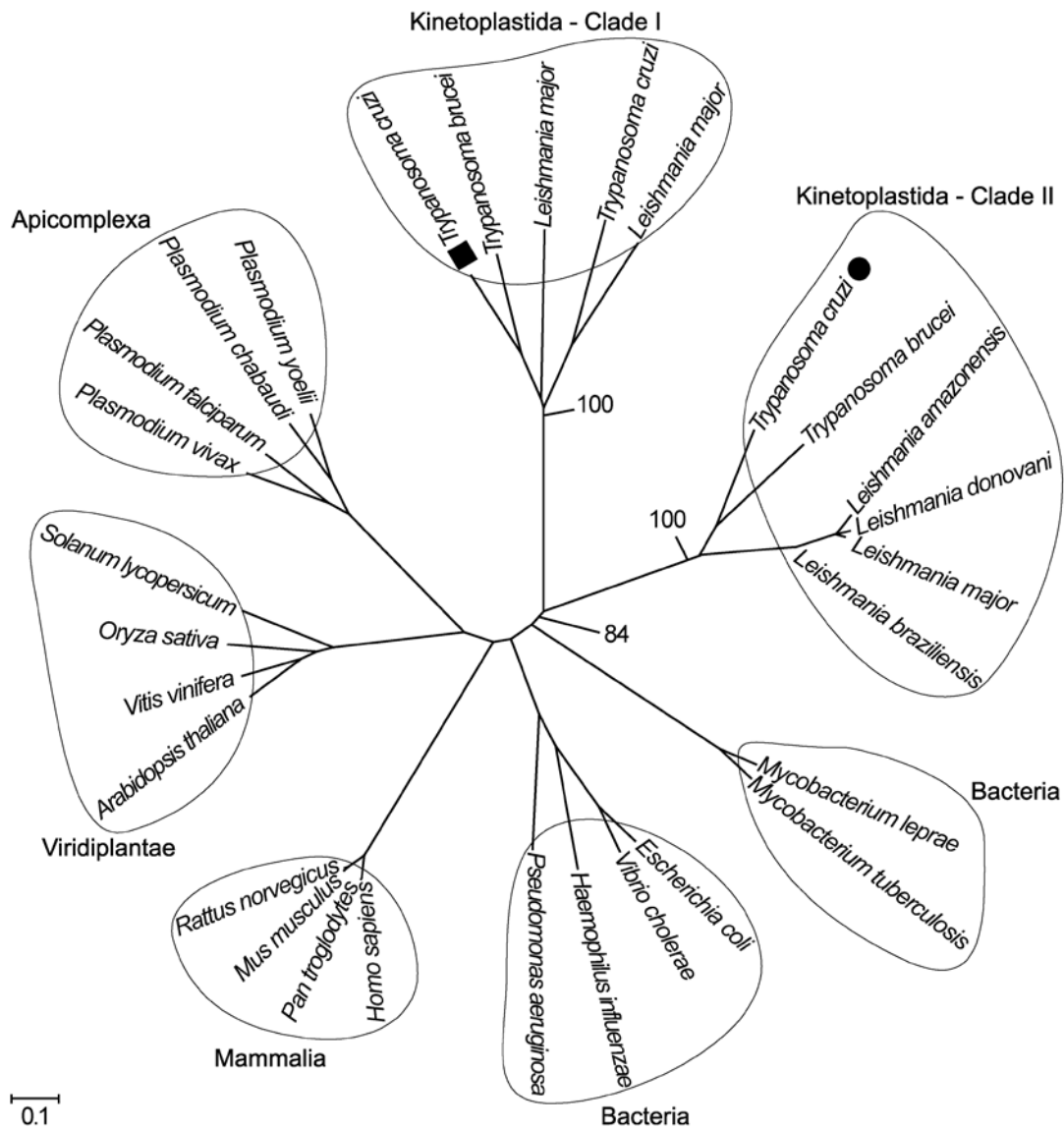


Figura 13. Relação filogenética das LAPs de *T. cruzi* com aminopeptidases de outros organismos. As 29 sequências completas das enzimas (listadas em Materiais e Métodos) foram derivadas do banco de dados de proteínas do NCBI (National Center for Biotechnology Information) após buscas por membros da família M17. As sequências peptídicas foram alinhadas pelo programa ClustalX e a árvore filogenética criada por homologia foi feita com a utilização do pacote MEGA após 1000 bootstraps, por meio do método Neighbor-joining. O círculo preenchido indica a enzima LAPtC1 e o quadrado indica a LAPtC2. A barra de escala representa 10% de substituição de aminoácido por sítio.

Expressão e purificação da leucil aminopeptidase recombinante de *T. cruzi*

As duas leucil aminopeptidases de *T. cruzi*, rLAPTc1 e rLAPTc2, foram expressas em *E. coli* transformada com o plasmídeo pET-19b contendo o fragmento de DNA referente aos insertos (*laptc1* e *laptc2*). Apesar de inúmeras tentativas com variação de concentração de IPTG e de temperatura, a enzima rLAPTc1 foi apenas parcialmente expressa por *E. coli*. Em adição, não conseguimos purificar a pequena quantidade de enzima expressa (dados não mostrados). Por isso, seu clone foi estocado em glicerol a -80 °C para posterior tentativa de estabelecimento de protocolo adequado. A indução da enzima LAPTc2 foi determinada e realizada com 1 mM de IPTG a 20 °C durante 15 h. A proteína recombinante foi produzida com cauda de histidina em sua região N-terminal (Figura 14).

A enzima rLAPTc2 expressa, chamada a partir daqui de rLAPTc, foi inicialmente purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel de onde a enzima foi eluída com 400 mM de imidazol em alíquotas de 500 µl, como observado em SDS-PAGE 8% (Figura 14, linhas 6 a 10). A rLAPTc com a cauda de histidina fusionada em sua extremidade N-terminal apresentou uma massa aproximada de 58 kDa nas frações fervidas (cabeça da seta), o que corresponde a sua forma monomérica (Figura 14, poços 2 e 11). Nas frações não-fervidas a proteína purificada apareceu com duas massas moleculares distintas; 55 kDa e com aproximadamente 220 kDa (seta), sendo que esta última refere-se à sua forma oligomérica (Figura 14, linhas 1 e 5 a 8). Em algumas preparações, uma banda com massa molecular superior àquela da banda principal aparecia no gel (asterisco).

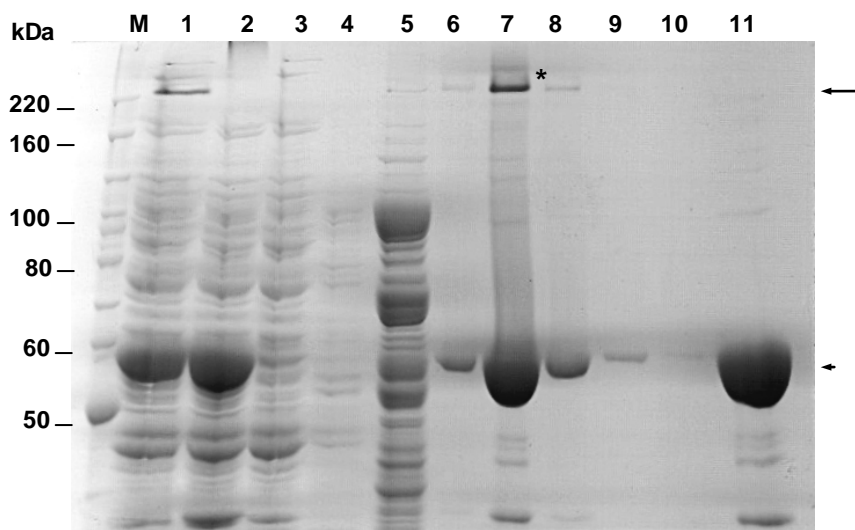


Figura 14. Visualização após SDS-PAGE 8% da rLAPTc2 (rLAPTc) expressa e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. (M) marcador de massa molecular; (1) amostra não-fervida do extrato total solúvel de bactérias induzidas; (2) amostra fervida do extrato total solúvel de bactérias induzidas; (3) fração não ligada; (4) fração coletada após passagem do tampão de ligação (imidazol 5 mM); (5) fração coletada após passagem do tampão de lavagem (imidazol 100 mM); (6) a (10) frações eluídas com tampão de eluição (imidazol 400 mM); (11) amostra número 7 fervida. A seta e a cabeça da seta indicam as formas oligoméricas e monoméricas da enzima, respectivamente. O gel, contendo 0,1% de SDS, foi corado com azul de Coomassie.

A estrutura oligomérica da LAPTc recombinante é sensível a SDS

A estrutura da enzima purificada foi analisada em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes, sem fervura prévia (Figura 15, linha 2). De modo diferente do que acontece na presença de 0,1% de SDS, após ser submetida a PAGE 8% a proteína manteve sua forma oligomérica totalmente intacta, sugerindo que o oligômero é bastante sensível ao SDS. Este resultado mostra que a forma recombinante da enzima apresenta uma sensibilidade muito alta a este detergente. Após a corrida, o gel foi corado com azul de Coomassie.

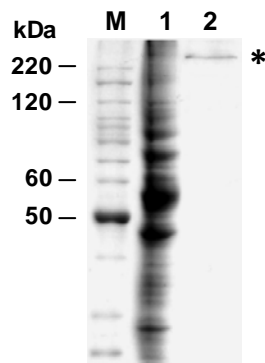


Figura 15. LAPTc recombinante é sensível ao SDS. (M) marcador de massa molecular *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen). Análise eletroforética por PAGE 8% do extrato total de *E. coli* (linha 1) e a rLAPTc purificada (linha 2). A estrutura oligomérica de 220 kDa da proteína purificada (indicada pelo asterisco) é sensível à presença de SDS. O gel foi corado com azul de Coomassie.

A leucil-aminopeptidase recombinante de *T. cruzi* possui atividade ótima em pH alcalino

A influência do pH na atividade da rLAPTc purificada foi determinada. Sua atividade enzimática foi avaliada em diferentes faixas de pH pela incubação da enzima purificada com 20 μ M de substrato L eu-AMC, em tampão HTE durante 10 min à temperatura ambiente. A fluorescência liberada calculada mostrou que a atividade ótima da enzima ocorre em pH 8,0. Nos pHs 7,5 e 9,0 a enzima perde 60% e 75% de sua atividade máxima registrada em pH 8,0, respectivamente (Figura 16).

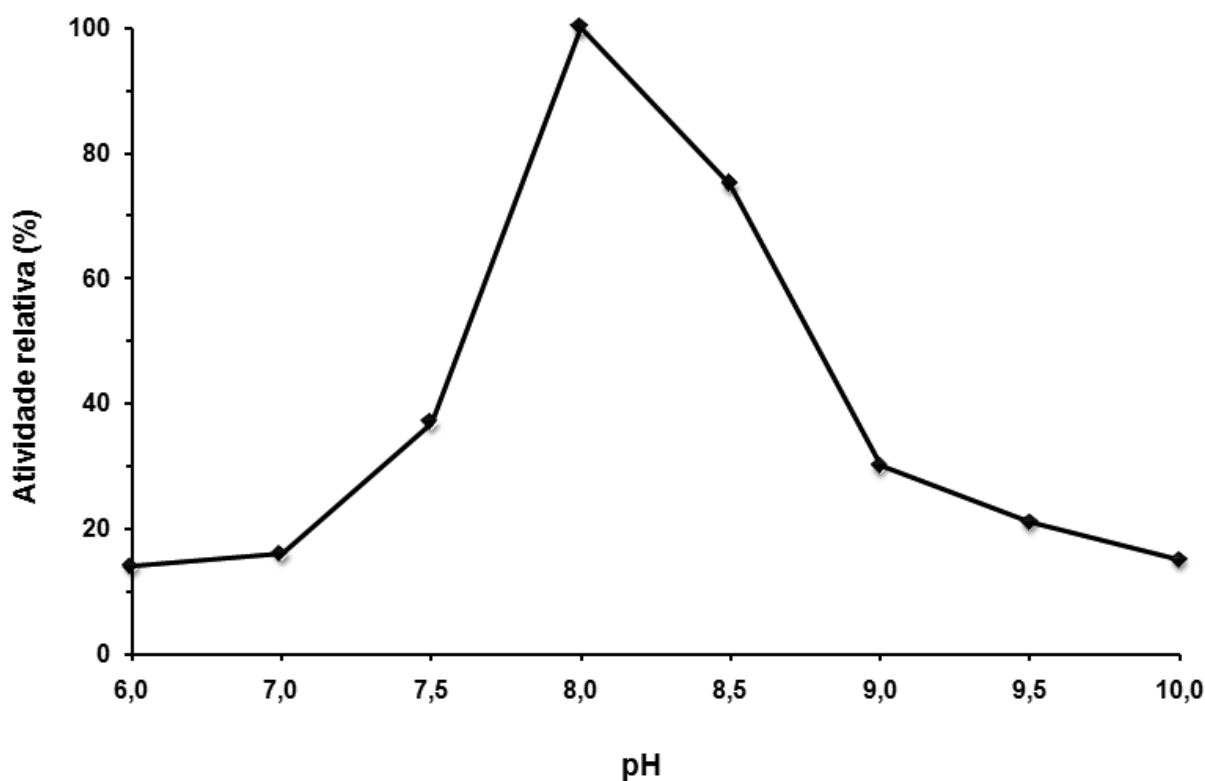


Figura 16. Dependência de pH da atividade da rLAPTc. A quantidade de 500 ng da enzima purificada foi incubada com 20 μ M do substrato Leu-AMC em 100 μ L de tampão HTE. A atividade enzimática relativa foi medida conforme descrito em materiais e métodos.

A rLAPTc é sensível a inibidores de metalo-peptidases e a agentes quelantes

A atividade da enzima recombinante purificada sobre o substrato fluorogênico Leu-AMC mostrou sensibilidade a inibidores de metalo-peptidases e agentes quelantes (Figura 17). A atividade da rLAPTc foi reduzida a 13 e 1% por 5 mM de 1,10-fenantrolina e por 10 μ M de bestatina, respectivamente. EDTA diminuiu a atividade da rLAPTc a 7%, em uma concentração de 10 mM. Inibidores de outras classes de enzimas como PMSF, E-64, Pepstatina A, Leupeptina e TPCK não influenciaram na atividade proteolítica da rLAPTc. Estes resultados indicam que a enzima é uma metalo-peptidase.

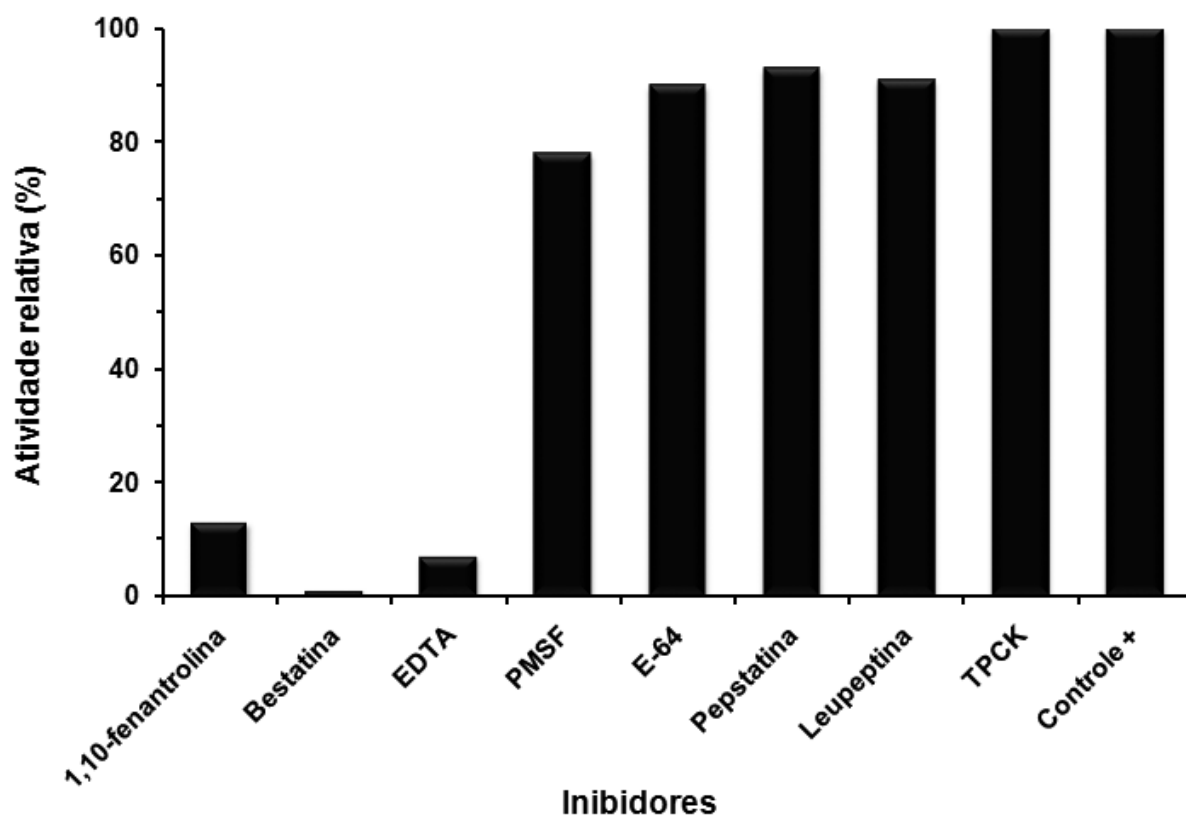


Figura 17. Padrão de inibição da rLAPTc. A enzima purificada foi previamente incubada com diferentes inibidores por 15 min. O substrato Leu-AMC foi adicionado e a atividade enzimática relativa foi monitorada como descrito em materiais e métodos.

A estrutura oligomérica da rLAPTc é formada por um hexâmero

Para verificar e determinar a massa molecular da forma oligomérica da rLAPTc, as frações da enzima purificada eluídas no primeiro passo de purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel foram concentradas e submetidas a cromatografia de exclusão molecular (FPLC), em coluna de gel filtração (Superdex-200), conforme descrito em materiais e métodos. O comportamento da proteína visualizado pelo cromatograma mostrou dois picos: o primeiro na altura de 800 kDa (8,15 mL), que sugere que a enzima forma agregados; e o segundo com 320 kDa (11,36 mL) co-migrando com a atividade enzimática, correspondendo à rLAPTc, sugerindo que a forma oligomérica da enzima recombinante seria formada por um hexâmero (Figura 18).

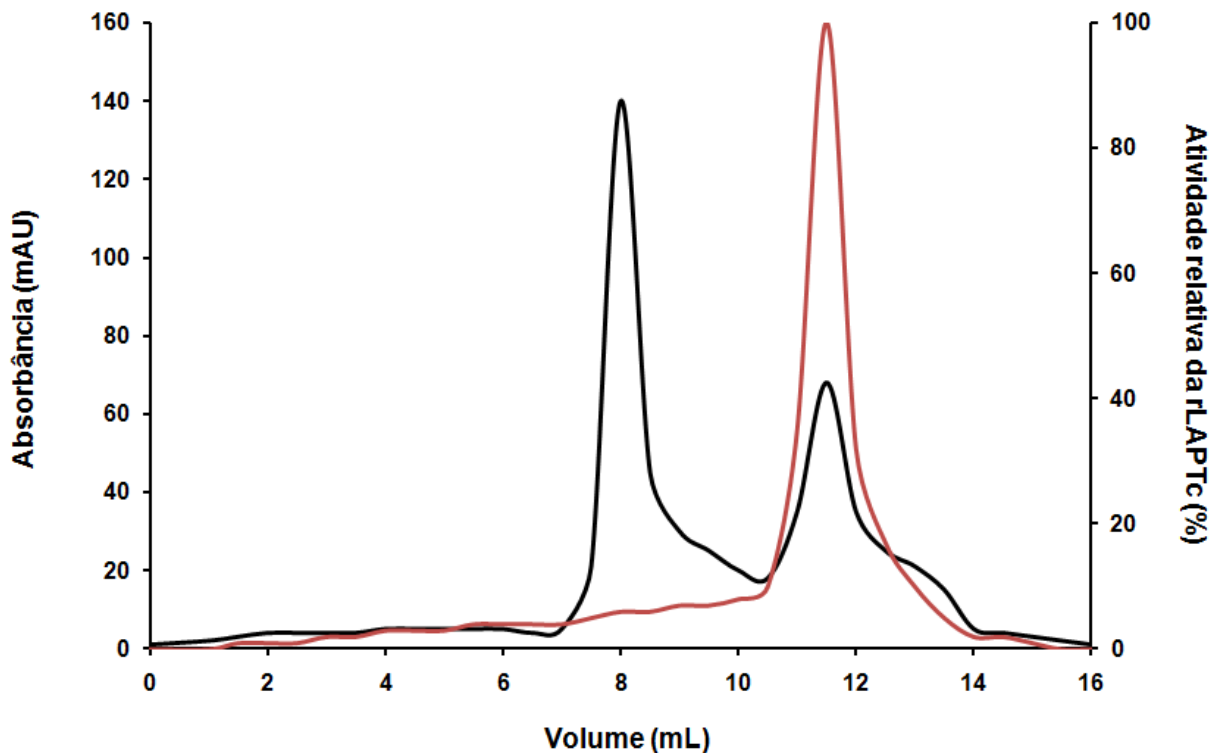


Figura 18. Cromatografia de exclusão molecular da rLAPTc. Cromatograma mostrando o segundo passo de purificação da rLAPTc, estimando que a forma oligomérica da enzima se reúne em um hexâmero de 320 kDa, como observado no pico da fração número 23 (11,36 mL). O pico de 800 kDa da fração número 16 (8,15 mL) sugere a formação de agregados protéicos. Linha preta, perfil cromatográfico; linha vermelha, atividade relativa das frações.

Parâmetros cinéticos da rLAPTc hexamérica

A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) da LAPTc2 purificada foi determinada pelo método de regressão hiperbólica no programa GraFit 7.0, usando Leu-AMC como substrato. A enzima apresentou V_{max} de 7107,7 mURF/min e K_m de 185.9 μM . Sua constante catalítica (k_{cat}) e eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) calculadas foram de 34,84 S^{-1} e 0,19 $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$, respectivamente. A figura 19 ilustra a curva de Michaelis-Menten da rLAPTc.

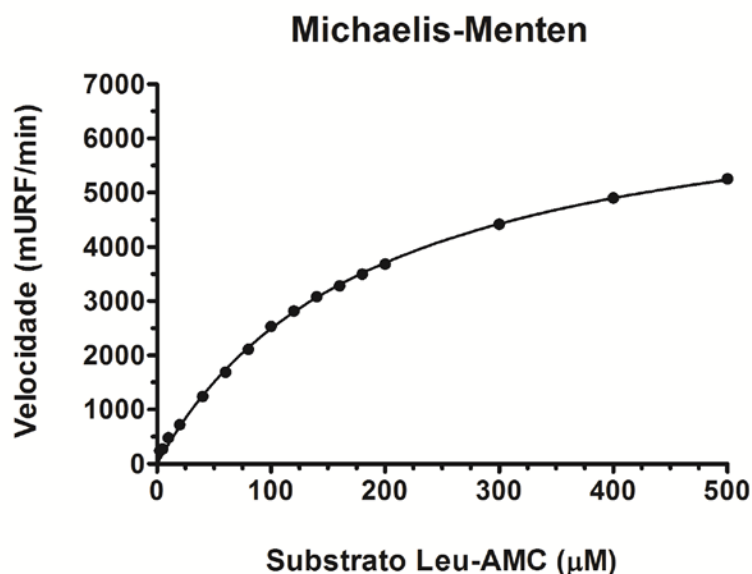


Figura 19. Cinética enzimática da LAPTc2. A, Curva de Michaelis-Menten. O cálculo dos dados e a determinação das curvas foram feitas utilizando o programa Grafit 7 e GraphPad Prism 5.

LAPTc recombinante é imunogênica em camundongo

Para avaliar a imunogenicidade da rLAPTc, 5 μg da enzima purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel foram aplicados em camundongos isogênicos com adjuvante completo de Freud. A coleta do soro dos animais imunizados foi realizada por punção cardíaca e os soros pré-imune e imune foram estocados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na presença de glicerol 50%. A imunogenicidade da enzima foi testada por *Western blot* utilizando extrato total solúvel de bactéria como antígeno.

O ensaio resultou na formação de duas bandas na fração não-fervida, sendo uma banda aproximada de 220 kDa referente ao oligômero e uma banda de 55 kDa referente ao monômero. A fração fervida mostrou uma única banda de 55 kDa esperada para a forma monomérica, indicando que a estrutura oligomérica da enzima é desfeita por fervura e, parte dela por influência do SDS. Os resultados obtidos nesse experimento determinam a presença de anticorpos específicos para a rLAPTc no soro dos camundongos imunizados (Figura 20). Esses resultados são iguais aos obtidos com anti-LAPTc.

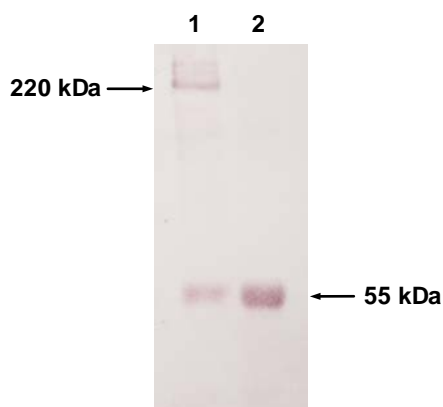


Figura 20. Imunogenicidade da rLAPTc em camundongos. Extratos totais, não-fervido (1) e fervido (2), de bactérias induzidas foram separados por SDS-PAGE 8% e transferidos para membrana de nitrocelulose como descrito em materiais e métodos.

Imunocitocalização da LAPTc

Para determinar a localização intracelular da LAPTc no *Trypanosoma cruzi*, o soro específico contra a proteína nativa foi utilizado em ensaios de imunofluorescência indireta sobre todas as formas do parasito. O soro pré-imune foi utilizado no controle do experimento. A figura mostrou marcação específica do soro anti-LAPTc em todas as formas do parasito. Nos epimastigotas, a LAPTc está localizada em vesículas espalhadas no citossol dos parasitos, especialmente em sua região posterior (Figura 21B). Já nas formas tripomastigotas, a enzima está localizada em vesículas maiores, indicando uma possível marcação em estruturas vesiculares (Figura 21C). Em amastigotas, a LAPTc também aparece espalhada por todo o citoplasma (Figura 21A). Resultados iguais foram obtidos com anticorpos anti-rLAPTc (dados não mostrados).

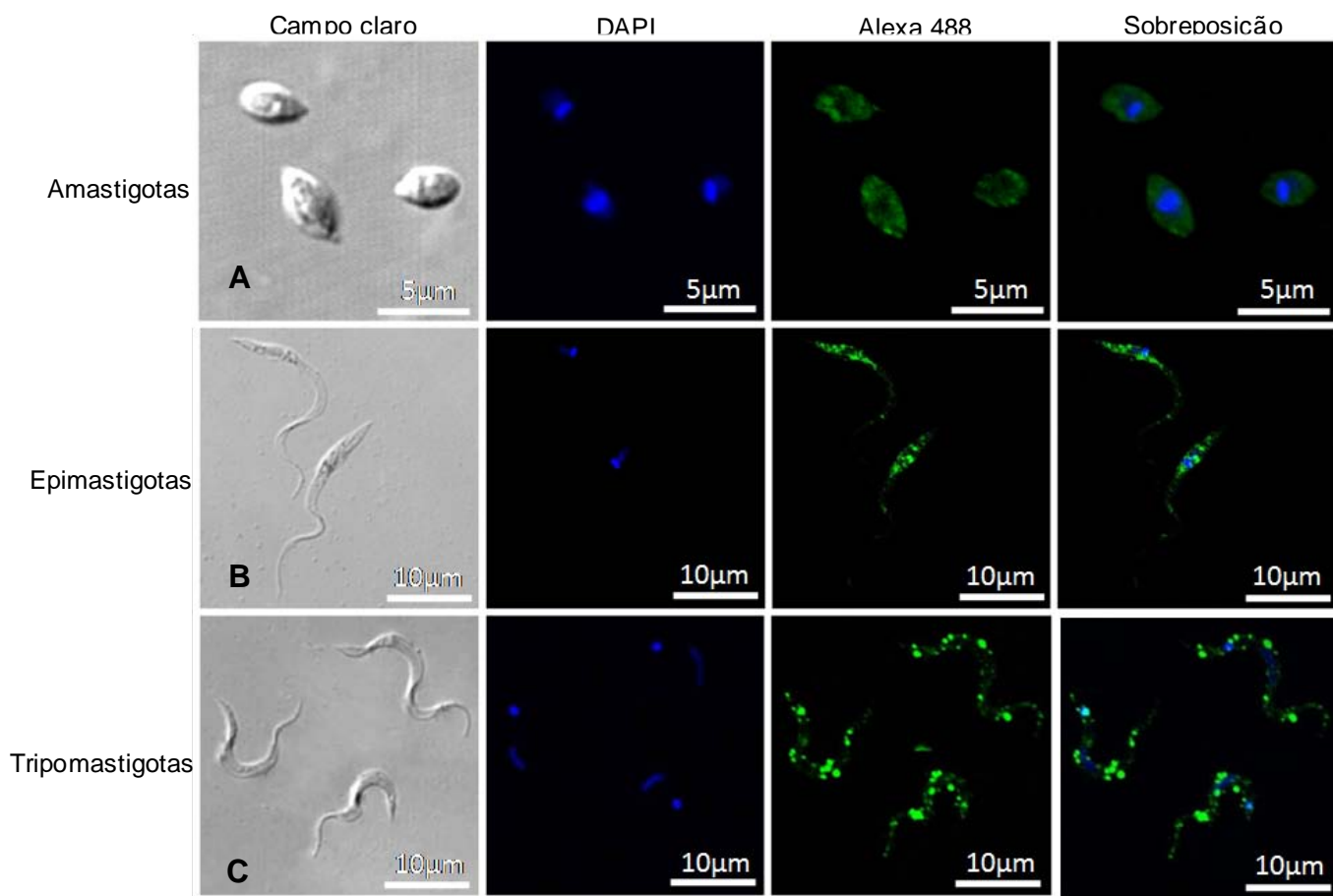


Figura 21. Imunocitocalização de LAPTc em *T. cruzi*. Análise de imunofluorescência foi realizado em formas amastigotas (A), epimastigotas (B) e tripomastigotas (C) usando soro anti-LAPTc e revelado com conjugado contendo Alexa 488 (verde). O DNA dos parasitos foi corado com DAPI (azul).

Manuscrito

The major leucyl aminopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (LAPTc) assembles into a homohexamer and belongs to the M17 family of metallopeptidases

Gloria Cadavid-Restrepo^{a,b1}, Thiago S. Gastardelo^{a1}, Eric Faudry^{c,d,e}, Hugo de Almeida^a, Izabela M. D. Bastos^f, Raquel S. Negreiros^a, Meire M. Lima^a, Teresa C. Assumpção^{a,g}, Keyla C. Almeida^a, Michel Ragno^{c,d,e}, Christine Ebel^{e,h,i}, Bergmann M. Ribeiro^a, Carlos R. Felix^a, and Jaime M. Santana^{a2}

From the ^aDepartment of Cell Biology, The University of Brasília, Brasília 70910-900, Brazil, the ^bUniversidad Nacional de Colombia Calle 59A No 63-20, Núcleo El Volador Medellín, Colombia, the ^cCEA, RTSV, F-38054 Grenoble, France, the ^dCNRS, UMR 5092, F-38054 Grenoble, France, the ^eUniversité Joseph Fourier, F-38000, Grenoble, France, the ^fFaculty of Ceilândia, The University of Brasília, Brasília 70910-900, Brazil, the ^gLaboratory of Malaria and Vector Research, National Institutes of Health, Rockville, MD 20852, USA, the ^hCEA, IBS, F-38027 Grenoble, France, and the ⁱCNRS, UMR 5075, F-38027 Grenoble, France.

¹Both authors contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed: The University of Brasília – UnB, Department of Cell Biology, Host-Pathogen Interface Laboratory, 70910-900, Brasília, DF, Brazil. Tel : 55 61 31073055; Fax: 55 61 31072904; E-mail: jsantana@unb.br

Pathogens depend on peptidase activities to accomplish many physiological processes, as well as to interact with their hosts, highlighting parasitic peptidases as virulence factors and, thus, potential drug targets. In this study, a major leucyl aminopeptidolytic activity was identified in the kinetoplastid *Trypanosoma cruzi*, the aetiological agent of Chagas disease. It was isolated from epimastigote forms of the parasite by a two-step chromatographic procedure and associated with a single 330-kDa homohexameric protein as determined by sedimentation velocity and light scattering experiments. Interchain disulfide bonds do not take part in the oligomeric assembly of the active peptidase. Peptide mass fingerprinting revealed the molecular identity of the enzyme as the predicted *T. cruzi* aminopeptidase EAN97960. Molecular and enzymatic analysis indicated that this leucyl aminopeptidase of *T. cruzi* (LAPTc) belongs to the peptidase family M17 or leucyl aminopeptidase family. LAPTc has a strong dependence on neutral pH, is mesophilic and retains its oligomeric form up to 80 °C. Conversely, its recombinant form, like other LAPs, is thermophilic and requires alkaline pH. The activity of this metalloaminopeptidase is inhibited by bestatin and metal chelants such as 1,10-

phenanthroline, is restored by Zn^{2+} , and potentiated by Mn^{2+} or Ca^{2+} . The enzyme is expressed by all *T. cruzi* forms and localizes within vesicles in the cytoplasm of the parasite. Since biosynthetic pathways for essential amino acids, including leucine, are lacking in *T. cruzi*, LAPTc could have a function in nutritional supply. Furthermore, the peptidase activity could also play a role in peptide and protein processing.

INTRODUCTION

The kinetoplastid protozoan *Trypanosoma cruzi* is the aetiological agent of Chagas disease, a debilitating chronic infection that is highly prevalent in Latin America and a worldwide concern because of human migration. Its complex life cycle includes four main distinctive developmental stages. In the insect vector, blood trypomastigotes transform into dividing epimastigotes that, after growth, undergo differentiation into the infective metacyclic trypomastigotes. In the cytoplasm of mammalian cells, metacyclic trypomastigotes transform into amastigotes that multiply and differentiate into trypomastigotes, which can reach the blood stream upon host cell disruption (1). There is no vaccine to prevent Chagas disease and the drugs currently employed to treat it are toxic and unable to avoid progression to its chronic phase, causing thousands of deaths every year. Such context requires molecular and functional characterization of *T. cruzi* targets against which new specific drugs could be developed aiming at the chemotherapy of Chagas disease (2, 3).

Peptidase activities are implicated in many aspects of the physiology of organisms, as well as in pathogen-host cell interface and pathogenesis, and thus considered good drug targets (4, 5). *T. cruzi* growth, differentiation, dissemination through host tissues and infection of mammalian cells are highly dependent on proteolytic activities. The genome of *T. cruzi* contains many genes homologous to those encoding for proteases considered virulence factors in other pathogens. However, only a few of these enzymes have been functionally characterized up to now. Among them, the cathepsin L known as cruzipain is associated with both *T. cruzi* development and infection (6, 7). Oligopeptidase B and POP Tc80, which are members of the prolyl oligopeptidase family of serine proteases, play important roles during parasite entry into mammalian cells (8-10). *T. cruzi* differentiation depends on proteasome activity, while antibodies against surface metalloproteases partially block infection by trypomastigotes (11, 12). Additionally, the cysteine protease cathepsin B, a serine carboxipeptidase and, more recently, two cytosolic metalloproteases, a serine oligopeptidase and two aspartyl proteases have been biochemically characterized (13-17). In contrast, the study of aminopeptidases has been limited to the detection of such activity in cell extracts of *T. cruzi* epimastigotes (18).

Leucyl aminopeptidases (EC 3.4.11.1; LAPs) are metalloaminopeptidases that catalyse the removal of N-terminal amino acid residues, preferentially leucine, from proteins and peptides. LAPs comprise a diverse set of enzymes with different biochemical and biophysical properties, are found in animals, plants and microorganisms, and play important roles in physiological processes, such as the catabolism of endogenous and exogenous proteins, peptide and protein turnover and processing, modulation of gene expression, antigen processing and defense (19). LAPs in the peptidase family M17 show two unrelated domains, with the active site in the C-terminal domain. Their activities require two metal ions, are found to be maximal at neutral/basic pH, and are sensitive to bestatin and amastatin (20). Because of their essential functions in the life cycle of microorganisms such as *Plasmodium*, *Fusobacterium nucleatum*, and the African trypanosome, LAPs are emerging as novel and promising pathogen targets for drugs (21-23). Furthermore, LAPs are considered potential vaccine candidates, as evidenced by specific immunoprotection of sheep and cattle against fascioliasis (24).

The aim of this study was to examine leucyl aminopeptidase activity present in the developmental forms of *T. cruzi*. We report the identification, purification and characterization of the major leucyl aminopeptidolytic activity mediated by a hexameric 330-kDa leucyl aminopeptidase of *T. cruzi* (LAPTc), whose assemblage does not depend on interchain disulfide bonds. Its molecular and enzymatic properties lead us to classify LAPTc as an archetypal member of the peptidase family M17. Different from its recombinant form that is alkaline and thermophilic, LAPTc purified from epimastigotes is neutral, mesophilic, and retains its oligomeric structure after losing activity at 80 °C. The enzyme localizes within vesicles in the cytoplasm of epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes of *T. cruzi*. We postulate that the LAPTc might be a potential target for the development of new drugs to treat *T. cruzi* infection.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Parasites and preparation of enzyme extract

T. cruzi epimastigote, amastigote and trypomastigote forms from Berenice stock were cultured and purified as described previously (10). Cell-free extracts were prepared from 100 ml of epimastigote culture (5×10^7 cells/ml) in the log phase. The parasites were harvested by centrifugation ($5,000 \times g$ for 20 min at 4 °C) and washed four times in PBS. The cells were resuspended in 1.0 ml of Milli-Q water in the presence of 10 μ M of the protease inhibitors *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane (E-64; Sigma-Aldrich) and tosyl-lysylchloromethane (TLCK; Sigma-Aldrich) and disrupted by three cycles of freezing at -20 °C and thawing. The insoluble material was removed by centrifugation ($20,000 \times g$ for 20 min at 4

°C) and the supernatant, referred to hereafter as enzyme extract, was immediately used for the assays or stored at -80 °C. Protein content was determined by the Bradford method.

Assay of peptidase activity

T. cruzi aminopeptidase activity was assayed on the fluorogenic substrates *L*-Leu-7-amido-4-methylcoumarin (Leu-AMC), *N*-carbobenzoxy-Leu-AMC (N-Cbz-Leu-AMC), *L*-Pro-AMC (Pro-AMC) and Asp-AMC, which were purchased from Sigma-Aldrich. Enzyme activity was determined by measuring the fluorescence of AMC released by hydrolysis of the substrates as described previously (25). Assays were performed by incubating 1.0 µl of enzyme extract (2.5 µg of protein) or 30 ng of purified LAPTc, as specified, for 15 min at the desired temperature in 100 µl final volume of reaction buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5) in the presence of 20 µM fluorogenic substrate. Enzymatic activity is expressed in mU/mg, where 1 U represents 1 mmol of released AMC/min. In-gel leucyl aminopeptidase activity of either enzyme extract (5 µg) or purified LAPTc (0.1 µg) was performed on 8% SDS-PAGE essentially as described previously (26). The samples were solubilized in Laemmli buffer containing 0.1 or 0.01% SDS and subjected to electrophoresis at 4 °C under non-reducing conditions without prior heating to 100 °C. Next, the gel was washed 4 times in reaction buffer, 20 min each time, and incubated at 37 °C for up to 30 min in the presence of 50 µM Leu-AMC. To determine kinetic parameters, the purified LAPTc was incubated in reaction buffer with variable Leu-AMC concentrations (1 to 100 µM) and the enzyme reaction was carried out as described above. Kinetic parameters were determined by fitting the rate data to the Michaelis-Menten equation. k_{cat} was calculated by the equation $k_{cat} = V_{max}/[E]_0$, where $[E]_0$ represents the active enzyme concentration.

LAPTc purification and electrophoretic analysis

T. cruzi peptidase with specificity for Leu-AMC was purified from freshly prepared enzyme extract by fast liquid chromatography. The enzyme extract (1 ml; 5.6 mg of protein) was buffered with 25 mM Tris-HCl pH 7.5, filtered through a 0.22 µm membrane and applied to a DEAE-Sepharose CL-6B (Sigma-Aldrich) column (5 cm × 1 cm), previously equilibrated with 25 mM Tris-HCl, pH 7.5. After washing the column, bound proteins were eluted with a linear gradient performed in the same buffer from 0.3 to 0.65 M NaCl for 30 min, and then from 0.66 to 1.0 M NaCl for 10 min at a 0.5 ml/min flow rate. Fractions of volume 0.25 ml were collected on ice, and an aliquot of each fraction was assayed with Leu-AMC. The enzymatically active fractions were pooled and concentrated to 250 µl with a Centricon 100 (Amicon) at 4 °C. The solution was then submitted to size exclusion chromatography on a Superose 6 HR 10/30

column (GE Healthcare) isocratically perfused with 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, at a 0.3 ml/min flow rate for 80 min, and calibrated with bovine serum albumin (67 kDa), aldolase (158 kDa), catalase (232 kDa), ferritin (440 kDa), and thyroglobulin (669 kDa). Each 250- μ l fraction was instantly stored on ice until enzyme activity assay, and the active ones were pooled and concentrated to 100 μ l as above. Then, 30 ng of the purified protein was subjected to 8% SDS/PAGE under non-reducing conditions without previous boiling, and the gel was silver-stained. The presence of interchain disulfide bonds, the molecular mass and the oligomeric structure of the enzyme were evaluated by electrophoresis as described previously (27).

Identification of *T. cruzi* aminopeptidase by peptide mass fingerprinting

The purified native protein (2 μ g) was digested with trypsin (Promega, Madison, Wis) at 37 °C for 12 h for peptide mass fingerprinting as described (28). The digested sample was applied to a MALDI-TOF Reflex mass spectrometer (Bruker Daltonics). Experimentally measured peptide molecular masses were subjected to a protein identity search against the nonredundant database of the National Center for Biological Information (NCBI) via BioTool 2.0 (Bruker Daltonics) and the Mascot program (www.matrixscience.com). The protein was identified as a leucyl aminopeptidase (LAP; accession number EAN97960).

Phylogenetic relationship of LAP^{Tc} with other LAPs

Twenty nine sequences were selected from the nonredundant (NR) protein database of the NCBI after a search for M17 family members from different organisms under the following accession numbers: EAN97960.1, EAN99056.1 and EAN87580.1 (*T. cruzi*), EAN79621.1 and AAX70152.1 (*Trypanosoma brucei*), CAJ02694.1, CAJ06706.1 and AAL16097.1 (*Leishmania major*), CAM36610.1 (*Leishmania braziliensis*), AAL16095.1 (*Leishmania amazonensis*), AAL16096.1 (*Leishmania donovani*), AAD17527.1 (*Homo sapiens*), XP_001162589.1 (*Pan troglodytes*), NP_077754.2 (*Mus musculus*), NP_001011910.1 (*Rattus norvegicus*), NP_252520.1 (*Pseudomonas aeruginosa*), ZP_01789367.1 (*Haemophilus influenzae*), YP_672349.1 (*Escherichia coli*), YP_001217999.1 (*Vibrio cholerae*), CAC31245.1 (*Mycobacterium leprae*), NP_216729.1 (*Mycobacterium tuberculosis*), NP_194821.1 (*Arabidopsis thaliana*), CAN66364.1 (*Vitis vinifera*), NP_001066684.1 (*Oryza sativa*), CAA69614.1 (*Solanum lycopersicum*), XP_744254.1 (*Plasmodium chabaudi*), EAA21300.1 (*Plasmodium yoelii*), XP_001348613.1 (*Plasmodium falciparum*) and XP_001615930.1 (*Plasmodium vivax*). Sequence alignments were done with the ClustaIX software package (29).

Phylogenetic analysis and statistical neighbor-joining bootstrap tests of the phylogenies were done with the Mega package (30).

Cloning and expression of the recombinant enzyme (rLAPTc)

According to the sequence of the gene encoding LAPTc (gene ID Tc00.1047053508799.240; www.tcruidb.org/tcruidb/home-ori.jsp), specific primers (forward primer 5' -CTAGTGACATATGAACAGACCTCCTGCTACA – 3', *NdeI* site in bold, and reverse primer 5' – TAGTGA**CTCGAG**TTATCGTAAATTACGAAGATATTCC – 3', *XhoI* in bold, were designed and used to amplify the *laptc* open reading frame from *T. cruzi* genomic DNA. The PCR product was cloned into the pCR2.1-TOPO vector. The clone was digested with *NdeI* and *XhoI* and the 1563 bp full-length fragment was cloned into the pET-19b expression vector (Novagen). Gene cloning was confirmed by sequencing. The N-terminal His-tagged rLAPTc was produced in *E. coli* BL21(DE3) through 1.0 mM IPTG induction at 20 °C over 5 h. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM imidazole, 0.2% lysozyme, pH 7.9), submitted to sonication on ice and centrifuged at 15,000 × *g* for 10 min at 4 °C. Then, the supernatant was submitted to affinity chromatography on a nickel column and rLAPTc was eluted with 400 mM imidazole and further purified by size exclusion chromatography on a Superose 6 HR 10/30 column as described above. rLAPTc, the main peak of activity obtained after the last purification step, was used for enzymatic assays and analyzed by 8% PAGE in the presence of 0.1 or 0.01% SDS, followed by Coomassie staining of the gel.

Molecular organization assay - analytical ultracentrifugation and light scattering

Sedimentation velocity experiments were performed using a Beckman XL-I analytical ultracentrifuge and an AN-60 TI rotor (Beckman Coulter). The experiments were carried out at 10 °C for rLAPTc, obtained after affinity chromatography, at 170, 56 and 10 μM in 25 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, corresponding to absorbancies at 280 nm of 3.5, 1.2 and 0.2, respectively. A volume of 110 μl for the most concentrated sample or 420 μl was loaded into 0.3 or 1.2 cm path cells and centrifuged at 42,000 rpm. Scans were recorded every 6 min, overnight, at 295 and 285 nm and by interference. We used the Sednterp software (free available at <http://www.jphilo.mailway.com/>) to estimate the partial specific volume of the polypeptide chain, $\bar{v}=0.728$ ml/g, the solvent density, $\rho=1.00667$ g/ml, and the solvent viscosity, $\eta=1.335$ mPa.s, at 10 °C. The sedimentation profiles were analyzed by the size-distribution analysis of Sedfit (free available at www.analyticalultracentrifugation.com). In

Sedfit, finite element solutions of the Lamm equation for a large number of discrete, independent species, for which a relationship between mass, sedimentation and diffusion coefficients, s and D , is assumed, are combined with a maximum entropy regularization to represent a continuous size-distribution (31). We used typically 200 generated sets of data, calculated on a grid of 300 radial points and using fitted frictional ratio, for sedimentation coefficients comprised between 1 and 50 S. For the regularization procedure a confidence level of 0.68 was used.

The molecular mass of LAP_{Tc} in solution was also determined by size exclusion chromatography coupled to multiangle laser light scattering (SEC-MALLS) and refractometry (RI). The rLAP_{Tc}, purified by affinity chromatography as above, (20 μ l) at 170 μ M (10 mg/ml) in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, was injected in a KW 804 column preceded by a guard column (Shodex), equilibrated in the same solvent, at 20 °C with a flow rate of 0.5 ml/min. Protein concentration was measured on-line by refractive index (RI) measurements using an Optilab rEX (Wyatt Technology) and considering $\frac{dn}{dc} = 0.186$ ml/g. On-line MALLS detection was performed with a miniDAWN TREOS detector (Wyatt Technology) using laser emitting at 658 nm. Data were analyzed and weight-averaged molar masses were calculated using the ASTRA software (Wyatt Technology Corp.). The elution profiles (left ordinate axis) were monitored by RI. The molecular mass distribution (right ordinate axis) was determined from combined MALLS and RI data.

Assay of optimal pH and temperature for activity and thermostability of LAP_{Tc}

The optimal pH for activity of both endogenous and recombinant LAP_{Tc} was determined as described above in 50 mM acetic acid-50 mM MES-50 mM Tris-HCl buffer adjusted to the desired pH. To assay the optimal temperature for aminopeptidase activity, the reactions took place at 20, 25, 30, 37, 40, 50, 60, 70, 80 or 100 °C in reaction buffer. The enzyme thermostability was assayed by incubating the purified proteins at the same temperatures for either 15 or 240 min in reaction buffer before the aminopeptidase activity assay on Leu-AMC. An 8% SDS-PAGE analysis of the molecular organization of the native or recombinant LAP_{Tc} followed. PAGE was performed in the presence of 0.1 or 0.01% SDS without previous boiling of either protein.

Inhibition pattern and cation dependence of LAP_{Tc}

Different concentrations of tosyl-lysylchloromethane (TLCK), bestatin, EDTA, *L-trans*-epoxysuccinylleucylamido-(4-guanidino) butane (E-64), phenylmethylsulfonyl fluoride

(PMSF), 1,10-phenanthroline, leupeptin, or phosphoramidon were incubated with 50 ng of purified LAPTc in 100 μ l of reaction buffer for 20 min at room temperature before the substrate was added. The enzymatic reactions were monitored as described above. All inhibitors were from Sigma-Aldrich. To assess the effects of cations on the enzymatic activity, purified LAPTc was incubated in reaction buffer containing 10 mM EDTA or 250 μ M 1,10-phenanthroline for 30 min at room temperature. After extensive dialysis against reaction buffer at 4 °C, 20 μ M Leu-AMC (final concentration) and AlCl₃, CaCl₂, FeCl₂, CoCl₂, MgCl₂, MnCl₂, or ZnCl₂ (final concentration, 0.4 mM) were added to the reaction system, followed by a 15 min incubation at 37 °C. Hydrolysis of the substrate was measured as described above. Controls consisted of enzymatic reactions carried out either without EDTA or 1,10-phenanthroline treatments or in the absence of cations.

Analysis of expression and immunocytolocalization of LAPTc

One 4-month-old female rabbit was immunized with 13 μ g of the purified LAPTc emulsified in complete Freund's adjuvant followed by two biweekly boosters with the enzyme in incomplete Freund's adjuvant. Four days after the last booster, serum was collected and Western blotting monitored the presence of anti-LAPTc specific antibodies. To assay the expression of LAPTc by *T. cruzi* epimastigotes, total parasite proteins were subjected to 8% SDS-PAGE with or without previous heating to 100 °C and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked by incubation in 5% (w/v) non-fat milk/PBS for 3 h at room temperature. Blots were incubated in 1% non-fat milk/PBS for 2 h in the presence of either pre-immune or immune serum diluted to 1:400, followed by extensive washing in PBS. Then, the membranes were incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG diluted to 1:2000, washed in PBS and the immunocomplexes revealed with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate/Nitro Blue Tetrazolium (Promega). For immunofluorescence, epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi* were fixed overnight at 4 °C with 3.7% formaldehyde, air-dried on poly-L-lysine-coated glass slides, permeabilized with 0.2% (v/v) Triton X-100 and incubated with pre-immune or anti-LAPTc serum (1:50 in 1% non-fat milk/PBS) for 2 h at room temperature. After extensive washing in 1% non-fat milk/PBS, cells were incubated with Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG for 1 h. This was followed by washing and staining parasite DNAs with 5 μ g/ml 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) for 5 min. Glass slides were washed, mounted and observed with a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

RESULTS

***T. cruzi* enzyme extract mediates hydrolysis of the aminopeptidase substrate Leu-AMC**

The sequencing of *T. cruzi* genome revealed genes encoding for putative peptidases that mediate aminopeptidolytic activities (www.tcruidb.org/tcruidb/home-ori.jsp). To identify aminopeptidolytic activities in *T. cruzi*, we prepared enzyme extract from epimastigote forms of the parasite and incubated it with Leu-AMC, *N*-CBZ-Leu-AMC, Pro-AMC or Asp-AMC. Under the conditions of these experiments, only Leu-AMC was hydrolyzed by the enzyme extract from epimastigotes with a calculated specific enzymatic activity of 45.86 ± 3.75 mU/mg of protein. The values of specific enzymatic activity obtained with enzyme extracts prepared from trypomastigotes and amastigotes were 30.56 ± 3.00 and 56.46 ± 4.62 mU/mg of protein, respectively. These results suggest that this enzymatic activity is differentially regulated in the parasitic forms. Since the enzyme extract failed to hydrolyze *N*-CBZ-Leu-AMC (the blocked version of Leu-AMC), the hydrolysis of Leu-AMC may be mediated by a leucyl aminopeptidase. The molecular mass of the enzyme displaying such activity was estimated by gel enzymography. For this assay, the proteins present in the enzyme extract were separated by SDS-PAGE, followed by washing the gel for enzymatic activity recovery and incubation in reaction buffer containing Leu-AMC. A single fluorescent band just above 200 kDa molecular mass was revealed corresponding to free AMC released upon hydrolysis of the substrate (Fig. 1A, lane 1). The enzymatic activity on Leu-AMC was observed to co-localize with a protein band upon staining of the same gel (Fig. 1A, lane 2).

Leucyl aminopeptidase is assembled into a homo-oligomer

The enzyme mediating hydrolysis of Leu-AMC was purified to homogeneity from freshly prepared enzyme extract by a combination of ion exchange and size exclusion chromatography with final yield and purification factor of 65% and 42, respectively. The leucyl aminopeptidase activity was eluted from a DEAE-Sepharose column from 0.54 to 0.63 M NaCl as a single peak of activity. The active fractions were further purified on a Superose-6 HR column; again a single 300-kDa peak of enzymatic activity was observed (results not shown), which indicates that, under the conditions of this experiment, only one peptidase in the enzyme extract prepared from *T. cruzi* epimastigotes displays hydrolysis of Leu-AMC. The lack of hydrolysis of fluorogenic protease substrates such as Pro-AMC, Asp-AMC, *N*-CBZ-Leu-AMC, Gly-Phe-AMC, Gly-Arg-AMC, and Gly-Pro-AMC, as well as the protein substrates bovine

serum albumin and gelatin (not shown) suggests that the purified aminopeptidase displays narrow-spectrum activity.

The electrophoretic profiles of enzymatic active fractions on Leu-AMC obtained at each purification step are shown in Fig. 1A (*lanes 3 and 4*). A single Coomassie-stained band of approximately 200 kDa is seen after 8% SDS-PAGE under reducing conditions without previous boiling of the sample, which indicates that the aminopeptidase was obtained with high purity. However, when the purified enzyme was heated to 100 °C for 5 min prior to electrophoretic analysis under reducing conditions, only a single 55-kDa protein band was revealed upon staining of the gel (*lane 5*). These data indicate that this active leucyl aminopeptidase is assembled into a homo-oligomer formed by monomers of about 55 kDa. We could not assess whether the monomer mediates enzymatic activity because it was only obtained upon boiling the oligomeric aminopeptidase.

To investigate the involvement of inter-monomer disulfide bonds in the stabilization of the aminopeptidase's oligomeric state, purified protein, previously boiled or not, was subjected to SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions (Fig. 1A, *lanes 4 and 5 versus lanes 6 and 7*, respectively). The presence of a reducing agent did not change the electrophoretic migration pattern of the purified aminopeptidase (*lanes 1-5*). In contrast, high temperature induced monomerization of the protein oligomeric form; the active oligomer was only seen in the gels where the samples had not been previously heated to 100 °C (*lanes 1-4 and 6*), while its 55-kDa monomer was revealed upon sample boiling (*lanes 5 and 7*). Since monomerization of the endogenous aminopeptidase occurs regardless of the presence of reducing conditions, we conclude that inter-monomer disulfide bonds do not take part in the assembly of the active oligomer.

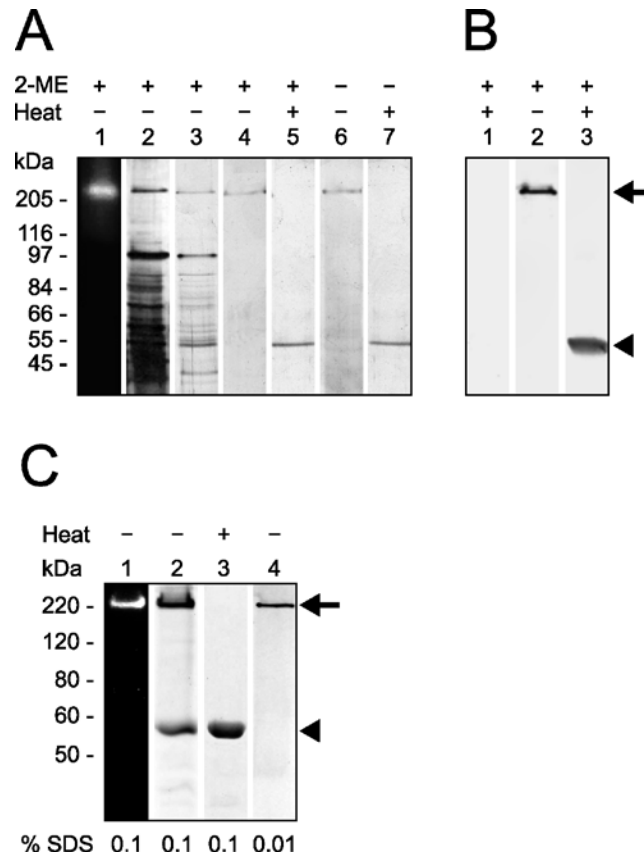


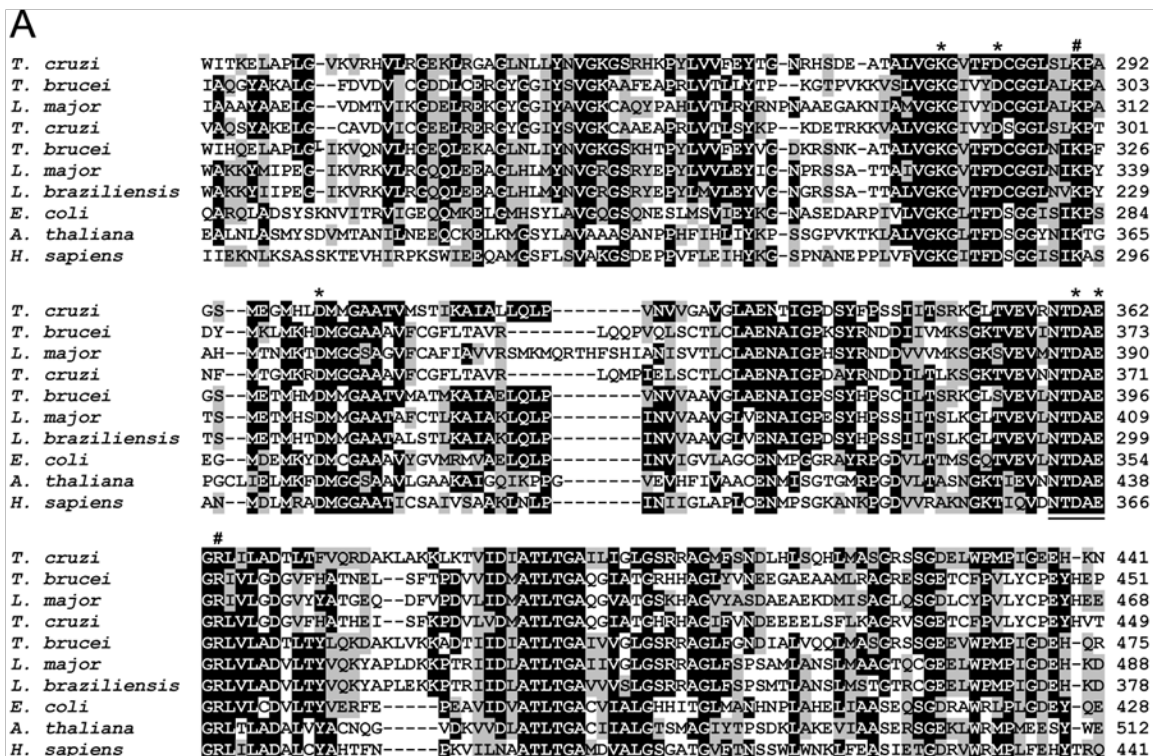
Fig. 1. Leucyl aminopeptidase behaves as an approximately 200-kDa homo-oligomer under electrophoresis and lacks interchain disulfide bonds. *A*, gel zymographic experiments of total proteins of *T. cruzi* show a leucyl aminopeptidolytic activity upon Leu-AMC under UV light (*lane 1*). The same gel was Coomassie-stained (*lane 2*). Two purification steps of native LAPTc: DEAE-Sephacel column fraction (*lane 3*), Superose-6 column fraction without (*lane 4*) or with (*lane 5*) previous boiling, and under reducing (*lanes 4* and *5*) or nonreducing (*lanes 6* and *7*) conditions. *B*, western blot analysis of LAPTc after 8% SDS-PAGE of epimastigote total proteins with (*lanes 1* and *3*) or without (*lane 2*) previous boiling, showing both oligomeric (arrow) and monomeric (arrowhead) forms of the enzyme. *C*, purified rLAPTc was subjected to 8% SDS-PAGE zymography without previous boiling of the sample (*lane 1*). The same gel was subsequently stained with Coomassie Blue (*lane 2*). The recombinant enzyme was also subjected to PAGE in the presence of 0.1 (*lane 3*) or 0.01% SDS (*lane 4*). Arrow and arrowhead indicate oligomeric and monomeric forms of the enzyme, respectively.

Mass spectrometry identification of the purified aminopeptidase

The molecular identity of the aminopeptidase with specificity for Leu-AMC was accessed by peptide mass fingerprinting. For this experiment, the purified native enzyme was digested with trypsin and the resulting peptides were subjected to MALDI-TOF analysis. Values of masses for the detected peptides were compared to those theoretically deduced from sequences deposited in the database. Ten peptides showed mass matches to peptides obtained from theoretical digestion of the predicted leucyl aminopeptidase of *T. cruzi* EAN97960 (Table 1), which is encoded by gene ID Tc00.1047053508799.240 (www.tcruidb.org/tcruidb/home-

ori.jsp). This leucyl aminopeptidase gene (*laptc*) encodes for a 520-amino acid protein with a calculated molecular mass of 55,891 Da, and whose sequence does not comprise a predicted peptide signal. These observations correlate well with our experimental data showing that the purified enzyme displays leucyl aminopeptidase activity.

According to sequence homology, this leucyl aminopeptidase of *T. cruzi* (LAPTc) belongs to the metallopeptidase M17 family, also known as leucyl aminopeptidase family (32). It shares 34 to 66% identity to other members of the M17 family, including assigned and unassigned leucyl aminopeptidases of kinetoplastidae parasites. Multiple amino acid sequence alignments (Fig. 2A) also revealed that the C-terminal portion is the most conserved region in this family, reaching 72% identity and 83% similarity between *T. cruzi* and *T. brucei*. The sequence of LAPTc comprises the highly conserved active site (Lys²⁹⁹ and Arg³⁷³), metal binding residues (Lys²⁸⁷, Asp²⁹², Asp³¹⁰, Asp³⁶⁹ and Glu³⁷¹) and the signature NTDAEGRL sequence of the M17 family (33). The phylogenetic tree shows divergent groups of proteins that cluster by phylum or class (Fig. 2B). It is interesting to note that the bacteria, mammalia, viridiplantae and apicomplexa groups have an indication of a common ancestor with a strong bootstrap support. The kinetoplastid sequences are divided in two defined clades also with very strong bootstrap support. One group of kinetoplastids comprises sequences annotated as aminopeptidases and the other group has sequences assigned as leucyl aminopeptidases. Although these two clades are members of the M17 family, they show sequence divergence indicating that the ancestral trypanosomatid giving origin to both *Leishmania* and *Trypanosoma* already contained these two enzymes.



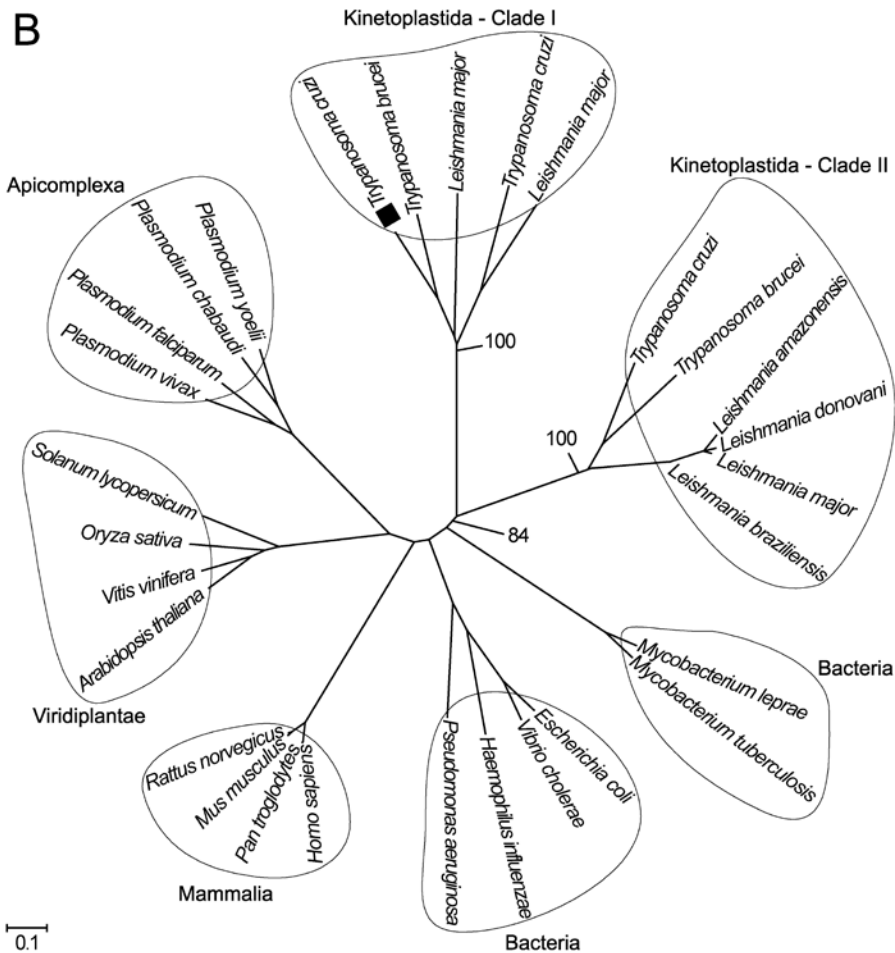


Fig. 2. Sequence comparison and phylogenetic relationship of LAPTc to other members of the M17 family of metallopeptidases. A, Multiple of C-portion amino acid sequences alignment of different LAPs. The amino acid sequences from the conserved C-terminal region of LAPs were aligned by the ClustalX program. The amino acids marked in black show 50% identity and those in gray show 50% similarity. The putative metal binding sites (*), catalytic site (#), and M17 signature (underlined) are indicated. Sequences were obtained from the protein database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under the following accession numbers: EAN87580.1 and EAN97960.1 (*T. cruzi*), EAN79621.1 and AAX70152.1 (*T. brucei*), CAJ02694.1 and AAL16097.1 (*L. major*), CAM36610.1 (*L. braziliensis*), YP_672349.1 (*E. coli*), NP_194821.1 (*A. thaliana*), AAD17527.1 (*H. sapiens*). B, Phylogenetic relationship of LAPTc to other LAPs of different organisms. The 29 full-length sequences, derived from the nonredundant (NR) protein database of the NCBI (listed in Experimental Procedures), were aligned by the ClustalX program, and the phylogram was generated with the Mega package after 10,000 bootstraps with the neighbor joining (NJ) algorithm. The bar scale at the bottom represents 10% amino acid substitution per site. LAPTc is indicated by a closed square.

Table 1. Identification of *T. cruzi* protease by peptide mass fingerprinting

Tryptic peptide mass (Da)		Identified amino acid sequence
Experimental data ^a (in-gel digestion)	<i>T. cruzi</i> aminopeptidase (<i>in silico</i> digestion)	
2,193.39	2,192.38	³⁶ KTHTA GLASTFV VILGTHAQLRE ⁵⁶
2,749.63	2,748.62	³⁶ KTHTA GLASTFV VILGTHAQLREDALKE ⁶¹
1,764.03	1,763.02	⁶² KELPFYCPA VAEAIQRV ⁷⁶
3,011.58	3,010.57	¹⁸² RLTVVFTPA PNPSPSELVVVATSTQLCQRL ²⁰⁹
2,437.36	2,436.35	²¹⁰ RLVDAPTLLNTATFA EVA QSYAKE ²³²
1,742.99	1,741.98	³¹⁰ RDMGGAAA VFCGFLTA VRL ³²⁶
1,977.11	1,976.10	⁴¹² RHAGFVNDEEEELSFLKA ⁴²⁸
2,590.34	2,589.34	⁴³² RVSGETCFPVLYCPEYHVTEFRS ⁴⁵²
1,538.92	1,537.92	⁵⁰⁴ KATGFGPALLMEYLRN ⁵¹⁷
1,554.90	1,553.89	⁵⁰⁴ KATGFGPALLMEYLRN ⁵¹⁷

^aMasses are MH⁺ monoisotopic, with accuracy of 0.1 to 0.2 Da. The enzyme was digested with trypsin, and masses of resulting peptides were determined by MALDI-TOF mass spectrometry and compared to theoretical ones produced by *in silico* digestion of proteins found in the database (NCBIInr).

LAPTc assembles into a hexamer

The recombinant active and soluble form of LAPTc was produced in *E. coli* containing a His-tag at its N-terminus. It was purified by affinity chromatography on a nickel column upon elution with 200 mM imidazol and then submitted to size exclusion chromatography. The activity co-migrates with the main protein peak of 320 kDa (not shown) that was submitted to SDS-PAGE analysis. In-gel enzymography of the gel showed that only a 220-kDa protein band mediates enzymatic activity on Leu-AMC when PAGE was carried out without previous heating of the sample and in the presence of 0.1% SDS (Fig. 1C, lane 1). Protein bands of about 220 and 55 kDa were revealed upon staining of the same gel (Fig. 1C, lane 2). Under the same experimental conditions, boiling of the sample resulted in complete monomerization of rLAPTc (Fig. 1C, lane 3). Unlike its endogenous form that conserves an oligomeric structure in the presence of 0.1% SDS (Fig. 1A), rLAPTc is very sensitive to this detergent and is only entirely seen as an oligomer in the presence of amounts of SDS as low as 0.01% (Fig. 1C, lane 4). These data show that, regardless of their sensitivity to SDS, both endogenous and recombinant forms of LAPTc behave the same when submitted to PAGE and size exclusion chromatography.

SDS-PAGE migration and size exclusion chromatography elution patterns might suggest that native and recombinant LAPTc assemble into tetrameric and hexameric structures, respectively. To solve the divergence in its molecular mass determination, we further submitted affinity chromatography purified rLAPTc to SEC-MALLS and to analytical ultracentrifugation analysis. MALLS measurements allow the molecular mass of macromolecules in solution to be calculated, taking into account the absolute concentrations obtained with a differential refraction

index detector. The elution profile showed the presence of five resolved peaks corresponding to different oligomeric species eluting at 6.5, 8.5, 9, 10 and 11.2 ml (Fig. 3A, *continuous line*). The main protein peak was eluted at 10 ml and represents 67% of the mass recovery. As expected, light scattering measurements (Fig. 3A, *dotted line*) exhibited higher signal for the larger species eluting first, because light scattering is directly related to the concentration and molecular mass of the observed objects. Molecular mass calculation (Fig. 3A, *discontinuous line*) revealed that the first protein peak (6.5 ml) corresponds to highly aggregated species with molecular masses above 10,000 kDa. On the other hand, the peaks eluting at 8.5, 9, 10 and 11.2 ml correspond to oligomers of 1025, 625, 314 and 176 kDa, respectively. In conclusion, SEC-MALLS experiments showed that rLAPTc is predominantly assembled into a 314-kDa oligomer, but other minor species, which are not detectable during the purification procedure of the endogenous enzyme, also co-exist (Table 2).

The hexameric form of LAPTc was confirmed by analytical ultracentrifugation (AUC), a versatile and powerful tool for the identification of oligomeric states and the determination of molecular masses of proteins (34). Fig. 3B shows the experimental and fitted sedimentation velocity profiles obtained at 56 μM by monitoring the absorbance at 295 nm. These results are representative of the data obtained with other concentrations and by monitoring interference fringes. The derived sedimentation coefficient distribution (Fig. 3C) exhibits four main species sedimenting at 5.1, 10.2, 15.3 and 19.5 S ($s_{20,w} = 7.0, 13.9, 20.9$ and 26.6 S, respectively). The s -value depends on the molar mass, M , and Stokes radius, R_S , of the particle, according to the Svedberg equation: $s = M(1 - \rho \bar{v}) / (N_A 6\pi\eta R_S)$. To calculate the corresponding molecular masses, calibrated size exclusion chromatography was performed with the same samples, giving Stokes radii for the two main species eluting at 9 and 10 ml of 6.8 and 5.7 nm, respectively. The combination of the s -values of 15.3 and 10.2 S with $R_S = 6.8$ and 5.7 nm gives the estimates for the species of $M = 593$ and 330 kDa, respectively (Table 2), confirming the results obtained by SEC-MALLS. Considering the monomer molecular mass deduced from the sequence, 58.7 kDa, the calculated number of subunits present in the main species eluting at 10 ml is 5.6, suggesting a pentamer or, more likely, a hexamer. Taking into account 5 or 6 as the number of subunits, the inferred R_S values from the Svedberg equation are 5.1 and 6.1 nm, which correspond to frictional ratios of 1.16 and 1.31, respectively. These are within the values expected for globular proteins. However, the frictional ratio obtained for the pentamer hypothesis is somewhat low for a 330-kDa protein. Thus, these data indicate that the main rLAPTc species is a hexamer.

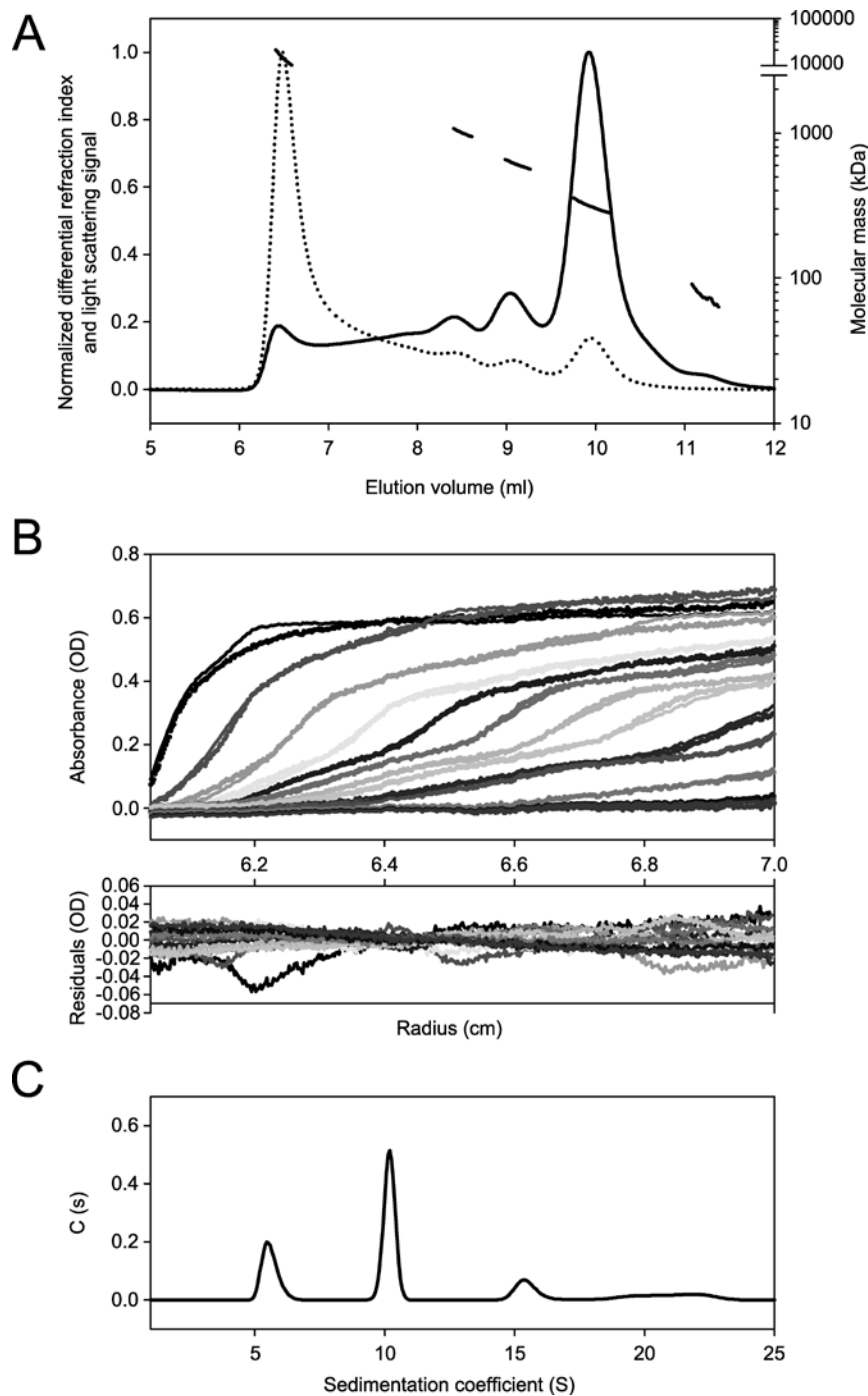


Fig. 3. **LAPTc assembles into a hexamer.** A, SEC-MALLS data obtained with 20 μ l of rLAPTc at 10 mg/ml (170 μ M). Superposition of concentration signal (differential refractive index, *continuous line*), light scattering signal (*dotted line*) and molecular mass calculation (*discontinuous line*). For clarity, the differential refractive index and light scattering signals are normalized. B, superposition of experimental (*dots*) and fitted (*continuous line*) AUC profiles corrected for all systematic noise for LAPTc at 56 μ M (*upper panel*). Superposition of the differences between the experimental and fitted curves (*lower panel*). The fit was obtained from the *c(s)* analysis of the program SEDFIT. C, corresponding *c(s)* distribution in the range 1-45 S.

Table 2. Summary of MALLS and AUC experiments.

SEC-MALLS			Calibrated SEC-AUC			N° of subunits
Elution volume (ml)	Recovery mass fraction (%)	Molecular mass (kDa)	Stoke radius (nm)	Sedimentation coefficient (S)	Molecular mass (kDa)	
8.5	8	1025	ND	19.5	ND	17.5 ^(a)
9	13	625	6.8	15.3	593	10.1 ^(b)
10	66	314	5.7	10.2	330	5.6 ^(b)
11.2	2	176	ND	5.1	ND	3 ^(a)

^(a): from sec-MALLS; ^(b): from SEC-AUC

Recombinant and native forms of LAPTc display distinct activity features

The influence of pH on the activity of purified LAPTc and rLAPTc was determined. Maximal specific activity for the native enzyme was measured at pH 7.0 (data not shown). At pHs 6.0 and 8.0 the recorded specific activities were 45% of that measured at pH 7.0, whereas at pHs 5.0 and 9.0 the enzyme showed to be inactive. Conversely, rLAPTc optimal pH is 8.0; at pH 7.5 and 9.0 the enzyme loses 60 and 75% of its activity recorded at pH 8.0, respectively. These data demonstrate that LAPTc has a strong dependence on neutral pH, whereas its recombinant form displays maximal activity at pH 8.0. The optimum temperature for LAPTc activity on Leu-AMC was shown to be 37 °C. Nevertheless, the enzyme retained 85% of its activity in a broad range of temperature (30-50 °C), suggesting stability and absence of regulation depending on the *T. cruzi* host (Fig. 4A). In contrast, rLAPTc exhibits a complete different profile of activity at different temperatures; specific activity measured at 37 °C corresponded to only 25% of the recorded maximal activity observed at 60 °C (Fig. 4A). These data indicate that the native enzyme is mesophilic, whereas its recombinant form produced in *E. coli* is thermophilic. To study the thermostability of LAPTc, hydrolysis of Leu-AMC by native and recombinant forms of the enzyme was assayed at 37 or 60 °C, respectively, after preincubation at different temperatures for either 15 or 240 min (Table 3). Under the conditions of this experiment, the enzymatic activity of LAPTc was not significantly modified after preincubation at 37 °C for 240 min. However, preincubation at higher temperatures resulted in significant loss of enzymatic activity. The rLAPTc showed to be more stable than its native form, which correlates well with its higher optimal temperature of activity.

The Michaelis-Menten constant (K_m) and maximal velocity (V_{max}) of LAPTc were determined according to the hyperbolic regression method. The endogenous enzyme has a K_m value of $12.0 \pm 0.8 \mu\text{M}$ Leu-AMC and its calculated catalytic constant (k_{cat}) and catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) are $12.47 \pm 1.2 \text{ S}^{-1}$ and $1.04 \pm 0.09 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$, respectively. K_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m

values for rLAPTc are $185.9 \pm 17.0 \mu\text{M}$, $34.84 \pm 2.9 \text{ S}^{-1}$ and $0.19 \pm 0.01 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$, in that order. These results show that native and recombinant LAPTc exhibit different kinetic parameters.

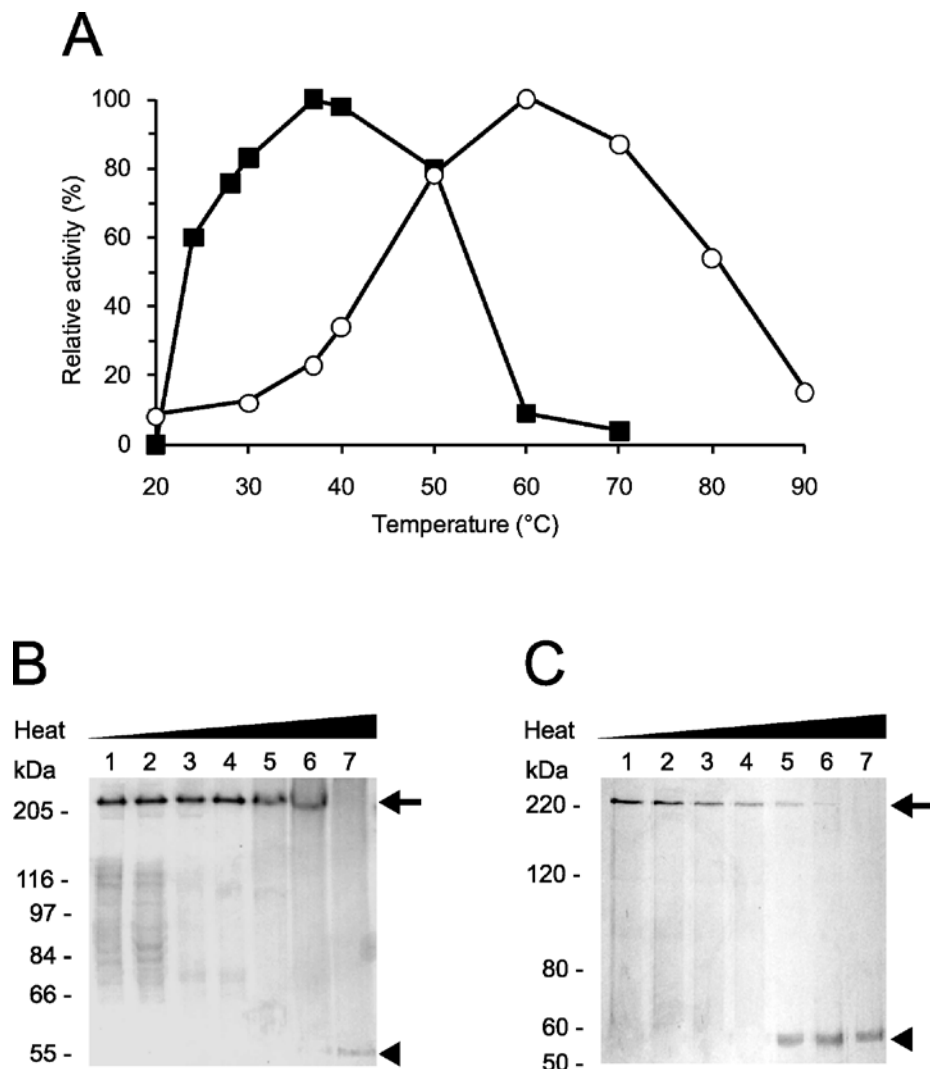


FIG. 4. Optimal temperature for activity versus electrophoretic migration pattern of LAPTc. A, both native (*solid squares*) and recombinant (*open circles*) purified enzymes were incubated with Leu-AMC in reaction buffer at different temperatures for 15 min and AMC released was measured as described in Experimental Procedures. Standard deviations were less than 10%. LAPTc (B) or rLAPTc (C) was incubated at 20 (*lanes 1*), 37 (*lanes 2*), 50 (*lanes 3*), 60 (*lanes 4*), 70 (*lanes 5*) 80 (*lanes 6*) or 100 °C (*lanes 7*) for 10 min in reaction buffer, followed by 8% SDS-PAGE analysis. Oligomeric (*arrow*) and monomeric (*arrowhead*) forms of the enzymes are indicated. The gels were Coomassie-stained.

Table 3. LAPTc and rLAPTc thermostability

Temperature of preincubation (°C)	Enzymatic activity (% of control) ^a			
	Preincubation for 15 min		Preincubation for 240 min	
	LAPTc	rLAPTc	LAPTc	rLAPTc
28	92	97	74	94
37	86	98	70	92
40	80	99	51	87
50	52	92	6	43
60	35	87	0	5
70	0	6	0	3
80	0	5	0	3

Purified LAPTc and rLAPTc were preincubated for 15 or 240 min at different temperatures, and then their activity on Leu-AMC were measured at 37 or 60 °C, respectively. ^aControl consisted of enzyme activity test without prior incubation. Standard deviation was less than 11%.

LAPTc retains its oligomeric structure after losing activity

We asked whether the temperature-dependent enzymatic inactivation of LAPTc was due to monomerization of the oligomer. This question was addressed by incubating LAPTc at different temperatures during 15 min, following by SDS-PAGE analysis. Although its enzymatic activity was almost completely lost at 60 °C, the peptidase fully retained its oligomeric form upon preincubation up to 80 °C (Fig. 4B). Complete disassembly of the oligomer was achieved after boiling the sample, since LAPTc migrated as a single 55-kDa band in the gel. These data indicate that LAPTc keeps its oligomeric form after inactivation induced by temperature. On the other hand, rLAPTc monomerization as a function of temperature correlates well with loss of activity (Fig. 4C).

LAPTc is a metalloaminopeptidase

The enzymatic activity of LAPTc on Leu-AMC was completely inhibited by 100 μM bestatin, while 250 μM 1,10-phenanthroline and 10 mM EDTA inactivated 83 and 45% of the peptidase activity, respectively (Table 4). LAPTc hydrolytic activity was not sensitive to PMSF, TLCK, E-64, leupeptin or pepstatin A. The activity of the enzyme previously inactivated by EDTA or 1,10-phenanthroline was potentiated by 0.4 mM Mn²⁺ or Ca²⁺, restored to 80% of the control by Zn²⁺ but not by Fe²⁺ and Mg²⁺. In contrast, assay in the presence of Al³⁺ or Co²⁺ resulted in considerable inactivation of the enzyme (Table 4). Since LAPTc was specifically inhibited by metal chelating agents of metals such as 1,10-phenanthroline, we consider it a member of the metalloprotease family.

Table 4. Inhibition pattern and cation dependence of LAPTc

Inhibitor	Enzymatic activity (% of control) ^a							
	No cation	Mn ²⁺	Ca ²⁺	Zn ²⁺	Fe ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	Co ²⁺
10 mM EDTA	55	149	117	80	50	44	11	5
250 μ M 1,10-phenanthroline	17	135	115	47	18	20	5	4
100 μ M bestatin	3	ND ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2 mM PMSF	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10 μ M E-64	98	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10 μ M TLCK	97	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1 mM leupeptin	99	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
200 μ M pepstatin A	102	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aLAPTc was incubated with inhibitor before enzymatic assay at 37 °C with Leu-AMC. Peptidase incubated with EDTA or 1,10-phenanthroline was dialyzed against reaction buffer prior to incubation with 20 μ M Leu-AMC and 0.4 mM MnCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, FeCl₂, MgCl₂, AlCl₃, or CoCl₂. Results represent means from three independent experiments carried out in triplicate. Standard deviations were less than 10%.

^bND, not determined.

LAPTc is expressed as an oligomer and localizes inside vesicles

To assay the expression of LAPTc by *T. cruzi*, total proteins of epimastigote cells were resolved in SDS-PAGE with or without previous heating to 100 °C, transferred to a nitrocellulose membrane and probed with specific polyclonal antibodies raised against the purified enzyme (anti-LAPTc). Under the conditions of this experiment, anti-LAPTc reacted only with the oligomeric form of the enzyme where the proteins had not been boiled, and recognized its monomer upon heating epimastigote proteins. These results show that LAPTc is expressed as an oligomer by *T. cruzi* (Fig. 1B). Anti-LAPTc antibodies were employed to determine where the enzyme localizes in the parasite through immunofluorescence assay (Fig. 5). Pre-immune serum was used in control experiments. The results of these experiments show that LAPTc is located within vesicles in the cytoplasm of epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi*.

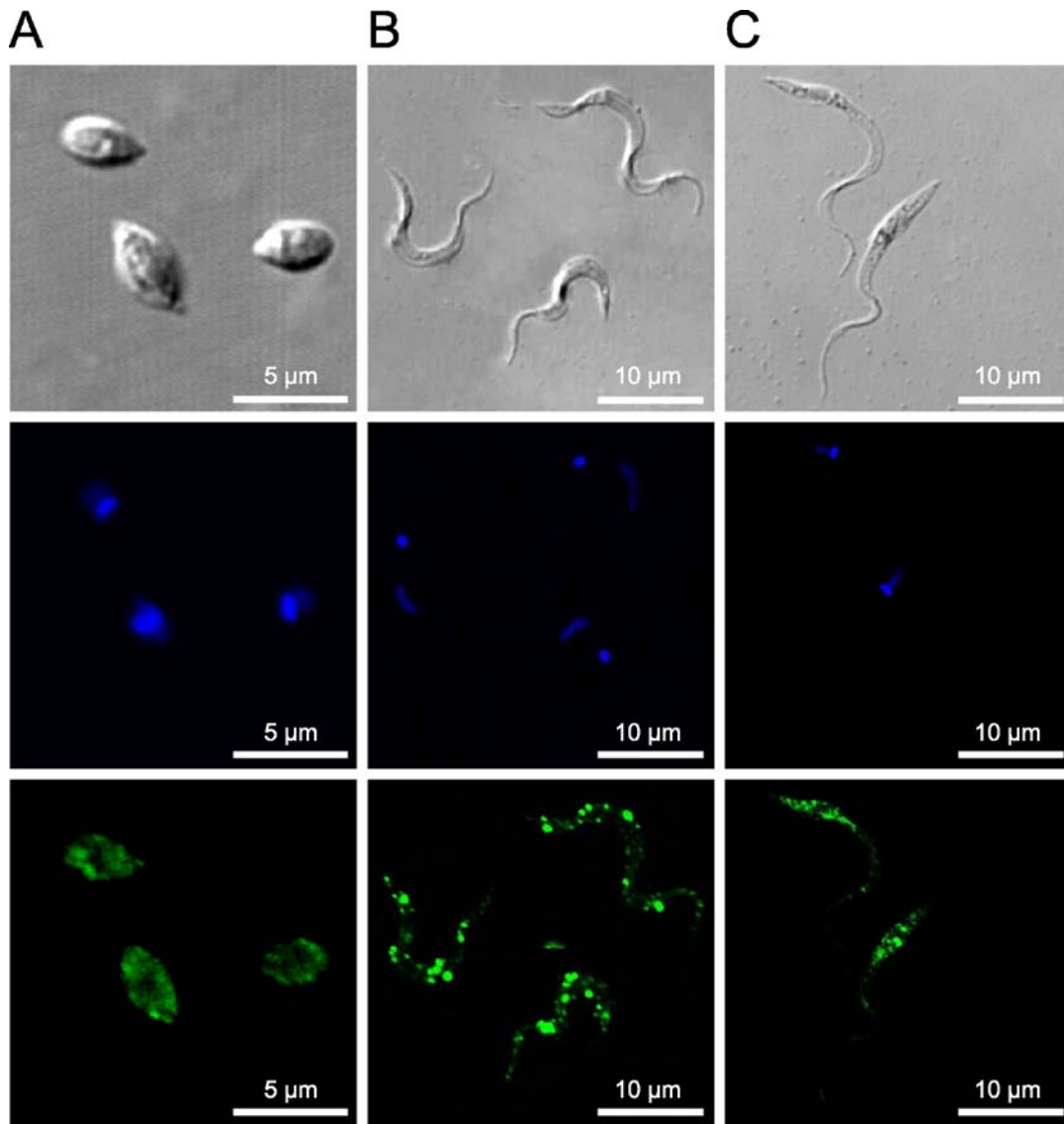


Fig. 5. **Immunocytochemical localization of LAPTc in the developmental forms of *T. cruzi*.** Immunofluorescence analysis in amastigote (A), trypomastigote (B) and epimastigote (C) forms. *Top row*, phase contrast microscopy; *middle row*, DAPI-stained parasite DNA (blue); *bottom row* anti-LAPTc serum and developing with conjugate containing Alexa 488 (green).

DISCUSSION

T. cruzi genome sequencing has revealed 28 genes encoding putative aminopeptidases, among which there are three methionine, two aspartic, two puramycin-sensitive and three leucyl aminopeptidases of the M17 family. In the present work, we report the identification, purification and biochemical characterization of a major leucyl aminopeptidase activity of *T. cruzi*. The enzyme displaying this activity is the product of the Tc00.1047053508799.240 gene and was named LAPTc to designate its activity. Under the conditions examined, a single activity on Leu-AMC was observed either during the purification procedure or upon

enzymography assay. These results suggest that LAP_{Tc} mediates a major leucyl aminopeptidase activity in *T. cruzi* epimastigotes. However, the absence of other such activities could be due to insolubility, low levels of expression or instability of the products. For example, different from other proteases of *T. cruzi* such as oligopeptidase B and cathepsin B, the activity of POPT_{c80} can not be detected by enzymographic assay due to irreversible denaturation (13, 25, 26). The absence of detectable hydrolysis of BSA, gelatin, Pro-AMC and Asp-AMC substrates suggests that the activity of LAP_{Tc} is restrictive, which is in agreement with the specificities of M17 family members that are associated with degradation and processing of peptides and proteins by removing specific N-terminal amino acidic residues (35). The differentiated expression of LAP_{Tc} activity by *T. cruzi* forms might be due to their different requirements of metabolites and processing of peptides and proteins since epimastigotes live in axenic cultures, trypomastigotes are infective and found mainly in the blood, whereas amastigotes divide inside mammalian host cells.

Aminopeptidases are widely distributed in animals, plants and microorganisms, and found in the extracellular milieu, in the cytoplasm, in many subcellular organelles, and as components of membranes (19). These enzymes are either monomeric or multimeric, comprising one, two, four or six subunits. Although members of the M17 family have been mainly described as multimeric, some of them behave as monomeric. For example, recombinant LAPs of *Leishmania* spp. and *P. falciparum* exhibit a homohexameric structure, while those of *Haemaphysalis longicornis*, *Schistosoma monsoni* and *Schistosoma japonicum* seem to be monomeric enzymes (21, 36-38). Differently, LAP_{Tc} displays an electrophoretic migration pattern corresponding to a homotetramer. However, it is necessary to take into account that some proteins display abnormal migration both in SDS-PAGE and size exclusion chromatography (39), and assembly of recombinant proteins might differ from that of their native forms. In addition, LAP_{Tc} three-dimensional structure may contribute to its fast migration since it was not heated before PAGE. Oligopeptidase B of *T. cruzi* also displays abnormal electrophoretic migration under the same experimental conditions (40). Nevertheless, other enzymes such as cathepsin B of *T. cruzi* and the hexameric leucyl aminopeptidase of *Borrelia burgdorferi* (TAP_{Bb}) show correct migration (13, 27). The hexameric nature of LAP_{Tc} was thus confirmed by analytical ultracentrifugation and MALLS assays, accurate techniques to determine molecular masses of macromolecules in the absence of any interaction with matrices or surfaces. As it has been observed for members of the M17 and M29 families, such as leucyl aminopeptidase of bovine lens, aminopeptidase A of *E. coli*, and TAP_{Bb} (27, 41, 42), the oligomeric assembly of LAP_{Tc} does not require the presence of interchain disulfide bonds because monomerization occurs in the absence of a reducing agent. The oligomeric structures of these enzymes may be maintained through hydrogen bridges, Van der Waals and hydrophobic interactions as it is observed for bovine lens aminopeptidase (33). The advantage of multimeric

over monomeric structures is still unclear, but it is possible that a quaternary structure allows not only hydrophobic regions to be hidden within the protein assemblage but also the reduction of the macromolecule surface in contact with the medium, thus restraining the amount of water required to stabilize these proteins (43). The association between enzymatic activity and multimeric structure of leucyl aminopeptidases suggests either that the active sites are formed at the subunit junctions or that the three dimensional assemblage stabilizes the active site of each monomer. The latter hypothesis is supported by the fact that the activity of leucyl aminopeptidase of bovine lens depends on the stabilization of the active site of each monomer by the structure of the oligomer (33).

LAPTc comprises several distinctive characteristics of M17 leucyl aminopeptidases such as conserved amino acid sequences, especially at the C-terminus, that contain two M17 Pfam domains, and it lacks the HEXXH signature found in the M1 family. Amino acid sequences deduced from cDNAs from many genomes have revealed amino acid sequence homologies in organisms as diverse as bacteria and mammals, particularly around residues involved in catalysis and metal ion binding (19). As expected, LAPTc shows the highest identity with the M17 leucyl aminopeptidases of the kinetoplastids *L. major* and *T. brucei*, and less extensively with the unassigned aminopeptidase II of *T. cruzi*. Despite conservation of amino acid sequences, M17 members show variable pH and temperature optima. Although LAPTc is active in a broad range of temperature, its activity shows a marked dependence on neutral pH, since at pH 6 and 8 the enzymatic activity is only 45 % of that measured at pH 7. Furthermore, the enzyme is completely inactive at pH 5 and 9. It is necessary to take into account that an enzyme may mediate its activity in a broad range of pH, depending on the substrate.

The distinguishable features between the two forms of the enzyme might be explained by folding differences or post-translational modifications as rLAPTc was produced in *E. coli*, whereas LAPTc was isolated from *T. cruzi*. The higher sensitivity of rLAPTc to SDS is in agreement with this hypothesis. This correlates well with observations that recombinant members of M17 assemble into active oligomers at 60-70 °C and alkaline pHs (19). Differently, temperatures above 70 °C promote inactivation of the thermophilic TAP_{Bb}, a member of the M29 family of metallopeptidases, through a transition from the hexameric to the monomeric state (27). Since the active form of both endogenous enzymes lack interchain disulfide bonds, the oligomeric state of LAPTc is even more resistant to high temperatures than that of TAP_{Bb}. However, the three-dimensional structure of LAPTc seems to unfold at 60 °C, the optimal activity temperature of TAP_{Bb}. In spite of displaying leucyl aminopeptidase activity, sequence identity among members of M29 and M17 families is almost absent. Resolution of three-dimensional structures of M29 peptidases may lead to a better understanding of the evolution and activity mechanism of the leucyl aminopeptidase superfamily members.

Members of M17 aminopeptidases have a broad range of functional properties beyond degradation of peptides. In animals, plants and bacteria, these enzymes have been implicated in many physiological processes such as protein turnover, regulation of cell redox status, cataract development, MHC I-dependent antigen processing and presentation to cytotoxic T cells, nutritional supply, transcriptional regulation, protein and peptide maturation and defense (19, 44). A *P. falciparum* M17 peptidase is involved in amino acid uptake and regulation and, thus, is considered a virulence factor (21). Arphamenine-A, an inhibitor of aminopeptidases, restrains *in vitro* growth of *T. brucei*, a close relative of *T. cruzi* (23). In this study, we show that LAPTc mediates the major leucyl aminopeptidase activity in *T. cruzi* extracts and, thus, it likely has important functions on physiological processes involving protein and peptide processing, degradation of proteins and amino acid recycling. *T. cruzi*, *Leishmania* spp. and *T. brucei* lack the biosynthetic pathways to synthesize the essential amino acids of humans, including leucine (45). In spite of the metabolic relevance of amino acids for these parasites, their transport and recycling are poorly known. Although many putative amino acid transporter genes have been identified *in silico*, only arginine and proline transporters have been biochemically characterized in *T. cruzi* (46-48). Considering that a biosynthetic pathway is missing, *T. cruzi* must acquire leucine through specific transport and/or recycling. Since amastigotes live and divide within host cells where the concentration of free amino acids is low, leucine aminopeptidases would play a major role in leucine supply to the parasite through hydrolysis of exogenous and endogenous proteins and peptides. Inactivation of LAPTc activity by specific inhibitors or through gene disruption may help to reveal its functional properties and thus its importance to the host-*T. cruzi* interface.

FOOTNOTES

This work was supported by grants from CNPq, FINEP, FAP-DF, PRONEX and CAPES, Brazil.

The abbreviations used are: LAPTc, leucyl aminopeptidase of *T. cruzi*; Leu-AMC, *L*-Leu-7-amido-4-methylcoumarin; N-Cbz, *N*-carbobenzyloxy; SEC-MALLS, size exclusion chromatography coupled to multiangle laser light scattering, AUC (analytical ultracentrifugation).

Acknowledgments- We thank Dr Marcelo Valle de Sousa from The University of Brasília for mass spectrometry analysis, and Aline Le Roy from the AUC and Protein Analysis On Line (PAOL) platforms of the Partnership for Structural Biology and the Institut de Biologie Structurale in Grenoble (PSB/IBS) for performing experiments and analysis.

References

1. Yoshida, N. (2006) *An. Acad. Bras. Cienc.* **78**, 87-111
2. de Souza, W. (2007) *Microbes Infect.* **9**, 544-545
3. Moncayo, A., and Silveira, A. C. (2009) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104 Suppl 1**, 17-30
4. Klemba, M., and Goldberg, D. E. (2002) *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 275-305
5. Bastos, I. M., Motta, F. N., Charneau, S., Santana, J. M., Dubost, L., Augustyns, K., and Grellier, P. (2010) *Microbes Infect.* **12**, 457-466
6. Santos, C. C., Scharfstein, J., and Lima, A. P. (2006) *Parasitol. Res.* **99**, 323-324
7. Scharfstein, J. (2006) *Immunobiology* **211**, 117-125
8. Caler, E. V., Vaena de Avalos, S., Haynes, P. A., Andrews, N. W., and Burleigh, B. A. (1998) *EMBO J.* **17**, 4975-4986
9. Grellier, P., Vendeville, S., Joyeau, R., Bastos, I. M., Drobecq, H., Frappier, F., Teixeira, A. R., Schrevel, J., Davioud-Charvet, E., Sergheraert, C., and Santana, J. M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 47078-47086
10. Bastos, I. M., Grellier, P., Martins, N. F., Cadavid-Restrepo, G., de Souza-Ault, M. R., Augustyns, K., Teixeira, A. R., Schrevel, J., Maigret, B., da Silveira, J. F., and Santana, J. M. (2005) *Biochem. J.* **388**, 29-38
11. de Diego, J. L., Katz, J. M., Marshall, P., Gutierrez, B., Manning, J. E., Nussenzweig, V., and Gonzalez, J. (2001) *Biochemistry* **40**, 1053-1062
12. Cuevas, I. C., Cazzulo, J. J., and Sanchez, D. O. (2003) *Infect. Immun.* **71**, 5739-5749
13. Garcia, M. P., Nobrega, O. T., Teixeira, A. R., Sousa, M. V., and Santana, J. M. (1998) *Mol. Biochem. Parasitol.* **91**, 263-272
14. Parussini, F., Garcia, M., Mucci, J., Agüero, F., Sanchez, D., Hellman, U., Aslund, L., and Cazzulo, J. J. (2003) *Mol. Biochem. Parasitol.* **131**, 11-23
15. Niemirowicz, G., Parussini, F., Agüero, F., and Cazzulo, J. J. (2007) *Biochem. J.* **401**, 399-410
16. da Silva-Lopez, R. E., Morgado-Diaz, J. A., dos Santos, P. T., and Giovanni-De-Simone, S. (2008) *Acta Trop.* **107**, 159-167
17. Pinho, R. T., Beltramini, L. M., Alves, C. R., and De-Simone, S. G. (2009) *Exp. Parasitol.* **122**, 128-133
18. Healy, N., Greig, S., Enahoro, H., Roberts, H., Drake, L., Shaw, E., and Ashall, F. (1992) *Parasitology* **104 (Pt 2)**, 315-322
19. Matsui, M., Fowler, J. H., and Walling, L. L. (2006) *Biol. Chem.* **387**, 1535-1544
20. Rawlings, N. D., Morton, F. R., and Barrett, A. J. (2006) *Nucleic Acids Res.* **34**, D270-272
21. Stack, C. M., Lowther, J., Cunningham, E., Donnelly, S., Gardiner, D. L., Trenholme, K. R., Skinner-Adams, T. S., Teuscher, F., Grembecka, J., Mucha, A., Kafarski, P., Lua, L., Bell, A., and Dalton, J. P. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 2069-2080
22. Rogers, A. H., Gunadi, A., Gully, N. J., and Zilm, P. S. (1998) *Microbiology* **144 (Pt 7)**, 1807-1813
23. Knowles, G. (1993) *J. Antimicrob. Chemother.* **32**, 172-174
24. Acosta, D., Cancela, M., Piacenza, L., Roche, L., Carmona, C., and Tort, J. F. (2008) *Mol. Biochem. Parasitol.* **158**, 52-64
25. Santana, J. M., Grellier, P., Schrevel, J., and Teixeira, A. R. (1997) *Biochem. J.* **325 (Pt 1)**, 129-137
26. Santana, J. M., Grellier, P., Rodier, M. H., Schrevel, J., and Teixeira, A. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 1466-1473
27. Bertin, P. B., Lozzi, S. P., Howell, J. K., Restrepo-Cadavid, G., Neves, D., Teixeira, A. R., de Sousa, M. V., Norris, S. J., and Santana, J. M. (2005) *Infect. Immun.* **73**, 2253-2261
28. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) *Anal. Chem.* **68**, 850-858
29. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882
30. Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. (2004) *Brief. Bioinform.* **5**, 150-163

31. Schuck, P. (2000) *Biophys. J.* **78**, 1606-1619
32. Rawlings, N. D., and Barrett, A. J. (1993) *Biochem. J.* **290** (Pt 1), 205-218
33. Burley, S. K., David, P. R., Taylor, A., and Lipscomb, W. N. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**, 6878-6882
34. Ebel, C. (2007) Analytical ultracentrifugation. State of the art and perspectives. In *Protein Structures: Methods in Protein Structure and Stability Analysis*, Nova Science Publishers, New York. pp 229-260
35. Taylor, A. (1993) *FASEB J.* **7**, 290-298
36. Morty, R. E., and Morehead, J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 26057-26065
37. Hatta, T., Kazama, K., Miyoshi, T., Umemiya, R., Liao, M., Inoue, N., Xuan, X., Tsuji, N., and Fujisaki, K. (2006) *Int. J. Parasitol.* **36**, 1123-1132
38. McCarthy, E., Stack, C., Donnelly, S. M., Doyle, S., Mann, V. H., Brindley, P. J., Stewart, M., Day, T. A., Maule, A. G., and Dalton, J. P. (2004) *Int. J. Parasitol.* **34**, 703-714
39. Faudry, E., Santana, J. M., Ebel, C., Vernet, T., and Teixeira, A. R. (2006) *Biochem. J.* **396**, 509-515
40. Fernandes, L. C., Bastos, I. M., Lauria-Pires, L., Rosa, A. C., Teixeira, A. R., Grellier, P., Schrevel, J., and Santana, J. M. (2005) *Microbes Infect.* **7**, 375-384
41. Burley, S. K., David, P. R., Sweet, R. M., Taylor, A., and Lipscomb, W. N. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 113-140
42. Strater, N., Sherratt, D. J., and Colloms, S. D. (1999) *EMBO J.* **18**, 4513-4522
43. Goodsell, D. S., and Olson, A. J. (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**, 65-68
44. Lowther, W. T., and Matthews, B. W. (2002) *Chem. Rev.* **102**, 4581-4608
45. Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renaud, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C., Arrowsmith, C., Atkin, R. J., Barron, A. J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T. J., Churcher, C., Clark, L. N., Corton, C. H., Cronin, A., Davies, R. M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M. C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B. R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A. X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P. J., Moule, S., Martin, D. M., Morgan, G. W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C. S., Peterson, J., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rajandream, M. A., Reitter, C., Salzberg, S. L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A. J., Tallon, L., Turner, C. M., Tait, A., Tivey, A. R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M. D., Embley, T. M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J. D., Fairlamb, A. H., Opperdoes, F., Barrell, B. G., Donelson, J. E., Hall, N., Fraser, C. M., Melville, S. E., and El-Sayed, N. M. (2005) *Science* **309**, 416-422
46. Pereira, C. A., Alonso, G. D., Ivaldi, S., Silber, A., Alves, M. J., Bouvier, L. A., Flawia, M. M., and Torres, H. N. (2002) *FEBS Lett.* **526**, 111-114
47. Silber, A. M., Tonelli, R. R., Martinelli, M., Colli, W., and Alves, M. J. (2002) *J. Eukaryot. Microbiol.* **49**, 441-446
48. Bouvier, L. A., Silber, A. M., Galvao Lopes, C., Canepa, G. E., Miranda, M. R., Tonelli, R. R., Colli, W., Alves, M. J., and Pereira, C. A. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 547-556

Discussão

As LAPs são metalo-exopeptidases que catalisam preferencialmente a hidrólise de resíduos de leucina da extremidade amino-terminal de proteínas e peptídeos (Taylor, 1993). As LAPs são consideradas uma das mais importantes aminopeptidases citossólicas e já foram identificadas em inúmeros microorganismos, plantas, vertebrados e invertebrados (Bartling e Weiler, 1992; Rogi *et alii*, 1996; Hatta *et alii*, 2006; Jia *et alii*, 2009). Neste trabalho, realizamos a expressão e caracterização bioquímica de uma leucil aminopeptidase de *T. cruzi* e, para isso, identificamos e realizamos a clonagem de dois dos genes de leucil aminopeptidase presentes no genoma do parasito. Nas condições experimentais empregadas, obtivemos sucesso com apenas uma das leucil aminopeptidases clonadas, referente ao gene EAN97960 (Tc00.1047053508799.240). A indução deste gene produziu a expressão da enzima alvo do trabalho de forma solúvel e ativa, LAP_{Tc2}, denominada de rLAP_{Tc}. A tentativa de expressão da LAP_{Tc1} foi realizada em diferentes condições. A temperatura de indução foi testada na faixa de 20 a 37 °C, o tempo empregado foi de 3 a 16 h e a concentração de IPTG variou de 0,1 a 1,0 mM. Todas as variações foram realizadas combinadas entre si, em inúmeras tentativas. Como não conseguimos prosseguir com a caracterização da enzima LAP_{Tc1} devido à baixa produtividade durante sua expressão e do insucesso no estabelecimento de sua purificação em larga escala, deixamos seu clone no vetor pET-19b purificado estocado em glicerol a -80 °C para testes posteriores ou futuros projetos.

O desenvolvimento de métodos de alto desempenho para a expressão e purificação de proteínas é complicado devido às diversas propriedades químicas das proteínas. A expressão heteróloga de proteínas fusionadas a uma cauda é uma estratégia bastante utilizada na produção de proteínas recombinantes (Terpe, 2003; Drewes e Bouwmeester, 2003). A purificação por afinidade de proteínas usando caudas fusionadas às suas sequências, tais como tioredoxina (TRX)² (LaVallie *et alii*, 1993; Yuan e Hua, 2002), glutathione S-transferase (GST) (Nygren *et alii*, 1994; Sun *et alii*, 2005) e sequências de poli-histidina, que são clonadas e expressas como parte da proteína de interesse, permite purificações de muitas proteínas por cromatografias simples. Apesar de apresentar muitas vantagens como facilitar a purificação e detecção de proteínas, a presença dessas caudas de afinidade podem afetar

características importantes, interferir nas funções e alterar o comportamento das proteínas-alvo a serem estudadas (Bucher *et alii*, 2002; Smyth *et alii*, 2003; Chant *et alii*, 2005). A dificuldade de purificar a enzima LAPTc1 pode ser explicada pelo dobramento da mesma, deixando sua cauda de histidina de forma “escondida”, não permitindo que esta se ligue à matriz da coluna de afinidade. Uma alternativa para solucionar este problema seria a mudança da cauda de histidina para a outra extremidade da sequência da proteína. Isso poderia favorecer o dobramento correto da proteína, deixando sua cauda de histidina exposta. Além disso, poderíamos utilizar outro vetor de expressão para tentar a expressão da enzima LAPTc1. Outra hipótese para a dificuldade na expressão pode estar no sistema escolhido. Apesar de apresentar muitas vantagens, o uso de *E. coli* como hospedeiro pode causar baixo nível de expressão de muitas proteínas e a formação de agregados insolúveis inativos. Esses problemas podem aparecer devido à toxicidade dos produtos, a instabilidade do mRNA, a falta de modificações pós-traducionais, a saturação da maquinaria de dobramento das células e a deficiência de co-fatores (Ilicula-Thomas e Balaji, 2005; Rosano e Ceccarelli, 2009). Por esses motivos, uma sugestão seria a troca do sistema de expressão pelo sistema baculovírus ou *Pichia pastoris* (Lombardi *et alii*, 2010) como hospedeiro. Outra saída seria o emprego do sistema de expressão usando tripanossomatídeos como hospedeiro. O protozoário tripanossomatídeo *Crithidia fasciculata*, além de não ser patogênico aos humanos é facilmente cultivado em grandes quantidades e constitui um importante modelo para a expressão de proteínas.

A tentativa de expressão de uma leucil aminopeptidase (LAPTc2-Bac) no sistema baculovírus também não foi alcançada com êxito. O gene foi clonado no vetor pFastBac sem dificuldades, formando o plasmídeo recombinante. No entanto, no passo seguinte, na transformação do plasmídeo em células competentes de *E. coli* DH10Bac para a formação do bacmídeo recombinante, encontramos alguns problemas. Os bacmídeos purificados foram transfectados por várias vezes em células de inseto para que a proteína fosse expressa, mas por motivos variados como contaminação durante o experimento retardaram os testes. Além disso, os bacmídeos não se formaram corretamente, o que impossibilitou obter a enzima com sucesso. Após estes problemas, a expressão da leucil-aminopeptidase de *T. cruzi* (LAPTc2-Bac) em sistema

baculovírus foi interrompida e seu clone no vetor pFastBac foi estocado a -80 °C.

A produção de soro anti-rLAPTc foi realizada em camundongos e os ensaios de *Western blot* mostraram a imunogenicidade e antigenicidade da enzima. No entanto, utilizamos o soro da LAPTc nativa, produzido em coelho, para sua detecção intracelular nos experimentos de imunofluorescência. Devido ao fato de terem sido produzidos em coelho, o rendimento e a quantidade dos anticorpos contra a forma nativa pesaram nesta decisão porque a imunocitocalização da enzima foi exaustivamente repetida, consumindo muito material. Contudo, cabe ressaltar que os experimentos realizados com soro anti-rLAPTc ou com o anti-LAPTc produziram resultados iguais. A marcação observada indica que a enzima está localizada em vesículas nas diferentes formas do parasito.

Elas exibem diversas funções biológicas e fisiológicas seja pela degradação de peptídeos ou pela interação com sinalização dependente de peptídeos (Matsui *et alii*, 2006; Mizutani *et alii*, 2007). Algumas destas funções estão envolvidas na regulação metabólica, no controle do ciclo celular e na degradação seletiva de proteínas (Brownlees e Williams, 1993). Mudanças no padrão de expressão ou na função catalítica de LAPs resultam em ativação peptídica alterada, levando a mudanças na proliferação celular em tumor e angiogênese. As investigações sobre LAPs de organismos parasitos tais como *Plasmodium*, *Leishmania* e *Trypanosoma* mostram que estas enzimas estão envolvidas na regulação de aminoácidos livres (Knowles, 1993; Morty e Morehead, 2002; Stack *et alii*, 2007). Devido às suas importantes funções desempenhadas na biologia do parasito, muitas LAPs tem sido caracterizadas como fatores de virulência e, portanto, alvos de drogas e candidatos a vacinas (Stack *et alii*, 2007; Acosta *et alii*, 2008; Marcilla *et alii*, 2008) contra infecções parasitárias.

A LAP de *Toxoplasma gondii* (TgLAP) é expressa como um homohexâmero e localiza-se no citossol, o que sugere participação na hidrólise de peptídeos derivados da via de degradação de proteínas pelo proteassoma e/ou daqueles oriundos da degradação no vacúolo parasitóforo por endopeptidases. A atividade máxima da TgLAP foi registrada em pH levemente alcalino (pH 8,0) e a 37 °C. Além disso, sua atividade é marcadamente ativada pela adição de

cátions divalentes (Co^{+2} e Mn^{+2}) em concentrações milimolares e inibida por bestatina (Jia *et alii*, 2010). Bestatina é um dipeptídeo originalmente isolado de filtrados de *Streptomyces olivoreticuli* e é conhecida como o inibidor das aminopeptidases M17 e M1 (Umezawa *et alii*, 1976).

Os resíduos de aminoácidos gerados durante a degradação da hemoglobina são essenciais para a síntese de proteínas necessária para o desenvolvimento e crescimento dos parasitos causadores da malária. Durante a fase intraeritrocítica do ciclo de vida nos humanos, eles adquirem resíduos de aminoácidos livres necessários para a síntese de suas proteínas da degradação de hemoglobina do hospedeiro. A via de degradação da hemoglobina tem sido bastante explorada e foi sugerido ser essencial para sobrevivência de *Plasmodium* spp. (Goldberg, 2005; Rosenthal, 2002). A hemoglobina, inicialmente, é degradada no vacúolo digestivo por endopeptidases, incluindo falcipainas e plasmepsinas, gerando pequenos peptídeos. Em seguida, aminopeptidases transformam esses peptídeos em resíduos de aminoácidos livres (Skinner-Adams *et alii*, 2010).

Atividades leucil-aminopeptidolíticas têm sido encontradas em extratos de *P. falciparum* (Vander Jagt *et alii*, 1984; Gavigan *et alii*, 2001). Estudos recentes realizados com a forma recombinante da LAP de *P. falciparum* revelaram que a enzima é uma LAP M17 que exibe atividade aminopeptidolítica comparável àquela encontrada nos extratos de *P. falciparum*, e que é essencial no processo de degradação da hemoglobina do hospedeiro e para o desenvolvimento do parasito (Gardiner *et alii*, 2006; Stack *et alii*, 2007; Dalal e Klemba, 2007). A atividade da LAP citossólica de *P. falciparum* mostrou ser máxima em pH neutro e levemente alcalino, aumentando consideravelmente quando incubada com íons metálicos divalentes, e sendo significativamente inibida por bestatina e nitrobestatina (Gavigan *et alii*, 2001; Stack *et alii*, 2007). Além disso, estudos usando inibidores sugerem que a LAP de *P. falciparum* é um alvo promissor de drogas, tornando as aminopeptidases alvos quimioterápicos potenciais contra a malária (Nankya-Kitaka *et alii*, 1998; Gardiner *et alii*, 2006; Stack *et alii*, 2007; Skinner-Adams *et alii*, 2007; Cunningham *et alii*, 2008; Skinner-Adams *et alii*, 2010).

Em *Plasmodium vivax*, a LAP recombinante (PvLAP) foi recentemente estudada e ensaios de imunofluorescência, usando anticorpos específicos,

mostraram que a enzima localiza-se em compartimentos ácidos, como lisossomos e reservossomos. Apesar disso, o pH ótimo da PvLAP mostrou ser levemente alcalino (pH 8,5), sugerindo que a enzima não poderia funcionar eficientemente nos ambientes ácidos dos vacúolos digestivos. No entanto, é necessário observar que o pH ótimo muitas vezes influencia mais o substrato que a enzima. Estes resultados, juntamente com aqueles mostrados por imunofluorescência sugerem que a PvLAP encontra-se distribuída no citossol, onde ocorre a digestão dos pequenos peptídeos oriundos da degradação da hemoglobina. Em adição, a atividade da PvLAP aumentou bastante quando incubada com íons metálicos divalentes e foi fortemente inibida por EDTA, 1,10-fenantrolina e bestatina (Lee *et alii*, 2010).

A LAP de *Babesia gibsoni* (BgLAP) localiza-se no citossol de suas formas merozoítas (Jia *et alii*, 2009). Sua atividade amidopeptidolítica ótima foi observada em pH levemente alcalino (pH 8,0), a 37 °C, sendo inibida por bestatina. A atividade da BgLAP é marcadamente aumentada pela incubação da enzima com Mn^{+2} . No entanto, sua atividade também é aumentada na presença de outros cátions metálicos divalentes, tais como Ni^{+2} e Co^{+2} . Estas informações foram semelhantes com as de outras aminopeptidases M17 como as de *Leishmania* (Morty e Morehead, 2002) e *Plasmodium* (Stack *et alii*, 2007). Na sequência de resíduos de aminoácidos da BgLAP, a superfície de contato entre os dois trímeros foi identificada pelo programa BLAST. Estes dados indicaram que a BgLAP nativa também poderia existir no parasito como homo-hexâmeros (Jia *et alii*, 2009). As características bioquímicas das LAPs descritas acima coincidem com aquelas da LAP_{Tc}. Isto sugere que LAPs de *T. cruzi* poderiam desempenhar funções semelhantes às daquelas das LAPs de outros parasitos.

A oligomerização de proteínas consiste de duas ou mais cadeias polipeptídicas associadas. Este mecanismo pode ser vantajoso do ponto de vista evolutivo das proteínas por diversos fatores, incluindo novas oportunidades para o controle funcional, tais como regulação alostérica e o estabelecimento de complexidade de alta ordem. Muitas proteínas primitivas podem ter sido homo-oligoméricas ou hetero-oligoméricas para suportar melhor suas funções, e então o estudo da natureza da oligomerização das proteínas pôde elucidar fatores dentro de uma perspectiva evolutiva (Ali e Imperiali,

2005). Por exemplo, a TAP_{Bb} é homo-hexamérica e termofílica apesar de *B. burgdorferi* viver a temperaturas amenas (Bertin *et alii*, 2005).

As proteínas oligoméricas caracterizam-se por serem compostas de subunidades múltiplas (cadeias polipeptídicas) que podem ser a mesma (homo-oligoméricas) ou diferentes (hetero-oligoméricas). Estudos recentes sugerem que 35% ou mais das proteínas de uma célula são oligoméricas e que a maioria delas é formada por homo-oligômeros (Goodsell e Olson, 2000). Uma média dos estados oligoméricos de proteínas celulares sugere a predominância de estados tetraméricos (Goodsell, 1991). A maioria das proteínas oligoméricas e essencialmente todas as homo-oligoméricas são simétricas (Goodsell e Olson, 2000). A LAP_{Tc}, assim como outras LAPs, organiza-se em homo-hexâmeros.

A associação entre subunidades podem variar no tamanho e na duração. Muitas proteínas são encontradas somente, ou primariamente, no estado oligomérico. Essas proteínas geralmente têm dissociações constantes na ordem nanomolar (Nooren e Thornton, 2003a). Outras tem uma fraca tendência em associar-se na dependência de condições do meio, como concentração, pH e temperatura. Além disso, outras proteínas oligomerizam dinamicamente em resposta a estímulos, como alterações na hidrólise de nucleotídeos ou no estado de fosforilação. Tais mudanças podem ter efeito crítico sobre a afinidade entre as subunidades (Nooren e Thornton, 2003a,b).

Modelos de mini-proteínas, pequenos polipeptídeos que adotam uma estrutura estável e discreta em soluções aquosas, estão sendo extensivamente usados como modelos para o estudo de fatores chave de proteínas naturais, como determinantes termodinâmicos da estabilidade de proteínas (Zhou *et alii*, 1992) e a introdução de funcionalidades catalíticas (Robertson *et alii*, 1994; Shogren-Knaak e Imperiali, 1999; Broo *et alii*, 1998; Allert *et alii*, 1998). Mini-proteínas são ideais para o estudo de proteínas oligoméricas por serem sistemas simples e devido a seus tamanhos reduzidos, o que facilita estudos computacionais.

Características específicas da interface de uma proteína oligomérica dependem da natureza dessas interfaces e da duração das interações. Grandes interfaces oligoméricas estão frequentemente associadas com interações fortes. No entanto, uma interface oligomérica pequena pode

manifestar interações fracas ou fortes (Nooren e Thornton, 2003a). Resíduos conservados, geralmente no centro de uma interface, são responsáveis pela maioria da energia de ligação de uma interação oligomérica. Esses resíduos são frequentemente polares e estão envolvidos por ligações de van der Waals e pontes de hidrogênio (Clackson e Wells, 1995; Bogan e Thorn, 1998; Hu *et alii*, 2000). Interações hidrofóbicas tem um papel importante na definição de interfaces de proteínas homo-oligoméricas. Em adição, pontes de hidrogênio e de sal também são importantes para a estabilização de interfaces oligoméricas. As mini-proteínas também estão sendo usadas para examinar os fatores gerais das interfaces de proteínas oligoméricas e seus mecanismos de dobramento. Portanto, o enovelamento de cada subunidade influi decisivamente na estabilidade e funcionalidade do oligômero. Isto poderia explicar a razão pela qual a LAPTc e a rLAPTc possuem características diferentes como temperatura ótima de atividade e parâmetros cinéticos.

Muitas proteínas co-existem em mais de um estado oligomérico (Rochet *et alii*, 2000; Liu e Eisenberg, 2002; Ali *et alii*, 2003) e proteínas estruturais, como a actina, podem sofrer polimerização (Rafelski e Theriot, 2004). Outras proteínas podem se polimerizar após sofrerem mudanças conformacionais, originando fibrilas amiloides (Dobson, 2003; Dobson, 2004). As LAPs, incluindo essa de *T. cruzi* que caracterizamos neste trabalho, parecem existir apenas em suas formas oligoméricas. No entanto, não se pode descartar a possibilidade da existência de intermediários na dependência de condições fisiológicas, como, por exemplo, durante a diferenciação celular.

Existem muitas vantagens funcionais que podem ser conferidas pela oligomerização e que podem ter sido selecionadas durante a evolução (Goodsell e Olson, 1993; Nooren e Thornton, 2003a,b; Liu e Eisenberg, 2002). Dentre elas estão: a oligomerização pode conferir melhor função de suporte por ser uma estrutura mais complexa; proteínas oligoméricas podem ser reguladas alostericamente; proteínas maiores são mais resistentes à degradação e desnaturação. Por exemplo, o aumento no estado de oligomerização é uma das estratégias de estabilização de proteínas mais observada em organismos termofílicos (Walden *et alii*, 2001).

Parte da rLAPTc mostrou-se em estado de agregação. É interessante notar que o fenômeno de agregação de proteínas é um dos tópicos da ciência

moderna mais explorado atualmente e é reconhecida como um sério e intrigante problema biomédico e biotecnológico. A agregação de proteínas é considerada um fator causador, ou um sintoma associado, de uma grande quantidade de patologias humanas. Além disso, a agregação e precipitação de proteínas são conhecidas por atrapalhar e até impedir a produção de proteínas recombinantes, formando corpos de inclusão, e afetando a fabricação e estocagem de drogas proteicas. Os estudos atuais visam entender os mecanismos de agregação de proteínas em geral e suas peculiaridades. O intenso interesse neste problema está relacionado com a ligação entre a agregação de proteínas e várias doenças. Muitas patologias humanas estão associadas com a conversão de cadeias polipeptídicas em estados solúveis em agregados fibrilares bem organizados (Selkoe, 2003; Uversky e Fink, 2004; Westermarck *et alii*, 2005; Chiti e Dobson, 2006 e 2009). Estas patologias são conhecidas como doenças de deposição de proteínas que incluem condições neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, Huntington), amiloidoses sistêmicas e amiloidoses localizadas (diabetes tipo II) (Chiti e Dobson, 2009).

A agregação e oligomerização de proteínas pode ser agrupada em 3 classes: naturais; indesejáveis na biologia (corpos de inclusão, depósito de proteínas em doenças conformacionais, agregados amorfos, fibrilas amilóides); e indesejáveis na biotecnologia (produção, purificação e estocagem de proteínas e drogas, precipitação dessas drogas durante os procedimentos). A agregação de proteínas é um fenômeno dispendioso, tanto na perspectiva de perdas biotecnológicas quanto nos custos para o tratamento das numerosas doenças humanas associadas com a deposição de proteínas. Foram descritos papéis negativos da agregação de proteínas (Oberg *et alii*, 1994). A agregação de intermediários parcialmente dobrados alteram o dobramento de IL-1 β , levando ao acúmulo de corpos de inclusão e agregados (Oberg *et alii*, 1994). Por outro lado, existem casos onde a oligomerização (e algumas vezes a agregação) é produtiva e biologicamente importante. Exemplos dessas associações produtivas de proteínas incluem a formação de complexos oligoméricos estáveis (por exemplo, complexos transientes na sinalização e regulação) e de proteínas estruturais (Seshadri *et alii*, 2009).

A auto-associação (agregação) de proteínas monoméricas globulares podem ser produtivas, gerando o dobramento das mesmas. Ou seja, a

agregação de intermediários parcialmente dobrados induzem a estruturas adicionais, podendo levar a agregados solúveis (oligômeros) contendo mais fatores semelhantes ao estado nativo. Foi mostrado que a SNase desdobrada em solução ácida (pH 2,5) pode ser transformada em um dos três estados intermediários parcialmente dobrados, dependendo da natureza e concentração dos ânions adicionados para neutralizar o efeito repulsivo da rede de cargas positivas na cadeia polipeptídica ácida desdobrada (Fink *et alii*, 1993; Uversky *et alii*, 1998). Um comportamento semelhante também foi descrito para a apomioglobina (Fink *et alii*, 1998). É importante ressaltar que observamos agregação somente na forma recombinante da LAPTc. No entanto, apenas o experimento de *Western blot* não é suficiente para concluir que agregados desta proteína estejam ausentes em *T. cruzi*.

Nossos dados mostram que formas de *T. cruzi* expressam a LAPTc homo-hexamérica que medeia atividade principal de remoção de resíduos de Leu a partir de proteínas e peptídeos nas condições experimentais empregadas. A compreensão da(s) função(s) desta enzima no ciclo de vida do parasito necessita de experimentos adicionais por meio de nocaute de seu gene e/ou pelo emprego de inibidores seletivos. Pretendemos obter um modelo tridimensional da LAPTc empregando estrutura conhecida de outras LAPs, modelagem molecular por homologia, realizar buscas de inibidores seletivos *in silico* e, então empregá-los em estudos de interação *T. cruzi*-célula hospedeira mamífera não fagocítica.

Conclusões

Os resultados obtidos com os ensaios experimentais empregados nos permitem concluir que:

- Os genes de LAP *laptc1* e *laptc2* foram corretamente clonados para expressão heteróloga em sistema *E. coli*, com fase aberta de leitura de 1755 e 1563 bp, respectivamente; o gene *laptc2-bac* foi clonado para expressão em sistema baculovírus;
- A proteína recombinante rLAPTc, referente ao produto do gene *laptc2*, foi expressa solúvel e ativa como homo-hexâmero em *E. coli*;
- Sua atividade leucil-aminopeptidolítica depende de sua forma hexamérica que é sensível ao SDS;
- A enzima rLAPTc possui atividade ótima em pH 8,5 a 60 °C, o que a caracteriza como termofílica, ao contrário da sua forma nativa que é neutra e mesofílica;
- O padrão de inibição indica que a LAPTc é uma metalo-peptidase;
- A monomerização da rLAPTc em função da temperatura está bem correlacionada com a perda de sua atividade, enquanto que sua forma nativa mantém sua estrutura após perder a atividade;
- A enzima é expressa como um hexâmero e localiza-se em vesículas citossólicas nas três formas do parasito.

Referências bibliográficas

ABADJIEVA, A.; HILVEN, P.; PAUWELS, K.; CRABEEL, M. The yeast ARG7 gene product is autoproteolyzed to two subunit peptides, yielding active ornithine acetyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 15, p. 11361-11367, Apr. 2000.

ACOSTA, D.; CANCELA, M.; PIACENZA, L.; ROCHE, L.; CARMONA, C.; TORT J. F. *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 158, n. 1, p. 52-64, Mar. 2008.

ALLERT, M.; KJELLSTRAND, M.; BROO, K.; NILSSON, A; BALTZER, L. A designed folded polypeptide model system that catalyses the decarboxylation of oxaloacetate. **Journal of the Chemical Society**, v. 2, p. 2271-2274, Aug. 1998.

ALI, M. H.; IMPERIALI, B. Protein oligomerization: How and why. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 17, p. 5013-5020, Sept. 2005.

ALI, S. A.; IWABUCHI, N.; MATSUI, T.; HIROTA, K.; KIDOKORO, S.; ARAI, M.; KUWAJIMA, K.; SCHUCK, P.; ARISAKA, F. Reversible and fast association equilibria of a molecular chaperone, gp57A, of bacteriophage T4. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 4, p. 2606-2618, Oct. 2003.

ANDRADE, Z. A. A patologia da doença de Chagas no homem=The pathology of Chagas disease in man. **Annales de La Societe Belge de Medecine Tropical**, v. 65, p. 15-30, 1985. Suplemento 1.

ARGOLO, A. M.; FELIX, M. PACHECO, R. COSTA, J. A doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*, o causador da doença de Chagas. In:____, **Doença de Chagas e Seus Principais Vetores no Brasil**, Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2008, p. 19. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/media/Versao%20em%20Portugues.pdf>> . Acesso em: 26 jul. 2010.

ARIMA, J.; IWABUCHI, M.; HATANAKA, T. Gene cloning and overproduction of an aminopeptidase from *Streptomyces septatus* TH-2, and comparison with a calcium-activated enzyme from *Streptomyces griseus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 317, n. 2, p. 531-538, Apr. 2004.

ASLUND, L.; HENRIKSSON, J.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A. C.; PETTERSSON, U.; CAZZULO, J. J. The C-terminal extension of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 45, n. 2, p. 345-347, Apr. 1991.

BARBOZA, M.; DUSCHAK, V. G.; FUKUYAMA, Y.; NONAMI, H.; ERRA-BALSELLS, R.; CAZZULO, J. J.; COUTO, A. S. Structural analysis of the N-glycans of the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*. Identification of sulfated high-mannose type oligosaccharides. **The FEBS Journal**, v. 272, n. 15, p. 3803-3815, Aug. 2005.

BARRETT, A. J. Proteolytic Enzymes: nomenclature and classification. In: BEYNON, R.; BOND, J. S. **Proteolytic Enzymes – A Practical Approach**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2001. p. 1-20.

BARRETT, A. J. The many forms and functions of cellular proteinases. **Federation Proceedings**, v. 39, n. 1, p. 9-14, Jan.1980.

BARRETT, A.J. & MCDONALD, J.K. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. **The Biochemical Journal**, v. 237, n. 3, p. 935. Aug. 1986.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. **Biological Chemistry**, v. 382, n. 5, p. 727-733, May 2001.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Proteinases. **Biochemical Society Transactions**, v. 19, p. 707-715, 1991.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. London: Academic Press, 1998.

BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, Nov. 2003.

BARTLING, D.; WEILER, E. W. Leucine aminopeptidase from *Arabidopsis thaliana*. Molecular evidence for a phylogenetically conserved enzyme of protein turnover in higher plants. **The FEBS Journal: European Journal of Biochemistry**, v. 205, n. 1, p. 425-431, Apr. 1992.

BASTOS, I. M.; GRELLIER, P.; MARTINS, N. F.; CADAVID-RESTREPO, G.; DE SOUZA-AULT, M. R.; AUGUSTYNS, K.; TEIXEIRA, A. R.; SCHREVEL, J.; MAIGRET, B.; DA SILVEIRA, J. F.; SANTANA, J. M. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. **The Biochemical Journal**, v.388, p. 29-38, May 2005.

BEHARI, J.; STAGON, L.; CALDERWOOD, S. B. pepA, a gene mediating pH regulation of virulence genes in *Vibrio cholerae*. **Journal of Bacteriology**, v.183, n. 1, p.178-188, Jan. 2001.

BENINGA, J.; ROCK, K. L.; GOLDBERG, A. L. Interferon- γ Can Stimulate Post-proteasomal Trimming of the N Terminus of an Antigenic Peptide by Inducing Leucine Aminopeptidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 30, p. 18734-18742, July 1998.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P.; HERWALDT, B. L.; RASSI JUNIOR, A.; MARIN-NETO, J. A.; DANTAS, R. O.; MAGUIRE, J. H.; ACQUATELLA, H.; MORILLO, C.; KIRCHHOFF, L. V.; GILMAN, R. H.; REYES, P. A.; SALVATELLA, R.; MOORE, A. C. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 18, p. 2171-2181, Nov. 2007.

BERQUIN I. M.; SLOANE B. F. Cathepsin B expression in human tumors. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 389, p. 281-294, 1996.

BERTIN, P. B.; LOZZI, S. P.; HOWELL, J. K.; RESTREPO-CADAVID, G.; NEVES, D.; TEIXEIRA, A. R.; DE SOUSA, M. V.; NORRIS, S. J.; SANTANA, J. M. The thermophilic, homohexameric aminopeptidase of *Borrelia burgdorferi* is a member of the M29 family of metallopeptidases. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2253-2261, Apr. 2005.

BOGAN, A. A.; THORN, K. S. Anatomy of hot spots in protein interfaces. **Journal of Molecular Biology**, v. 280, n. 1, p. 1-9, July 1998.

BONALDO, M. C.; D'ESCOFFIER, L. N.; SALLES, J. M.; GOLDENBERG, S. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Experimental Parasitology**, v. 73, n. 1, p. 44-51, July 1991.

BOND, J. S.; BUTLER, P. E. Intracellular Proteases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 56, p. 333-364, 1987.

BONTEMPI, E.; CAZZULO, J. J. Digestion of human immunoglobulin G by the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v.58, n. 3, p. 337-341, Aug. 1990.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL, M. N. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2000.

BROO, K. S.; NILSSON, H.; NILSSON, J.; FLOODBERG, A.; BALTZER, L. Cooperative Nucleophilic and General-Acid Catalysis by the HisH-His Pair and Arginine Transition State Binding in Catalysis of Ester Hydrolysis Reactions by Designed Helix-Loop-Helix Motifs. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 17, p. 4063-4068, Apr. 1998.

BROWNLEES, J.; WILLIAMS, C. H. Peptidases, peptides, and the mammalian blood-brain barrier. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, n. 3, p. 793-803, Mar. 1993.

BUCHER, M. H.; EVDOKIMOV, A. G.; WAUGH, D. S. Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein, **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v. 58, p. 392-397, Mar. 2002

BUCK, M. R.; KARUSTIS, D. G.; DAY, N. A.; HONN, K. V.; SLOANE, B. F. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. **The Biochemical Journal**, v. 282, p. 273-278, Feb. 1992.

BURLEIGH, B. A.; CALER, E. V.; WEBSTER, P.; ANDREWS, N. W. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 136, n. 3, p. 609-620, Feb. 1997.

BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 701-711, Nov. 2002.

BURLEIGH, B.; ANDREWS, N. W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 4, p. 461-465, Aug. 1998.

BURLEY, S. K.; DAVID, P. R.; TAYLOR, A.; LIPSCOMB, W. N. Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2.7-Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 17, p. 6878-6882, Sept. 1990.

BUTTON, L. L.; REINER, N. E.; MCMASTER, W. R. Modification of GP63 genes from diverse species of *Leishmania* for expression of recombinant protein at high levels in *Escherichia coli*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 44, p. 213-224, 1991.

BUTTON, L. L.; WILSON, G.; ASTELL, C. R.; MCMASTER, W. R. Recombinant *Leishmania* surface glycoprotein GP63 is secreted in the baculovirus expression system as a latent metalloproteinase. **Gene**, v. 134, p. 75-81, 1993.

CALER, E. V.; VAENA DE AVALOS, S.; HAYNES, P. A.; ANDREWS, N. W.; BURLEIGH, B. A. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 17, p. 4975-4986, Sept. 1998.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid medium. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, p. 93-100, 1964.

CAMPETELLA, O.; HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; FRASCH, A. C.; PETTERSSON, U.; CAZZULO, J. J. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 50, n. 2, p. 225-234, Feb. 1992.

CAMPETELLA, O.; MARTINEZ, J.; CAZZULO, J. J. A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 55, n. 1-2, p. 145-149, Jan. 1990.

CANÇADO, J. R. Forma aguda da doença de Chagas no Brasil. **AMB Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 26, n. 8, p. 285-288. Aug. 1980.

CAPPIELLO, M.; ALTERIO, V.; AMODEO, P.; DEL CORSO, A.; SCALONI, A.; PEDONE, C.; MOSCHINI, R.; De DONATIS, G.M.; DE SIMONE, G.; MURA, U. Metal ion substitution in the catalytic site greatly affects the binding of sulfhydryl-containing compounds to leucyl aminopeptidase. **Biochemistry**, v. 45, n. 10, p. 3226-3234, Mar. 2006.

CARDOSO, A. V.; LESCANO, S. A.; AMATO NETO, V.; GAKIYA, E.; SANTOS, S. V. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 5, p. 287-289, Sept.-Oct. 2006.

CASTILHOS, W. Doença de Chagas é a mais esquecida de todas as doenças negligenciadas. **Diário da Saúde**, Jul. 2009. Disponível em: <http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=doenca-chagas-mais-esquecida-todas-doencas-negligenciadas&id=4333>>. Acesso em: 29 set. 2010.

CASTRO, J. A.; MECCA, M. M. de; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471-479, Aug. 2006.

CAWSTON, T. E.; WILSON A. J. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 5, p. 983-1002, Oct. 2006.

CAZZULO, J. J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas' disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 11, p. 1261-1271, Nov. 2002.

CAZZULO, J. J., STOKA, V., TURK, V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, n. 12, p. 1143-1156, Aug. 2001.

CAZZULO, J. J.; COUSO, R.; RAIMONDI, A.; WERNSTEDT, C.; HELLMAN, U. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, n. 1, p. 33-41, Feb. 1989

CAZZULO, J. J.; STOKA, V.; TURK, V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Biological Chemistry**, v. 378, n. 1, p. 1-10, Jan. 1997.

CHAGAS, C. Nova Tripanosomíase Humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen.,n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 159 - 218, 1909.

CHANG, W. -S. H.; WU, H.-R.; YEH, C.-T.; WU, C.-W.; CHANG, J.-Y. Lysosomal Cysteine Proteinase Cathepsin S as a Potential Target for Anti-Cancer Therapy. **Journal of Cancer Molecules**, v. 3, n. 1, p. 5-14, 2007.

CHANT, A.; KRAEMER-PECORE, C. M.; WATKIN, R.; KNEALE, G. G. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. **Protein Expression and Purification**, v. 39, n. 2, p. 152-159, Feb. 2005.

- CHAPMAN, H. A. Endosomal proteases in antigen presentation. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 1, p. 78-84, Feb. 2006.
- CHITI, F.; DOBSON, C.M. Amyloid formation by globular proteins under native conditions. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 1, p. 15-22, Jan. 2009.
- CHITI, F.; DOBSON, C.M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, p. 333-366, 2006.
- CLACKSON, T.; WELLS, J. A. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. **Science**, v. 267, n. 5196, p. 383-386, Jan. 1995.
- COLLOMS, S. D. Leucyl aminopeptidase PepA. In: BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 2 ed. San Diego: Elsevier/Academic Press, 2004, p. 905–908.
- COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 113-122, Oct. 2007. Suppl. 1.
- COURA, J. R.; ABREU, L. L.; WILCOX, F.; PETANA, W. Estudo comparativo com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo na forma crônica da doença de Chagas em área de campo com transmissão interrompida. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 139-144, 1997.
- COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3-24, Jan. 2002.
- CUEVAS, I. C.; CAZZULO, J. J.; SÁNCHEZ, D. O. GP63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 5739-5749, 2003.
- CUNNINGHAM, E.; DRAG, M.; KAFARSKI, P.; BELL, A. Chemical target validation studies of aminopeptidase in malaria parasites using alpha-aminoalkylphosphonate and phosphonopeptide inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n. 9, p. 3221-3228, Sept. 2008.

DALAL, S.; KLEMBA, M. Roles for two aminopeptidases in vacuolar hemoglobin catabolism in *Plasmodium falciparum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 49, p. 35978-35987, Sept. 2007.

DEUSSING, J.; ROTH, W.; SAFTIG, P.; PETERS, C.; PLOEGH, H. L.; VILLADANGOS, J. A. Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 8, p. 4516-4521, Apr. 1998.

DIAS, J. C. P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos = Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. Revista da **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 4, p. 370-375, Jul-Aug. 2006.

DIAS, J. C. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation and perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, p. 11-18, Oct. 2007. Suppl. 1.

DICKINSON, D. P. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. **Critical reviews in oral biology and medicine**, v. 13, n. 3, p. 238-275, 2002.

DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative). Doenças Negligenciadas, 2009a. Disponível em: < http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx >. Acesso em 02 de maio de 2009.

DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative). Quem faz parte da DNDi, 2009b. Disponível em: < http://www.dndi.org.br/Portugues/sobre_dndi.aspx >. Acesso em: 04 de maio de 2009.

DOBSON, C. M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 15, n. 1, p. 3-16, Feb. 2004.

DOBSON, C. M. Protein folding and misfolding. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 884-890, Dec. 2003.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. **Reviews of Infectious Diseases**, v.6, n. 2, p. 223-238, Mar.-Apr. 1984.

DOCAMPO, R.; SCOTT, D. A.; VERCESI, A. E.; MORENO, S. N. J. The role of Ca^{2+} in the process of cell invasion by intracellular parasites. **Parasitol Today**, v. 12, n. 2, p. 61-65, Feb. 1996.

DOS REIS, F. C.; JUDICE, W. A.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. P. The substrate specificity of cruzipain 2, a cysteine protease isoform from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v.259, n. 2, p. 215-220, June 2006.

DREWES, G.; BOUWMEESTER, T. Global approaches to protein-protein interactions, **Current Opinion In Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 199-205, Apr. 2003.

DUNN, B. M. Determination of protease mechanism. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic Enzymes**. A Practical Approach, 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. Cap. 4, p. 77-104.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 2, n. 1, p. 19-51, Jan. 2007.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. Cruzipain, the Major Cysteine Protease of *Trypanosoma cruzi*: A Sulfated Glycoprotein Antigen as Relevant Candidate for Vaccine Development and Drug Target. A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 24, p. 3174-3202, 2009.

EAKIN, A. E.; MILLS, A. A.; HARTH, G.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 11, p. 7411-7420, Apr, 1992.

EL KOUNI, M.H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, n. 3, p. 283-309, Sept. 2003.

ELLIS, M.; SHARMA, D. K.; HILLEY, J. D.; COOMBS, G. H. Processing and trafficking of *Leishmania mexicana* GP63. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 27968-27974, 2002.

FABBRO DE SUASNABAR, D.; ARIAS, E.; STREIGER, M.; PIACENZA, M.; INGARAMO, M.; DEL BARCO, M.; AMICONE, N. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 99-109, Mar.-Apr. 2000.

FERNANDEZ, P.L.; FARRE, X.; NADAL, A.; FERNANDEZ, E.; PEIRO, N.; SLOANE, B.F.; SHI, G.P.; CHAPMAN, H.A.; CAMPO, E.; CARDESA, A. Expression of cathepsin B and S in the progression of prostate carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 95, n. 1, p. 51-55, Jan. 2001.

FINK, A. L.; CALCIANO, L. J.; GOTO, Y.; NISHIMURA, M.; SWEDBERG, S. A. Characterization of the stable, acid-induced, molten globulelike state of staphylococcal nuclease. **Protein Science** : a publication of the Protein Society, v. 2, n. 7, p. 1155-1160, July 1993.

FINK, A.L.; OBERG, K.A.; SESHADRI, S. Discrete intermediates versus molten globule models for protein folding: characterization of partially folded intermediates of apomyoglobin. **Folding & Design**, v. 3, n. 1, p. 19-25, 1998.

FRANKE DE CAZZULO, B. M.; MARTÍNEZ, J.; NORTH, M. J.; COOMBS, G. H.; CAZZULO, J. J. Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 124, n. 1, p. 81-86, Nov. 1994.

FUJINAGA, M.; CHERNEY, M. M.; OYAMA, H.; ODA, K.; JAMES, M. N. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3364-3369, Mar. 2004.

FUSEK, M.; VETVICKA, V. Dual role of cathepsin D: ligand and protease. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 149, n. 1, p. 43-50, June 2005.

GARCIA, M. P.; NOBREGA, O. T.; TEIXEIRA, A. R.; SOUSA, M. V.; SANTANA, J. M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* acidic 30 kDa cysteine protease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, n. 2, p. 263-272, Mar. 1998.

GARDINER, D. L.; TRENHOLME, K. R.; SKINNER-ADAMS, T. S.; STACK, C. M.; DALTON, J. P. Overexpression of leucyl aminopeptidase in *Plasmodium*

falciparum parasites. Target for the antimalarial activity of bestatin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 3, p. 1741-1745, Jan. 2006.

GAVIGAN, C. S.; DALTON, J. P.; BELL, A. The role of aminopeptidases in haemoglobin degradation in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 117, n. 1, p. 37-48, Sept. 2001

GEA, S.; GUIÑAZU, N.; PELLEGRINI, A.; CARRERA SILVA, E. A.; GIORDANENGO, L.; CANO, R.; AOKI, M. P. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* cysteine protease in the host-parasite interplay. **Inmunología**, v. 25, n. 4, p. 225-238, Oct-Dec. 2006.

GERCZEI, T.; KESERU, G. M.; NÁRAY-SZABÓ, G. Construction of a 3D model of oligopeptidase B, a potential processing enzyme in prokaryotes. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, New York, v. 18, n. 1, p. 7-17, Feb. 2000.

GOCHEVA, V.; ZENG, W.; KE, D.; KLIMSTRA, D.; REINHECKEL, T.; PETERS, C.; HANAHAHAN, D.; JOYCE, J. A. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. **Genes & Development**, v. 20, n. 5, p. 543-556, Mar. 2006.

GOLDBERG, A. L.; CASCIO, P.; SARIC, T.; ROCK, K. L. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 3-4, p. 147-164, Oct. 2002.

GOLDBERG, D. E. Hemoglobin degradation. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 295, p. 275-291, 2005.

GOODSELL, D. S. Inside a living cell. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 16, n. 6, p. 203-206, June 1991.

GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. Soluble proteins: size, shape and function. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 18, n. 3, p. 65-68, Mar. 1993.

GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. Structural symmetry and protein function. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 29, p. 105-153, 2000.

GORLA, N. B.; LEDESMA, O. S.; BARBIERI, G. P.; LARRIPA, I. B. Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic

children treated with nifurtimox. **Mutation Research**, v. 224, n. 2, p. 263-267, Oct. 1989.

GRELLIER, P.; VENDEVILLE, S.; JOYEAU, R.; BASTOS, I. M.; DROBECQ, H.; FRAPPIER, F.; TEIXEIRA, A. R.; SCHR'LEVEL, J.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C.; SANTANA, J. M. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47078-47086, Dec. 2001.

GUEDES, P. M. M.; FIETTO, J. L. R.; LANA, M.; BAHIA, M. T. Advances in Chagas disease chemotherapy. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 175-186, Apr. 2006.

GUEDES, P. M.; OLIVEIRA, F. S.; GUTIERREZ, F. R.; DA SILVA, G. K.; RODRIGUES, G. J.; BENDHACK, L. M.; FRANCO, D. W.; DO VALLE MATTA, M. A.; ZAMBONI, D. S.; DA SILVA, R. S.; SILVA, J. S. Nitric oxide donor trans-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺ as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 2, p. 270-282, May 2010.

HASHIMOTO, Y.; KAKEGAWA, H.; NARITA, Y.; HACHIYA, Y.; HAYAKAWA, T.; KOS, J.; TURK, V.; KATUNUMA, N. Significance of cathepsin B accumulation in synovial fluid of rheumatoid arthritis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 283, n. 2, p. 334-339, May 2001.

HATTA, T.; KAZAMA, K.; MIYOSHI, T.; UMEMIYA, R.; LIAO, M.; INOUE, N.; XUAN, X.; TSUJI, N.; FUJISAKI, K. Identification and characterisation of a leucine aminopeptidase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 10-11, p. 1123-1132, Sept. 2006.

HATTORI, A.; TSUJIMOTO, M. Processing of antigenic peptides by aminopeptidases. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 777-780, June 2004.

HECHT, M. M.; NITZ, N.; ARAUJO, P. F.; SOUSA, A. O.; ROSA, Ade. C.; GOMES, D. A.; LEONARDECZ, E.; TEIXEIRA, A. R. Inheritance of DNA Transferred from American *Trypanosomes* to Human Hosts. **PLoS One**, v. 5, n. 2, e9181, Feb. 2010.

HIBBS, M. S.; HASTY, K. A.; SEYER, J. M.; KANG, A. H.; MAINARDI, C. L. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of

human neutrophil gelatinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 4, p. 2493-2500, Feb. 1985.

HOFMANN, T.; DUNN, B. M.; FINK, A. L. Cryoenzymology of penicillopepsin; with an appendix: mechanism of action of aspartyl proteinases. **Biochemistry**, v. 23, n. 22, p. 5247-5256, Oct. 1984.

HOOPER, N. M. Proteases: a primer. **Essays in Biochemistry**, v. 38, p.1-8, 2002.

HOWARTH, J.; LLOYD, D. G. Simple 1,2-aminoalcohols as strainspecific antimalarial agents. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 46, n. 4, p. 625-628, Oct. 2000.

HU, Z.; MA, B.; WOLFSON, H.; NUSSINOV, R. Conservation of polar residues as hot spots at protein interfaces. **Proteins**, v. 39, n. 4, p. 331-342, June 2000.

IDICULA-THOMAS, S.; BALAJI, P. V. Understanding the relationship between the primary structure of proteins and its propensity to be soluble on overexpression in *Escherichia coli*. **Protein Science: a Publication of the Protein Society**, v. 14, n. 3, p. 582-592, Mar. 2005.

JEDESZKO, C.; SLOANE, B.F. Cysteine cathepsins in human cancer. **Biological Chemistry**, v. 385, n. 11, p. 1017-1027, Nov. 2004.

JIA, H.; TERKAWI, M. A.; ABOGE, G. O.; GOO, Y. K.; LUO, Y.; LI, Y.; YAMAGISHI, J.; NISHIKAWA, Y.; IGARASHI, I.; SUGIMOTO, C.; FUJISAKI, K.; XUAN, X. Characterization of a leucine aminopeptidase of *Babesia gibsoni*. **Parasitology**, v. 136, n. 9, p. 945-952, Aug. 2009.

JIA, H.; NISHIKAWA, Y.; LUO, Y.; YAMAGISHI, J.; SUGIMOTO, C.; XUAN, X. Characterization of a leucine aminopeptidase from *Toxoplasma gondii*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 170, n. 1, p. 1-6, Mar. 2010.

JIN, T.; TARKOWSKI, A.; CARMELIET, P.; BOKAREWA, M. Urokinase, a constitutive component of the inflamed synovial fluid, induces arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 5, n. 1, p. R9-R17, 2003.

JOYCE, J.A.; BARUCH, A.; CHEHADE, K.; MEYER-MORSE N.; GIRAUDO, E.; TSAI, F.Y.; GREENBAUM, D.C.; HAGER, J.H.; BOGYO, M.; HANAHAN, D.

Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 5, n. 5, p. 443-453, May 2004.

JOYCE, J.A.; HANAHAN, D. Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. **Cell Cycle**, v. 3, n. 12, p. 1516-1519, Dec. 2004.

JUNQUEIRA JUNIOR, L. F.; SOARES, J. D. Impaired autonomic control of heart interval changes to Valsalva manoeuvre in Chagas' disease without overt manifestation. **Autonomic neuroscience: Basic & Clinical**, v. 97, n. 1. p. 59-67, Apr. 2002.

KIERSZENBAUM, F. Chronic chagasic tissue lesions in the absence of *Trypanosoma cruzi*: a proposed mechanism. **Parasitology Today**, v. 12, n. 11, p. 414-5, 1996.

KIRCHHOFF, L. V. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). **eMedicine Specialities**, Dec. 2009. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/214581-overview>>. Acesso em: 26 julho 2010.

KLOETZEL, P. M.; OSSENDORP, F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, n. 1, p. 76-81, Feb. 2004.

KNOWLES, G. The effects of arphamenine-A, an inhibitor of aminopeptidases, on in-vitro growth of *Trypanosoma brucei brucei*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 32, n. 1, p. 172-174, July 1993.

KREPELA, E. Cysteine proteinases in tumor cell growth and apoptosis. **Neoplasia**, v. 48, n. 5, p. 332-349, 2001.

KRIBS-ZALETA, C. Estimating Contact Process Saturation in Sylvatic Transmission of *Trypanosoma cruzi* in the United States. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 4, e656, Apr. 2010.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings In Bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. 150-163, June 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.

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

LANNES-VIEIRA, J.; SILVERIO, J. C.; PEREIRA, I. R.; VINAGRE, N. F.; CARVALHO, C. M.; PAIVA, C. N.; SILVA, A. A da. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors--how to make a dream come true. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, p. 226-235, July 2009. Suppl. 1.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, Nov. 2007.

LAVALLIE, E. R.; DIBLASIO, E. A.; KOVACIC, S.; GRANT, K. L.; SCHENDEL, P. F.; MCCOY, J. M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. **Biotechnology** (Nature Publishing Company), v. 11, n. 2, p. 187-193, Feb. 1993.

LEATHERBARROW, R.J. GraFit Version 7, Erithacus Software Ltd., Horley, U.K. 2009.

LEE, J. Y.; SONG, S. M.; SEOK, J. W.; JHA, B. K.; HAN, E. T.; SONG, H. O.; YU, H. S.; HONG, Y.; KONG, H. H.; CHUNG, D. I. M17 leucine aminopeptidase of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 170 n. 1, p. 45-48, Mar. 2010.

LEONARDI, D.; SALOMÓN, C. J.; LAMAS, M. C.; OLIVIERI, A. C. Development of novel formulations for Chagas` disease: Optimization of benzimidazole chitosan microparticles based on artificial neural networks. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 367, p. 140-147, Feb. 2009.

LIN, B.; SHORT, S. A.; ESKILDSEN, M.; KLEMPNER, M. S.; HU, L. T. Functional testing of putative oligopeptide permease (Opp) proteins of *Borrelia burgdorferi*: a complementation model in opp(-) *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1499, n. 3, p. 222-231, Jan. 2001.

LIN, L. L.; HSU, W. H.; WU, C. P.; CHI, M. C.; CHOU, W. M.; HU, H. Y. A thermostable leucine aminopeptidase from *Bacillus kaustophilus* CCRC 11223. **Extremophiles: Life Under Extreme Conditions**, v. 8, n. 1, p. 79-87, Feb. 2004.

LIU, Y.; EISENBERG, D. 3D domain swapping: As domains continue to swap. **Protein Science**, v. 11, n. 6, p. 285-299, June 2002.

LKHIDER, M.; CASTINO, R.; BOUGUYON, E.; ISIDORO, C.; OLLIVIER-BOUSQUET, M. Cathepsin D released by lactating rat mammary epithelial cells is involved in prolactin cleavage under physiological conditions. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 5155-5164, Oct. 2004.

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

LOWE, J.; STOCK, D.; JAP, B.; ZWICKL, P.; BAUMEISTER, W.; HUBER, R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. **Science**, v. 268, n. 5210, p. 533-539, Apr. 1995.

LOWTHER, W. T.; MATTHEWS, B. W. Metalloaminopeptidases: common functional themes in disparate structural surroundings. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4581-4608, Dec. 2002.

MARCILLA, A.; DE LA RUBIA, J. E.; SOTILLO, J.; BERNAL, D.; CARMONA, C.; VILLAVICENCIO, Z.; ACOSTA, D.; TORT, J.; BORNAY, F. J.; ESTEBAN, J. G.; TOLEDO, R. Leucine aminopeptidase is an immunodominant antigen of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products in human infections. **Clinical and Vaccine Immunology**: CVI, v. 15, n. 1, p. 95-100, Jan. 2008.

MATSUI, M.; FOWLER, J. H.; WALLING, L. L. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. **Biological Chemistry**, v. 387, n. 12, p. 1535-1544, Dec. 2006.

MCCARTHY, E.; STACK, C.; DONNELLY, S. M.; DOYLE, S.; MANN, V. H.; BRINDLEY, P. J.; STEWART, M.; DAY, T. A.; MAULE, A. G.; DALTON, J. P. Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and

Schistosoma japonicum. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 6, p. 703-714, 2004.

MACDONALD, M. H.; MORRISON, C. J.; MCMASTER, W. R. Analysis of the active site and activation mechanism of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1253, p. 199-207, 1995.

MCGUIRE, B. S.; CHANG, K. P. Posttranslational regulation of a *Leishmania* HEXXH metalloprotease (gp63). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 7903-7909, 1996.

MCKERROW, J. H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 6, p. 833-837, Jun. 1999.

MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C.; KELLY, B.; LOKE, P.; SAJID, M. Proteases in parasitic diseases. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 1, p. 497-536, 2006.

MCKERROW, J. H.; SUN, E.; ROSENTHAL, P. J.; BOUVIER, J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. **Annual Review of Microbiology**, v. 47, p. 821-853, 1993.

MEIRELLES, M. N.; JULIANO, L.; CARMONA, E.; SILVA, S. G.; COSTA, E. M.; MURTA, A. C.; SCHARFSTEIN, J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 52, n. 2, p. 175-184, June 1992.

MITSIADES, C. S.; MITSIADES, N.; HIDEHIMA, T.; RICHARDSON, P. G.; ANDERSON, K. C. Proteasome inhibition as a new therapeutic principle in hematological malignancies. **Current Drug Targets**, v. 7, n. 10, p. 1341-1347, Oct. 2006.

MIZUTANI, S.; SHIBATA, K.; KIKKAWA, F.; HATTORI, A.; TSUJIMOTO, M.; ISHII, M.; KOBAYASHI, H. Essential role of placental leucine aminopeptidase in gynecologic malignancy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 11, n. 4, p. 453-461, Apr. 2007.

MOHAMED, M.M.; SLOANE, B.F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 6, n. 10, p. 764-775, Oct. 2006.

MONTEIRO; A. C. S.; ABRAHAMSON, M.; LIMA, A. P. C. A.; VANNIER-SANTOS, M. A.; SCHARFSTEIN, J. Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 3933-3942, Nov. 2001.

MORAN, M.; GUZMAN, J.; ROPARS, A. L.; MCDONALD, A.; JAMESON, N.; OMUNE, B.; RYAN, S.; WU, L. Neglected disease research and development: how much are we really spending? **PLoS Medicine**, v. 6, n. 2, Feb. 2009.

MORTY, R. E.; MOREHEAD, J. Cloning and characterization of a leucyl aminopeptidase from three pathogenic *Leishmania* species. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 29, p. 26057-26065, July 2002.

MOTOSHIMA, H.; AZUMA, N.; KAMINOGAWA, S.; ONO, M.; MINAGAWA, E.; MATSUZAWA, H.; OHTA, T.; and YAMAUCHI, K. Molecular cloning and nucleotide sequence of the aminopeptidase T gene of *Thermus aquaticus* YT-1 and its high-level expression in *Escherichia coli*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 2385–2392, Sept. 1990.

MUELLER-STEINER, S.; ZHOU, Y.; ARAI, H.; ROBERSON, E. D.; SUN, B.; CHEN, J.; WANG, X.; YU, G.; ESPOSITO, L.; MUCKE, L.; GAN, L. Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 51, n. 6, p. 703-714, Sept. 2006.

MUSIL, D.; ZUCIC, D.; TURK, D.; ENGH, R. A.; MAYR, I.; HUBER, R.; POPOVIC, T.; TURK, V.; TOWATARI, T.; KATUNUMA, N.; BODE, W. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. **The EMBO Journal**, v. 10, n. 9, p. 2321-2330, Sept. 1991.

NANKYA-KITAKA, M. F.; CURLEY, G. P.; GAVIGAN, C. S.; BELL, A.; DALTON, J. P. *Plasmodium chabaudi chabaudi* and *P. falciparum*: inhibition of aminopeptidase and parasite growth by bestatin and nitrobestatin. **Parasitology Research**, v. 84, n. 7, p. 552-558, July 1998.

NIEMIROWICZ, G.; FERNÁNDEZ, D.; SOLÀ, M.; CAZZULO, J. J.; AVILÉS, F. X.; GOMIS-RÜTH, F. X. The molecular analysis of *Trypanosoma cruzi*

metallocarboxypeptidase 1 provides insight into fold and substrate specificity. **Molecular Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 853-866, Nov. 2008.

NYGREN, P. A.; STÅHL, S.; UHLÉN, M. Engineering proteins to facilitate bioprocessing. **Trends in Biotechnology**, v.12, n. 5, p. 184-188, May 1994.

NITZ, N.; GOMES, C.; ROSA, A. C.; D'SOUZA-AULT, M. R.; MORENO, F.; LAURIA-PIRES, L.; NASCIMENTO, R. J.; TEIXEIRA, A. R. L. Heritable Integration of kDNA Minicircle Sequences from *Trypanosoma cruzi* into the Avian Genome: Insights into Human Chagas Disease. **Cell**, v. 118, n. 2, p. 175-186, July 2004.

NOOREN, I. M. A.; THORNTON, J. M. Diversity of protein-protein interactions. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 14, p. 3486-3492, July 2003b.

NOOREN, I. M. A.; THORNTON, J. M. Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 325, n. 5, p. 991-1018, Jan. 2003a.

OBBERG, K.; CHRUNYK, B. A.; WETZEL, R.; FINK, A. L. Nativelike secondary structure in interleukin-1 beta inclusion bodies by attenuated total reflectance FTIR. **Biochemistry**, v. 33, n. 9, p. 2628-2634, Mar. 1994.

ODA, K. Sedolisin. In: BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 2 ed. London: Elsevier, 2004, p.1886-1887.

OKADA, Y.; NAGASE, H.; HARRIS JUNIOR, E. D. A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 30, p. 14245-14255, Oct. 1986.

PARODI, A. J.; LABRIOLA, C.; CAZZULO, J. J. The presence of complex-type oligosaccharides at the C-terminal domain glycosylation site of some molecules of cruzipain. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.69, n. 2, p. 247-255, Feb. 1995.

PHAM, C. T. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 7, p. 541-550, July 2006.

PIACENZA, L.; ACOSTA, D.; BASMADJIAN, I.; DALTON, J. P.; CARMONA, C. Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 4, p. 1954-1961, Apr. 1999.

PODGORSKI, I.; SLOANE, B. F. Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. **Biochemical Society Symposium**, v. 70, p. 263-276, 2003.

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

POTEMPA, J.; PIKE, R. N. Bacterial Peptidases. In: RUSSELL, W.; HERWALD, H. **Concepts in Bacterial Virulence**. Basel: Karger, 2005. p. 132-180 (Collection: Contributions to Microbiology, v. 12)

PULIDO-CEJUDO, G.; CONWAY, B.; PROULX, P.; BROWN, R.; IZAGUIRRE, C. A. Bestatin-mediated inhibition of leucine aminopeptidase may hinder HIV infection. **Antiviral Research**, v. 36, n. 3, p. 167-177, Dec. 1997.

RAFELSKI, S. M.; THERIOT, J. A. CRAWLING TOWARD A UNIFIED MODEL OF CELL MOTILITY: Spatial and Temporal Regulation of Actin Dynamics. **Annual Review Biochemistry**, v. 73, p. 209-239, 2004.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**: MMBR, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sept. 1998.

RASSI, A.; AMATO NETO, V.; DE SIQUEIRA, A. F.; FERRIOLLI FILHO, F.; AMATO, V. S.; RASSI JUNIOR, A. Efeito protetor do benznidazol contra a reativação parasitária em pacientes cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e tratados com corticóide em virtude de afecções associadas = Protective effect of benznidazole against parasite reactivation in patients chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with corticoids for associated diseases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 5, p. 475-482, Sept. 1999.

RASSI JUNIOR, A.; DIAS, J. C.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas disease. **Heart**, v. 95, n. 7, p. 524-534, Apr. 2009.

RASSI JUNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, Apr. 2010.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of metallopeptidases. **Methods in Enzymology**, v. 248, p. 183-228, 1995.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **The Biochemical Journal**, v. 290, p. 205-218, Feb. 1993.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Introduction: Metallopeptidases and their clans. In: BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 2. ed. San Diego, USA: Elsevier/Academic Press, 2004, p. 231-263.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. D227-D233, Jan. 2010.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. D270-D272, Jan. 2006.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; KOK, C. Y.; KONG, J.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. D320-D325, Jan. 2008.

ROBERTSON, D. E.; FARID, R. S.; MOSER, C. C.; URBAUER, J.L.; MULHOLLAND, S. E.; PIDIKITI, R.; LEAR, J. D.; WAND, A.J.; DEGRADO, W. F.; DUTTON, P. L. Design and synthesis of multi-haem proteins. **Nature**, v. 368, n. 6470, p. 425-432, Mar. 1994.

ROCHET, J. C.; BROWNIE, E. R.; OIKAWA, K.; HICKS, L. D.; FRASER, M. E.; JAMES, M. N. G.; KAY, C. M.; BRIDGER, W. A.; WOLODKO, W. T. Pig heart CoA transferase exists as two oligomeric forms separated by a large kinetic barrier. **Biochemistry**, v. 39, n. 37, p. 11291-11302, Sept. 2000.

ROGI, T.; TSUJIMOTO, M.; NAKAZATO, H.; MIZUTANI, S.; TOMODA, Y. Human placental leucine minopeptidase/oxytocinase. A new member of type II membran spanning zinc metallopeptidase family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 1, p. 56-61, Jan. 1996.

RONCARI, G.; ZUBER, H. Thermophilic aminopeptidases from *Bacillus stearothermophilus* I. Isolation, specificity, and general properties of the

thermostable aminopeptidase I. **International Journal of Protein Research**, v. 1, n. 1, p. 45-61, 1969.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. **Microbial Cell Factories**, v. 8, p. 41, July 2009.

ROSENTHAL, P. J. Hydrolysis of erythrocyte proteins by proteases of malaria parasites. **Current Opinion in Hematology**, v. 9, n. 2, p. 140-145, Mar. 2002.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SANDERSON, S. J.; WESTROP, G. D.; SCHARFSTEIN, J.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H. Functional conservation of a natural cysteine peptidase inhibitor in protozoan and bacterial pathogens. **FEBS Letters**, v. 542, n. 1-3, p. 12-16, May 2003.

SANTANA, J. M.; GRELLIER, P.; RODIER, M-H.; SCHREVEL, J.; TEIXEIRA, A. Purification and characterization of a new 120 kDa alkaline proteinase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 187, n. 3, p. 1466-1473, Sept. 1992.

SANTANA, J. M.; GRELLIER, P.; SCHREVEL, J.; TEIXEIRA, A. R. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **The Biochemical Journal**, v. 325, p. 129-137, July 1997.

SCHARFSTEIN, J.; SCHECHTER, M.; SENNA, M.; PERALTA, J. M.; MENDONCA-PREVIATO, L.; MILES, M. A. *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of a 57/51,000 m.w. surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. **The Journal of Immunology**, v. 137, n. 4, p. 1336-1341, Aug. 1986.

SCHLAGENHAUF, E.; ETGES, R.; METCALF, P. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). **Structure**, v. 6, p. 1035-1046, 1998.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, p. 75-85, Oct. 2007. Suppl. 1.

SELKOE, D.J. Folding proteins in fatal ways. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 900-904, Dec. 2003.

SESHADRI, S.; OBERG, K. A.; UVERSKY, V. N. Mechanisms and Consequences of Protein Aggregation: The Role of Folding Intermediates. **Current Protein and Peptide Science**, v. 10, n. 5, p. 456-463, Oct. 2009.

SHANNON, J. D.; BARAMOVA, E. N.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloprotease which cleaves type IV collagen and gelatin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 20, p. 11575-11583, July 1989.

SHOGREN-KNAAK, M. A.; IMPERIALI, B. Modulating pyridoxamine-mediated transamination through a betabeta alpha motif peptide scaffold. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 9, p. 1993-2002, Sept. 1999.

SILVA, J. J. N.; GUEDES, P. M. M.; ZOTTIS, A.; BALLIANO, T. L.; SILVA, F. O. N.; LOPES, L. G. F.; ELLENA, J.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; FRANCO, D. W.; SILVA, J. S. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 2, p. 260-269, May 2010.

SKINNER-ADAMS, T.S.; LOWTHER, J.; TEUSCHER, F.; STACK, C. M.; GREMBECKA, J.; MUCHA, A.; KAFARSKI, P.; TRENHOLME, K. R.; DALTON, J. P.; GARDINER, D. L. Identification of phosphinate dipeptide analog inhibitors directed against the *Plasmodium falciparum* M17 leucine aminopeptidase as lead antimalarial compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 24, p. 6024-6031, Nov. 2007.

SKINNER-ADAMS, T. S.; STACK, C. M.; TRENHOLME, K. R.; BROWN, C. L.; GREMBECKA, J.; LOWTHER, J.; MUCHA, A.; DRAG, M.; KAFARSKI, P.; MCGOWAN, S.; WHISSTOCK, J. C.; GARDINER, D. L.; DALTON, J. P. *Plasmodium falciparum* neutral aminopeptidases: new targets for anti-malarials. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 1, p. 53-61, Jan. 2010.

SMYTH, D. R.; MROZKIEWICZ, M. K.; MCGRATH, W. J.; LISTWAN, P.; KOBE, B. Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags, **Protein**

Science: a Publication of the Protein Society, v. 12, n. 7, p. 1313–1322, July 2003.

SOSA-ESTANI, S., VIOTTI, R., SEGURA, E.L. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 167-180, July 2009. Suppl. 1.

SOUTO-PADRON, T.; CAMPETELLA, O. E.; CAZZULO, J. J.; de SOUZA, W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. **Journal of Cell Science**, v. 96, p. 485-490, July 1990.

STACK, C. M.; LOWTHER, J.; CUNNINGHAM, E.; DONNELLY, S.; GARDINER, D. L.; TRENHOLME, K. R.; SKINNER-ADAMS, T. S.; TEUSCHER, F.; GREMBECKA, J.; MUCHA, A.; KAFARSKI, P.; LUA, L.; BELL, A.; DALTON, J. P. Characterization of the *Plasmodium falciparum* M17 leucyl aminopeptidase. A protease involved in amino acid regulation with potential for antimalarial drug development. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 3, p. 2069-2080, Jan. 2007.

STRÄTER, N.; LIPSCOMB, W. N. Leucyl aminopeptidase (animal). In: BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 2 ed. San Diego: Elsevier/Academic Press, 2004, p. 896-899.

SUASNÁBAR, D. F.; ARIAS, E.; STREIGER, M.; PIACENZA, M.; INGARAMO, M.; BARCO, M.; AMICONE, N. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 2, p. 99-109, Apr. 2000.

SUN, Q. M.; CAO, L.; FANG, L.; CHEN, C.; DAI, J.; CHEN, L. L.; HUA, Z. C. Expression, purification of human vasostatin120-180 in *Escherichia coli*, and its anti-angiogenic characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 39, n. 2, p. 288-295, Feb. 2005.

TAYLOR, A. Aminopeptidases: structure and function. **The FASEB Journal** : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 7, n. 2, p. 290-298, Feb. 1993.

TEIXEIRA, A. R. L.; CALIXTO, M. A.; RIZZO, L. V.; CÓRDOBA, J. C.;
TEIXEIRA, M. L. Cancerigênese em camundongos tratados com compostos
nitroderivados. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE
MEDICINA TROPICAL, 21., 1985, São Paulo. **Resumos...** São Paulo, 1985.
p.48-49.

TEIXEIRA, A. R. L.; CÓRDOBA, J. C.; SOUTO-MAIOR, I.; SOLÓRZANO, E.
Chagas' disease: lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole. **The
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n. 2, p. 146-158,
Aug. 1990.

TERENIUS, L.; SANDIN, J.; SAKURADA, T. Nociceptin/orphanin FQ
metabolism and bioactive metabolites. **Peptides**, v. 21, n. 7, p. 919-922, July
2000.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical
fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and
Biotechnology**, v. 60, n. 5, p. 523-533, Jan. 2003.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects.
Nature Reviews. Drug Discovery, v. 5, n. 9, p. 785-799, Sept. 2006.

TURK, V.; TURK, B.; TURK, D. Lysosomal cysteine proteases: facts and
opportunities. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 17, p. 4629-4633, Sept. 2001.

UMEZAWA, H.; AOYAGI, T.; SUDA, H.; HAMADA, M.; TAKEUCHI, T. Bestatin,
an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. **The Journal of
Antibiotics**, v. 29, n. 1, p. 97-99, Jan. 1976.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas
disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, p. 311-
318, Jul. 2009. Suppl. 1.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why.
Journal of Molecular Medicine, v. 77, n. 3, p. 332-338, Mar. 1999.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas' disease. **Current Pharmaceutical
Design**, v. 8, n. 4, p. 287-295, 2002.

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

UVERSKY, V. N.; FINK, A. L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1698, n. 2, p. 131-153 May 2004.

UVERSKY, V. N.; KARNOUP, A. S.; SEGEL, D. J.; SESHADRI, S.; DONIACH, S.; FINK, A. L. Anion-induced folding of Staphylococcal nuclease: characterization of multiple equilibrium partially folded intermediates. **Journal of Molecular Biology**, v. 278, n. 4, p. 879-894, May 1998.

VANDER JAGT, D. L.; BAACK, B. R.; HUNSAKER, L. A. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 10, n. 1, p. 45-54. Jan. 1984.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; ARMENTI, H.; SEGURA, E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. **American Heart Journal**, v. 127, n. 1, p. 151-162, Jan. 1994.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; BERTOCCHI, G.; PETTI, M.; ALVAREZ, M. G.; POSTAN, M.; ARMENTI, A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, n. 10, p. 724-734, May 2006.

WALDEN, H.; BELL, G. S.; RUSSELL, R. J. M.; SIEBERS, B.; HENSEL, R.; TAYLOR, G. L. J. Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 306, n. 4, p. 745-757, Mar. 2001.

WALKER, B.; LYNAS, J. F. Strategies for the inhibition of serine proteases. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 58, n. 4, p. 596-624, Apr. 2001.

WALLING, L. L. L Leucyl aminopeptidase (plant). In: BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 2 ed. San Diego: Elsevier/Academic Press, 2004, p. 901-904.

WANG, J.; MALDONADO, M. A. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 3, n. 4, p. 255-261, Aug. 2006.

WEAVER, L. H.; KESTER, W. R.; MATTHEWS, B. W. A crystallographic study of the complex of phosphoramidon with the molybdopterin. A model for the presumed catalytic transition state and for the binding of extended substances. **Journal of Molecular Biology**, v. 114, n. 1, p. 119-132, July 1977.

WESTERMARK, P.; BENSON, M.D.; BUXBAUM, J.N.; COHEN, A.S.; FRANGIONE, B.; IKEDA, S.; MASTERS, C.L.; MERLINI, G.; SARAIVA, M.J.; SIPE, J.D. Amyloid: toward terminology clarification: report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. **Amyloid**, v. 12, n. 1, p. 1-4, Mar. 2005.

WOOLWINE, S. C.; SPRINKLE, A. B.; WOZNIAK, D. J. Loss of *Pseudomonas aeruginosa* PphA aminopeptidase activity results in increased transcription. **Journal of Bacteriology**. v. 183, n. 15, p. 4674-4679, 2001.

WORLD HEALTH ORGAN BULL. Chagas: one hundred years later. v. 87, p. 491-492, 2009

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). TDR and product/drug discovery, introduction, 2009. Disponível em: < <http://apps.who.int/tdr/svc/topics/product-drug-development> >, Acesso em: 13 de maio de 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas Disease. In: _____. **Tropical disease research: progress 2003-2004**. Seventeenth programme report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO. Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases (TDR). Geneva, 2005. p. 31-33. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/old/publications/publications/pr17.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

YONG, V.; SCHMITZ, V.; VANNIER-SANTO, M. A.; DE LIMA, A. P.; LALMANACH, G.; JULIANO, L.; GAUTHIER, F.; SCHARFSTEIN, J. Altered expression of cruzipain and a cathepsin B-like target in a *Trypanosoma cruzi* cell line displaying resistance to synthetic inhibitors of cysteine-proteinases. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 109, n. 1, p. 47-59, June 2000.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 1, p. 87-111, Mar. 2006.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* cell invasion mechanisms. In: TYLER, K. M.; MILES, M. A. **World Class Parasites**: v. 7 American Trypanosomiasis. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 69-79.

YUAN, L. D.; HUA, Z. C. Expression, purification, and characterization of a biologically active bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli*, **Protein Expression and Purification**, v. 25, n. 2, p. 300-304, July 2002.

ZHOU, N. E.; ZHU, B. Y.; KAY, C. M.; HODGES, R. S. The two-stranded alpha-helical coiled-coil is an ideal model for studying protein stability and subunit interactions. **Biopolymers**, v. 32, n. 4, p. 419-426, Apr. 1992.